



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0003611
(43) 공개일자 2017년01월09일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 33/92</i> (2006.01) <i>A61K 38/17</i> (2006.01) <i>C07K 14/47</i> (2006.01) <i>C07K 14/705</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/50</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 <i>G01N 33/92</i> (2013.01) <i>A61K 38/1709</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7033725 (22) 출원일자(국제) 2015년04월30일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2016년12월01일 (86) 국제출원번호 PCT/IB2015/000854 (87) 국제공개번호 WO 2015/173633 국제공개일자 2015년11월19일 (30) 우선권주장 61/988,095 2014년05월02일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인 세레니스 제라퓨틱스 홀딩 에스에이 프랑스 에프-31670 라베즈 바트 아 튀 드 라 데쿠 베르트 265</p> <p>(72) 발명자 다쎄, 장-루이 프랑스 에프-31300 툴루즈 알레 살레 말펠 7 바트. 베 바바라, 호날드 프랑스 에프-31840 세이 아브뉴 뒤 그랑 플랑티에 흐 비스 22</p> <p>(74) 대리인 양영준, 김영</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 87 항

(54) 발명의 명칭 HDL 요법 마커

(57) 요약

본 출원은 HDL을 모방하거나 HDL 발현 수준을 상승시키는 치료제에 대한 동반 진단 검정에 관한 것이다. 본 출원은 또한 가족성 저알파지질단백혈증의 치료 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/4702 (2013.01)

C07K 14/705 (2013.01)

C12Q 1/6883 (2013.01)

G01N 33/502 (2013.01)

G01N 33/5088 (2013.01)

C12Q 2600/106 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) HDL 치료제의 제1 용량을 대상체에게 투여하고,
- (b) 상기 제1 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고;
- (c) (i) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 제1 용량보다 낮은 상기 HDL 치료제의 제2 용량을 투여하거나; 또는
- (ii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되지 않는 경우, 대상체를 상기 HDL 치료제의 제1 용량으로 치료하는 것
- 을 포함하는 대상체에서 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.

청구항 2

- (a) 대상체를 제1 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 치료하고,
- (b) 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 투약 스케줄의 효과를 평가하고;
- (c) (i) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 상한 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 보다 낮은 용량의 HDL 치료제를 투여하는 것, 보다 긴 기간에 걸쳐 HDL 치료제를 대상체 내로 주입하는 것, 및 보다 적은 빈도 기준으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하는 것 중 하나 이상을 포함하는 제2 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 대상체를 치료하거나;
- (ii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 하한 컷오프량 초과만큼 감소되지 않는 경우, 보다 높은 용량의 HDL 치료제를 투여하는 것, 보다 짧은 기간에 걸쳐 HDL 치료제를 대상체 내로 주입하는 것, 및 보다 많은 빈도 기준으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하는 것 중 하나 이상을 포함하는 제2 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 대상체를 치료하거나; 또는
- (iii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 상한 및 하한 컷오프량 사이의 양만큼 감소되는 경우, 대상체를 제1 투약 스케줄에 따라 치료하기를 계속하는 것
- 을 포함하는 대상체에서의 HDL 치료제의 효능의 모니터링 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 컷오프량이 상기 투여 이전의 대상체 자신의 기준선에 상대적인 것인 HDL 치료제.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 컷오프량이 대조량에 상대적인 것인 HDL 치료제.

청구항 5

제4항에 있어서, 대조량이 집단 평균인 HDL 치료제.

청구항 6

제5항에 있어서, 집단 평균이 건강한 대상체로부터의 것인 HDL 치료제.

청구항 7

제5항에 있어서, 집단 평균이 대상체와 동일한 질환 상태를 갖는 집단으로부터의 것인 HDL 치료제.

청구항 8

- (a) HDL 치료제의 제1 용량을 대상체의 집단에게 투여하고,
 - (b) 상기 제1 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고;
 - (c) 제1 용량보다 높거나 낮은 상기 HDL 치료제의 제2 용량을 투여하고,
 - (d) 상기 제2 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 및/또는 제2 용량의 효과를 평가하고;
 - (e) 임의로 단계 (c) 및 (d)를 상기 HDL 치료제의 하나 이상의 추가의 용량으로 반복하고;
 - (f) 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 컷오프량 초과만큼 감소시키지 않는 최고 용량을 확인함으로써, 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 상기 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것
- 을 포함하는 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 상기 제2 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제2 용량의 효과를 평가하는 것을 추가로 포함하는 것인 HDL 치료제.

청구항 10

제9항에 있어서, 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 상기 HDL 치료제의 제3 용량이 투여되며, 여기서 상기 HDL 치료제의 제3 용량은 제2 용량보다 낮은 것인 HDL 치료제.

청구항 11

- (a) HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 대상체의 기준선량 또는 대조량에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량으로의 HDL 치료제; 및
 - (b) 담즙-산 수지, 니아신, 스타틴, 피브레이트, PCSK9 억제제, 에제티미브, 및 CETP 억제제로부터 임의로 선택되는 콜레스테롤 감소 요법
- 의 조합을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 치료 방법에 사용하기 위한, 임의로 지단백질 복합체인 HDL 치료제.

청구항 12

제11항에 있어서, 비교되는 양이 대조량이고 집단 평균인 HDL 치료제.

청구항 13

제12항에 있어서, 집단 평균이 건강한 대상체로부터의 것인 HDL 치료제.

청구항 14

제12항에 있어서, 집단 평균이 대상체와 동일한 질환 상태를 갖는 집단으로부터의 것인 HDL 치료제.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간이거나, 대상체의 집단이 인간 대상체의 집단인 HDL 치료제.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 비-인간 동물이거나, 대상체의 집단이 비-인간 동물의 집

단인 HDL 치료제.

청구항 17

제16항에 있어서, 비-인간 동물이 마우스인 HDL 치료제.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 HDL 마커가 ABCA1인 HDL 치료제.

청구항 19

제18항에 있어서, ABCA1 mRNA 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 20

제18항에 있어서, ABCA1 단백질 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, ABCA1 컷오프량이 20% 내지 80%인 HDL 치료제.

청구항 22

제21항에 있어서, ABCA1 컷오프량이 30% 내지 70%인 HDL 치료제.

청구항 23

제22항에 있어서, ABCA1 컷오프량이 40% 내지 60%인 HDL 치료제.

청구항 24

제23항에 있어서, ABCA1 컷오프량이 50%인 HDL 치료제.

청구항 25

제18항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, ABCA1 발현 수준이 상기 제1 용량 또는 상기 제2 용량의 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 HDL 마커가 ABCG1인 HDL 치료제.

청구항 27

제26항에 있어서, ABCG1 mRNA 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 28

제26항에 있어서, ABCG1 단백질 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, ABCG1 컷오프량이 20% 내지 80%인 HDL 치료제.

청구항 30

제29항에 있어서, ABCG1 컷오프량이 30% 내지 70%인 HDL 치료제.

청구항 31

제30항에 있어서, ABCG1 컷오프량이 40% 내지 60%인 HDL 치료제.

청구항 32

제31항에 있어서, ABCA1 컷오프량이 50%인 HDL 치료제.

청구항 33

제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, ABCG1 발현 수준이 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8 시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 HDL 마커가 SREBP-1인 HDL 치료제.

청구항 35

제34항에 있어서, SREBP-1 mRNA 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 36

제34항에 있어서, SREBP-1 단백질 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 20% 내지 80%인 HDL 치료제.

청구항 38

제37항에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 30% 내지 70%인 HDL 치료제.

청구항 39

제38항에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 40% 내지 60%인 HDL 치료제.

청구항 40

제39항에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 50%인 HDL 치료제.

청구항 41

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, SREBP-1 발현 수준이 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, HDL 치료제가 지단백질 복합체인 HDL 치료제.

청구항 43

제42항에 있어서, 지단백질 복합체가 아포지단백질을 포함하는 것인 HDL 치료제.

청구항 44

제43항에 있어서, 아포지단백질이 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoE 또는 그의 조합인 HDL 치료제.

청구항 45

제42항에 있어서, 지단백질 복합체가 아포지단백질 펩티드 모방체를 포함하는 것인 HDL 치료제.

청구항 46

제45항에 있어서, 펩티드 모방체가 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, 또는 ApoE 펩티드 모방체 또는 그의 조합인 HDL 치료제.

청구항 47

제42항에 있어서, 지단백질 복합체가 CER-001, CSL-111, CSL-112, 또는 ETC-216인 HDL 치료제.

청구항 48

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, HDL 치료제가 소분자인 HDL 치료제.

청구항 49

제48항에 있어서, 소분자가 CETP 억제제인 HDL 치료제.

청구항 50

제48항에 있어서, 소분자가 판토텐산 유도체인 HDL 치료제.

청구항 51

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 컷오프량을 측정하는 것을 추가로 포함하는 HDL 치료제.

청구항 52

제51항에 있어서, 컷오프량이 HDL 치료제에 대한 용량 반응 곡선을 생성함으로써 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 53

제52항에 있어서, 컷오프량이 용량 반응 곡선에서 변곡점을 발생시키는 용량의 25% 내지 75%인 HDL 치료제.

청구항 54

제53항에 있어서, 컷오프량이 용량 반응 곡선에서 변곡점을 발생시키는 용량의 40% 내지 60%인 HDL 치료제.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체 또는 대상체의 집단이 ABCA1 결핍을 갖는 것인 HDL 치료제.

청구항 56

제55항에 있어서, 대상체 또는 대상체의 집단이 ABCA1 돌연변이에 대해 동형접합성인 HDL 치료제.

청구항 57

제55항에 있어서, 대상체 또는 대상체의 집단이 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성인 HDL 치료제.

청구항 58

- (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체에게 또는 대상체의 집단에게 투여하고,
 - (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 또는 집단의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고;
 - (c) 상기 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 상승시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것
- 을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.

청구항 59

- (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체에게 또는 대상체의 집단에게 투여하고,
- (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 또는 집단의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고;
- (c) 기준선 발현 수준을 유지하거나, 또는 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의

HDL 마커의 발현 수준을 상승시키는 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.

청구항 60

- (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하고;
- (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하고;
- (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.

청구항 61

- (a) HDL 치료제를 하나 이상의 투약 빈도에 따라 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하는 단계;
 - (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하는 단계; 및
 - (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 투약 빈도를 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 단계
- 에 의해 HDL 치료제의 가장 빈번한 투약 처방의 최고 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 투약 간격의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.

청구항 62

- 제61항에 있어서, 하나 이상의 투약 빈도가
- (a) 2일마다 1 내지 4시간 주입으로서의 투여;
 - (b) 3일마다 1 내지 4시간 주입으로서의 투여;
 - (c) 1주마다 24시간 주입으로서의 투여; 및
 - (d) 2주마다 24시간 주입으로서의 투여
- 로부터 선택되는 하나 이상의 투약 빈도를 포함하는 것인 HDL 치료제.

청구항 63

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 콜레스테롤 유출이 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서 측정되는 것인 HDL 치료제.

청구항 64

대상체에게 치료 유효량의 HDL 치료제를 투여하는 것을 포함하는 ABCA1 결핍을 갖는 대상체의 치료 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.

청구항 65

제64항에 있어서, HDL 치료제가 CER-001인 HDL 치료제.

청구항 66

제64항 또는 제65항에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성인 HDL 치료제.

청구항 67

제64항 또는 제65항에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 동형접합성인 HDL 치료제.

청구항 68

- (a) 가족성 원발성 저알파지질단백혈증을 앓고 있는 대상체에게 HDL 치료제를 유도 처방에 따라 투여하고; 이어

서

(b) 대상체에게 HDL 치료제를 유지 처방에 따라 투여하는 것

을 포함하는 가족성 원발성 저알파지질단백혈증을 앓고 있는 대상체의 치료 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.

청구항 69

제68항에 있어서, 유지 처방이 HDL 치료제를 보다 낮은 용량, 보다 낮은 빈도, 또는 둘 다로 투여하는 것을 수반하는 것인 HDL 치료제.

청구항 70

제68항 또는 제69항에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성인 HDL 치료제.

청구항 71

제68항 또는 제69항에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 동형접합성인 HDL 치료제.

청구항 72

제68항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 LCAT 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성인 HDL 치료제.

청구항 73

제68항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 ApoA-I 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성인 HDL 치료제.

청구항 74

제68항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 ABCG1 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성인 HDL 치료제.

청구항 75

제68항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 또한 지질 제어 의약으로 치료되는 것인 HDL 치료제.

청구항 76

제75항에 있어서, 지질 제어 의약이 아토르바스타틴, 에제티미브, 니아신, 로수바스타틴, 심바스타틴, 아스피린, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴 또는 그의 조합인 HDL 치료제.

청구항 77

제68항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, HDL 치료제가 CER-001인 HDL 치료제.

청구항 78

제77항에 있어서, 유도 처방이 4주의 기간의 것인 HDL 치료제.

청구항 79

제77항 또는 제78항에 있어서, 유도 처방이 CER-001을 1주 3회 투여하는 것을 포함하는 것인 HDL 치료제.

청구항 80

제77항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 유도 처방에서 투여되는 용량이 8 내지 15 mg/kg (단백질 중량 기준)인 HDL 치료제.

청구항 81

제80항에 있어서, 유도 처방에서 투여되는 용량이 8 mg/kg, 12 mg/kg 또는 15 mg/kg인 HDL 치료제.

청구항 82

제77항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 유지 처방이 CER-001을 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 1년, 적어도 18개월, 적어도 2년 동안, 또는 무기한으로 투여하는 것을 포함하는 것인 HDL 치료제.

청구항 83

제77항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 유지 처방이 CER-001을 1주 2회 투여하는 것을 포함하는 것인 HDL 치료제.

청구항 84

제77항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 유지 처방에서 투여되는 용량이 1 내지 6 mg/kg (단백질 중량 기준으로)인 HDL 치료제.

청구항 85

제84항에 있어서, 유지 처방에서 투여되는 용량이 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 6 mg/kg인 HDL 치료제.

청구항 86

제68항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 유도 처방이 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 및/또는 집단 평균에 비해 20% 내지 80% 또는 40% 내지 60%만큼 감소시키는 용량을 이용하고/거나;

(b) 유지 처방이 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 및/또는 집단 평균에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량을 이용하는 것인 HDL 치료제.

청구항 87

제86항에 있어서, 유지 처방이 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 감소시키지 않는 용량을 이용하는 것인 HDL 치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

1. 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2014년 5월 2일에 출원된 미국 가출원 제61/988,095호에 대해 35 U.S.C. § 119(e) 하의 우선권을 주장하며, 그의 내용은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0003]

2. 서열 목록

[0004]

본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되고, 그 전문의 본원에 참조로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2015년 4월 22일에 생성된 상기 ASCII 카피는 CRN-016WO_SL.txt로 명명되며, 크기가 57,065 바이트이다.

배경 기술

[0005]

3. 배경

[0006]

3.1. 개관

[0007]

순환 콜레스테롤은 혈액에서 지질을 수송하는 지질 및 단백질 조성물의 혈장 지단백질-복합체 입자에 의해 운반된다. 4가지 주요한 부류의 지단백질 입자는 혈장에서 순환하며, 지방-수송 시스템에 관여한다: 킬로미크론, 초저밀도 지단백질 (VLDL), 저밀도 지단백질 (LDL) 및 고밀도 지단백질 (HDL). 킬로미크론은 장내 지방 흡수의 단-수명 생성물을 구성한다. VLDL, 특히, LDL은 (이것이 합성되거나 식이 공급원으로부터 얻어지는) 간으로부터 동맥벽을 비롯한 간외 조직으로의 콜레스테롤의 전달을 담당한다. HDL은 대조적으로 역 콜레스테롤 수송 (RCT), 즉, 특히 간외 조직으로부터 이것이 저장, 이화, 제거, 또는 재활용되는 간으로의 콜레스테롤 지질의 제

거를 매개한다. HDL은 또한 염증, 산화된 지질 및 인테루킨의 수송에 있어서 유익한 역할을 하며, 이는 다시 혈관벽에서 염증을 감소시킬 수 있다.

[0008] 지단백질 입자는 콜레스테롤 (통상적으로 콜레스테릴 에스테르의 형태로) 및 트리글리세리드로 구성된 소수성 코어를 갖는다. 코어는 인지질, 비에스테르화된 콜레스테롤 및 아포지단백질을 포함하는 표면 외피에 의해 둘러싸인다. 아포지단백질은 지질 수송을 매개하며, 일부는 지질 대사에 관여하는 효소와 상호작용할 수 있다. ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V, ApoB, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoE, ApoJ 및 ApoH를 비롯한 적어도 10종의 아포지단백질이 확인되었다. 다른 단백질, 예컨대 LCAT (레스틴:콜레스테롤 아실트랜스페라제), CETP (콜레스테릴 에스테르 전달 단백질), PLTP (인지질 전달 단백질) 및 PON (파라옥소나제)는 또한 지단백질과 연관되어 발견된다.

[0009] 심혈관 질환, 예컨대 관상동맥 심장 질환, 관상 동맥 질환 및 아테롬성동맥경화증은 압도적으로 상승된 혈청 콜레스테롤 수준과 관련된다. 예를 들어, 아테롬성동맥경화증은 동맥벽 내의 콜레스테롤 (및 콜레스테롤 에스테르)의 축적을 특징으로 하는 천천히 진행되는 질환이다. 대식세포에서의 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르의 축적은 아테롬성동맥경화 플라크의 특징인 발포세포의 형성을 초래한다. 흥미로운 증거는 아테롬성동맥경화 병변에 침착된 지질이 주로 혈장 LDL로부터 유래된다는 이론을 뒷받침하며; 따라서, LDL은 대중적으로 "나쁜" 콜레스테롤로 알려지게 되었다. 대조적으로, HDL 혈청 수준은 관상동맥 심장 질환과 역으로 상관된다. 사실, HDL의 높은 혈청 수준은 부정적 위험 인자로 간주된다. 혈장 HDL의 높은 수준은 관상 동맥 질환에 대해 보호적일 뿐만 아니라, 사실상 아테롬성동맥경화 플라크의 퇴행을 유도할 수 있음이 가설화되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Badimon *et al.*, 1992, *Circulation* 86 (Suppl. III):86-94]; [Dansky and Fisher, 1999, *Circulation* 100:1762-63]; [Tangirala *et al.*, 1999, *Circulation* 100(17):1816-22]; [Fan *et al.*, 1999, *Atherosclerosis* 147(1):139-45]; [Deckert *et al.*, 1999, *Circulation* 100(11):1230-35]; [Boisvert *et al.*, 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(3):525-30]; [Benoit *et al.*, 1999, *Circulation* 99(1):105-10]; [Holvoet *et al.*, 1998, *J. Clin. Invest.* 102(2):379-85]; [Duverger *et al.*, 1996, *Circulation* 94(4):713-17]; [Miyazaki *et al.*, 1995, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15(11):1882-88]; [Mezdour *et al.*, 1995, *Atherosclerosis* 113(2):237-46]; [Liu *et al.*, 1994, *J. Lipid Res.* 35(12):2263-67]; [Plump *et al.*, 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91(20):9607-11]; [Paszty *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.* 94(2):899-903]; [She *et al.*, 1992, *Chin. Med. J. (Engl.)* 105(5):369-73]; [Rubin *et al.*, 1991, *Nature* 353(6341):265-67]; [She *et al.*, 1990, *Ann. NY Acad. Sci.* 598:339-51]; [Ran, 1989, *Chung Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih* (also translated as: *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*) 18(4):257-61]; [Quezado *et al.*, 1995, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272(2):604-11]; [Duverger *et al.*, 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12):1424-29]; [Kopfler *et al.*, 1994, *Circulation*; 90(3):1319-27]; [Miller *et al.*, 1985, *Nature* 314(6006):109-11]; [Ha *et al.*, 1992, *Biochim. Biophys. Acta* 1125(2):223-29]; [Beitz *et al.*, 1992, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 47(2):149-52] 참조). 그 결과, HDL은 대중적으로 "좋은" 콜레스테롤로 알려지게 되었다 (예를 들어, 문헌 [Zhang, *et al.*, 2003 *Circulation* 108:661-663] 참조).

[0010] HDL의 "보호적" 역할은 다수의 연구에서 확인되었다 (예를 들어, 문헌 [Miller *et al.*, 1977, *Lancet* 1(8019):965-68]; [Wayne *et al.*, 1981, *Atherosclerosis* 39:411-19]). 이들 연구에서, LDL의 상승된 수준은 증가된 심혈관 위험과 연관되는 것으로 나타나는 반면, 높은 HDL 수준은 심혈관 보호를 제공하는 것으로 보인다. 토끼 내로의 HDL 주입은 콜레스테롤 유도된 동맥 병변의 발달을 방해할 수 있고/거나 (Badimon *et al.*, 1989, *Lab. Invest.* 60:455-61), 그의 퇴행을 유도할 수 있음 (Badimon *et al.*, 1990, *J. Clin. Invest.* 85:1234-41)을 나타내는 생체내 연구는 HDL의 보호적 역할을 추가로 입증하였다. 새로운 표적에 대한 치료 (Treating to New Target) (TNT) 연구의 사후 분석에서, HDL-콜레스테롤은 스타틴으로 치료되는 환자에서, 심지어 그의 LDL-콜레스테롤이 70 mg/dl 미만인 환자에서 주요 심혈관 사건의 예측인자였다.

[0011] 최근의 임상 시험에서, 니아신 및 2가지 CETP-억제제 (토르세트라립 (Torcetrapib) (화이자 (Pfizer)) 및 달세트라립 (Dalcetrapib) (로슈 (Roche)))는, 이들 연구의 일부는 일부 교란 인자를 겪을 수 있지만, 장기간 치료에 걸쳐 관상동맥 사건의 발생을 감소시키는데 실패하였다 (Boden *et al.*, 2011, *N Engl J Med* 365:2255-2267; HPS2-THRIVE Collaborative Group, 2013, *Eur. Heart J.* 34:1279-1291; Barter *et al.*, 2007, *N Engl J Med* 357:2109-2122; Schwartz *et al.*, 2012, *N. Engl. J. Med.* 367:2089-2099). 2가지 멘델 유전학 연구는 HDL-콜레스테롤과 심혈관 질환의 위험 사이의 관련을 질문하였다 (Voight *et al.*, *Lancet* DOI:10.1016/S0140-6736(12)60312-2, 2012년 5월 17일에 온라인으로 공개됨; Holmes *et al.*, *Eur Heart J* doi:10.1093/eurheartj/ehf571, 2014년 1월 27일에 온라인으로 공개됨). 이들 연구는 HDL 콜레스테롤 (HDL-

c)의 상승이라기 보다는 기능적 HDL 입자의 수 및 역 지질 수송의 향상이 심혈관 사건의 예방을 위한 중요한 인자라는 발상을 추가로 강조한다 (Barter *et al.*, 2007, N Engl J Med 357:2109-22; Group *et al.*, 2010, N Engl J Med 362:1563-74; Nissen *et al.*, 2007, The New England journal of medicine 356:1304-16). 사실, 5,000명 초과환자의 MESA 임상 시험에서, CHD 및 심혈관 사건의 발생과 상관되는 가장 양호한 인자는 HDL 분획 (즉, HDL-c)의 콜레스테롤 함량이라기 보다는 HDL 입자 수였다 (Mackey *et al.*, 2012, Journal of the American College of Cardiology 60:508-16; van der Steeg *et al.*, 2008, Journal of the American College of Cardiology 51:634-42). 효력있는 스타틴 요법의 환경에서, HDL 입자 수는 화학적으로-측정된 HDL-콜레스테롤 또는 ApoA-I보다 잔류의 위험의 보다 양호한 마커일 수 있다 (Mora *et al.*, 2013, Circulation DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002671).

[0012] **3.2. 역 지질 수송, HDL 및 아포지단백질 A-I**

[0013] HDL 입자의 보호적 기능은 역 콜레스테롤 수송 (RCT) 경로로도 공지된 역 지질 수송 (RLT) 경로에서의 그의 역할에 의해 설명될 수 있다. RLT (Tall, 1998, Eur Heart J 19:A31-5) 경로는 동맥으로부터의 콜레스테롤의 제거 및 신체로부터의 제거를 위한 간으로의 그의 수송을 주로 4가지 기초적 단계로 담당한다.

[0014] 첫번째 단계는 "콜레스테롤 제거"로 지칭되는 과정에서의 발생기 HDL 입자에 의한 동맥으로부터의 콜레스테롤의 제거이다. 콜레스테롤은 소포성 트래피킹 및 신호 전달의 조절에 있어서 중요한 구조적 도메인을 유지하는 막 구성요소이다. 대부분의 세포에서, 콜레스테롤은 이화되지 않는다. 따라서, 세포 스테롤 유출의 조절은 세포 스테롤 항상성에 있어서 중대한 역할을 한다. 세포 스테롤은 비-조절된 수동 확산 메커니즘 뿐만 아니라, 수용체, 예컨대 ABCA1 및 ABCG1 수송체에 의해 매개되는 능동적인 조절된 에너지-의존성 과정 둘 다에 의해 세포의 스테롤 수용체로 유출될 수 있다.

[0015] RCT에서 핵심적 효소인 LCAT는 장 및 간에 의해 생성되며, 혈장에서 주로 HDL 분획과 회합되어 순환한다. LCAT는 세포-유래된 콜레스테롤을 콜레스테릴 에스테르로 전환시키며, 이는 제거될 예정인 HDL에서 격리된다 (문헌 [Jonas 2000, Biochim. Biophys. Acta 1529(1-3):245-56] 참조). 콜레스테릴 에스테르 전달 단백질 (CETP) 및 인지질 전달 단백질 (PLTP)은 순환 HDL 집단의 추가의 재형성에 기여한다. CETP는 LCAT에 의해 만들어진 콜레스테릴 에스테르를 다른 지단백질, 특히 ApoB-포함 지단백질, 예컨대 VLDL 및 LDL로 이동시킨다. PLTP는 레시틴을 HDL에 공급한다. HDL 트리글리세리드는 세포의 간 트리글리세리드 리파제에 의해 이화되며, 지단백질 콜레스테롤은 몇몇 메커니즘을 통해 간에 의해 제거된다.

[0016] HDL 입자의 기능적 특징은 주로 그의 주요 아포지단백질 성분, 예컨대 ApoA-I 및 ApoA-II에 의해 결정된다. 소량의 ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoA-IV, ApoE, 및 ApoJ는 또한 HDL과 연관되어 관찰되었다. HDL은 대사성 RCT 캐스캐이드 또는 경로 동안의 재형성의 상태에 따라 폭넓게 다양한 상이한 크기 및 상이-언급된 구성요소의 상이한 혼합물로 존재한다.

[0017] 각각의 HDL 입자는 통상적으로 ApoA-I의 적어도 하나의 분자, 및 통상적으로 2 내지 4개의 분자를 포함한다. HDL 입자는 또한 게르트 아스만 교수 (Prof. Gerd Assmann)에 의해 기재된 바와 같이, 또한 콜레스테롤 유출을 담당하는 것으로 공지된 ApoE (감마-LpE 입자) 만을 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [von Eckardstein *et al.*, 1994, Curr Opin Lipidol. 5(6):404-16] 참조). ApoA-I은 간 및 소장내에 의해 프리프로아포지단백질 A-I로서 합성되며, 이는 프로아포지단백질 A-I (프로ApoA-I)로서 분비되고, 용이하게 절단되어 243 아미노산의 단일 폴리펩티드체인 ApoA-I의 혈장 형태를 생성한다 (Brewer *et al.*, 1978, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:623-30). 실험적으로 직접 혈류 내로 주사된 프리프로ApoA-I은 또한 ApoA-I의 혈장 형태로 절단된다 (Klon *et al.*, 2000, Biophys. J. 79(3):1679-85; Segrest *et al.*, 2000, Curr. Opin. Lipidol. 11(2):105-15; Segrest *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 274 (45):31755-58).

[0018] ApoA-I은 흔히 프롤린인 링커 모이어티에 의해 이격된 6 내지 8개의 상이한 22-아미노산 알파-나선 또는 기능적 반복체를 포함한다. 반복 단위는 양친매성 나선 형태로 존재하며 (Segrest *et al.*, 1974, FEBS Lett. 38: 247-53), ApoA-I의 주요한 생물학적 활성, 즉, 지질 결합 및 레시틴 콜레스테롤 아실 트랜스페라제 (LCAT) 활성화를 제공한다.

[0019] ApoA-I은 3가지 유형의 지질과의 안정한 복합체를 형성한다: 프리-베타-1 HDL로 지칭되는 작은 지질-부족 복합체; 프리-베타-2 HDL로 지칭되는 극성 지질 (인지질 및 콜레스테롤)을 포함하는 납작한 원반형 입자; 및 구형 또는 성숙 HDL로 지칭되는 극성 및 비극성 지질 둘 다를 포함하는 구형 입자 (HDL₃ 및 HDL₂). 순환 집단에서의 대부분의 HDL은 ApoA-I 및 ApoA-II 둘 다를 포함한다 ("AI/AII-HDL 분획"). 그러나, ApoA-I만을 포함하는 HDL

의 분획 ("AI-HDL 분획")은 RCT에서 보다 효과적인 것으로 보인다. 특정 역학적 연구는 ApoA-I-HDL 분획이 항-아테롬형성성이라는 가설을 뒷받침한다 (Parra *et al.*, 1992, *Arterioscler. Thromb.* 12:701-07; Decossin *et al.*, 1997, *Eur. J. Clin. Invest.* 27:299-307).

[0020] HDL 입자는 상이한 크기, 지질 조성 및 아포지단백질 조성을 갖는 입자의 몇몇 집단으로 이루어진다. 이는 그 수화 밀도, 아포지단백질 조성 및 전하 특징을 비롯한 그의 특성에 따라 분리될 수 있다. 예를 들어, 프리-베타-HDL 분획은 성숙 알파-HDL보다 낮은 표면 전하를 특징으로 한다. 이 전하 차이 때문에, 프리-베타-HDL 및 성숙 알파-HDL은 아가로스 겔에서 상이한 전기영동 이동도를 갖는다 (David *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269(12):8959-8965).

[0021] 프리-베타-HDL 및 성숙 알파-HDL의 대사는 또한 상이하다. 프리-베타-HDL은 2가지 대사 운명을 갖는다: 혈장으로부터의 제거 및 신장에 의한 이화, 또는 간에 의해 우선적으로 분해되는 중간-크기 HDL로의 재형성 (Lee *et al.*, 2004, *J. Lipid Res.* 45(4):716-728).

[0022] 세포 표면으로부터의 콜레스테롤 전달 (즉, 콜레스테롤 유출)에 대한 메커니즘은 알려져 있지 않지만, 지질-부족 복합체인 프리-베타-1 HDL은 RCT에 관여하는 말초 조직으로부터 전달되는 콜레스테롤에 대한 바람직한 수용체인 것으로 믿어진다 (문헌 [Davidson *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269:22975-82]; [Bieliński *et al.*, 1992, *J. Lipid Res.* 33:1699-1709]; [Rothblat *et al.*, 1992, *J. Lipid Res.* 33:1091-97]; 및 [Kawano *et al.*, 1993, *Biochemistry* 32:5025-28]; [Kawano *et al.*, 1997, *Biochemistry* 36:9816-25] 참조). 이 세포 표면으로부터의 콜레스테롤 보충의 과정 동안, 프리-베타-1 HDL은 프리-베타-2 HDL로 급속하게 전환된다. PLTP는 프리-베타-2 HDL 원반 형성의 속도를 증가시킬 수 있지만, RCT에서의 PLTP에 대한 역할을 지시하는 데이터는 결여되어 있다. LCAT는 우선적으로 원반형의 작은 (프리-베타) 및 구형 (즉, 성숙) HDL과 반응하여, 레시틴 또는 다른 인지질의 2-아실 기를 콜레스테롤의 유리 히드록실 잔기로 전달하여 콜레스테릴 에스테르 (HDL에 보유됨) 및 리소레시틴을 생성한다. LCAT 반응은 활성화제로서 ApoA-I을 요구하며; 즉, ApoA-I은 LCAT을 위한 천연 보조인자이다. HDL에서 격리된 콜레스테롤의 그의 에스테르로의 전환은 세포 내로의 콜레스테롤의 재-유입을 방지하며, 최종 결과는 콜레스테롤이 세포의 구매에 따라 세포로부터 제거되고, HDL이 유지되는 것이다.

[0023] ApoA-I-HDL 분획 (즉, ApoA-I을 포함하고 ApoA-II를 포함하지 않음)에서의 성숙 HDL 입자 중의 콜레스테릴 에스테르는 간에 의해 제거되며, ApoA-I 및 ApoA-II 둘 다를 포함하는 HDL (AI/AII-HDL 분획)로부터 유래된 것들보다 효과적으로 담즙으로 프로세싱된다. 이는 부분적으로 간세포 막에의 ApoA-I-HDL의 보다 효과적인 결합 때문일 수 있다. HDL 수용체의 존재가 가설화되었으며, 스캐빈저 수용체, 부류 B, 유형 I (SR-BI)은 HDL 수용체로서 확인되었다 (Acton *et al.*, 1996, *Science* 271:518-20; Xu *et al.*, 1997, *Lipid Res.* 38:1289-98). SR-BI은 스테로이드생성 조직 (예를 들어, 부신에서), 및 간에서 가장 풍부하게 발현된다 (Landschulz *et al.*, 1996, *J. Clin. Invest.* 98:984-95; Rigotti *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271:33545-49). HDL 수용체의 검토를 위해서는, 문헌 [Broutin *et al.*, 1988, *Anal. Biol. Chem.* 46:16-23]을 참조한다.

[0024] ATP-결합 카세트 수송체 AI (ABCA1)에 의한 초기 지질화는 혈장 HDL 형성, 및 콜레스테롤 유출을 수행하는 프리-베타-HDL 입자의 능력에 중요한 것으로 보인다 (Lee and Parks, 2005, *Curr. Opin. Lipidol.* 16(1):19-25). 이들 저자들에 따르면, 이 초기 지질화는 프리-베타-HDL이 콜레스테롤 수용체로서 보다 효과적으로 기능하는 것을 가능하게 하며, ApoA-I이 기존의 혈장 HDL 입자와 급속하게 회합하는 것을 방지하여, 콜레스테롤 유출에 대한 프리-베타-HDL 입자의 보다 큰 가용성을 초래한다.

[0025] ABCA1 결핍은 가족성 원발성 저알파지단백혈증의 근원적인 원인 중 하나이다. 가족성 원발성 저알파지단백혈증은 HDL 합성/성숙을 담당하는 유전자 중 하나, 예컨대 ABCA1의 유전적 결함에 의해 유발되며, 또한 아포지단백질 A-I (ApoA-I)의 매우 낮은 혈장 농도에서 반영되는 고-밀도 지단백질 (HDL)-입자의 매우 적은 수와 연관된다. 질환은 또한 일반적으로 낮은 HDL-콜레스테롤 (HDL-C) 또는 조기 심혈관 질환의 양성 가족력과 연관된다.

[0026] 탄지예르병으로도 지칭되는 동형접합성 ABCA1 결핍은 중증 혈장 결핍 또는 HDL, 아포지단백질 A-I (ApoA-I)의 부재, 및 신체 전반에 걸쳐 조직에서의 콜레스테릴 에스테르의 축적을 특징으로 한다 (Puntoni *et al.*, 2012). 탄지예르병을 갖는 대상체는 큰 황색-오렌지색 편도 및/또는 신경병증과 함께 나타난다. 다른 임상적 특징으로는 간비대, 비장비대, 조기 심근 경색 또는 뇌졸중, 혈소판감소증, 빈혈, 및 각막 혼탁을 들 수 있다.

[0027] 최근, 제2 ATP-결합 카세트 수송체 G1 (ABCG1)은 세포내 콜레스테롤 항상성을 매개하는 것으로 기재되었다. ABCG1의 발현은 우세하게 구형의 콜레스테롤-함유 중간-내지 매우 큰-HDL 입자, 뿐만 아니라 큰 원반형 HDL 입

자와의 상호작용을 통해 콜레스테롤 유출을 향상시킨다. 보다 큰 입자는 ABCG1로부터의 수용체로서 보다 작은 HDL 입자와 유사하게 효과적이다.

- [0028] ATP-결합 카세트 수송체 ABCA1 및 ABCG1은 ABCA1 및 ABCG1 수송체 둘 다에 의한 콜레스테롤 유출을 조정하는데 있어서 증추적 역할을 하는 간 X 수용체 전사 인자에 의해 증가된다 (Costet *et al.*, 2000, J Biol Chem 275:28240-5; Kennedy *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:39438-47). 생체내에서, 간 X 수용체는 콜레스테롤-적하된 세포에서 특정 옥시스테롤에 의해 활성화되며, ABCA1 및 ABCG1은 대식세포에서 간 X 수용체의 핵심적 표적 유전자이다 (Janowski *et al.*, 1996, Nature 383:728-31). ABCA1은 콜레스테롤-결핍성 및 인지질-고갈된 ApoA-I 및 apoE 복합체로의 콜레스테롤 유출을 촉진시키지만, ABCG1은 HDL 입자로의 유출을 촉진시킨다 (Duong *et al.*, 2006, Journal of lipid research 47:832-43; Mulya *et al.*, 2007, Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 27:1828-36; Wang *et al.*, 2004, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:9774-9). ABCA1 및 ABCG1 수송체의 증가된 발현은 혈장 막의 내부로부터 외부 침판으로의 콜레스테롤의 재분포와 연관되며, 이는 콜레스테롤-적하된 발포체 세포로부터 HDL 입자로의 콜레스테롤 유출을 용이하게 한다 (Pagler *et al.*, 2011, Circulation research 108:194-200). 대식세포 콜레스테롤 유출을 매개하는데 있어서 ABCA1 및 ABCG1의 협조된 참여는 동물 연구로부터 입증되었다. 마우스에서의 ABCA1의 단일 결핍은 아테롬성동맥경화증의 중증도 증가를 초래하며, ABCG1의 결핍은 효과를 갖지 않지만; 조합된 결핍은 현저하게 가속화된 병변 발달을 초래하였다 (Yvan-Charvet *et al.*, 2007, The Journal of clinical investigation 117:3900-8). 이중-넉아웃 대식세포는 지질다당류로 처리될 경우 HDL 및 ApoA-I로의 현저하게 결함성 콜레스테롤 유출 및 증가된 염증 반응을 나타내었다 (Yvan-Charvet *et al.*, 2008, Circulation 118:1837-47).
- [0029] 콜레스테롤 항상성은 또한 최근 생리학적 과정에 관여하는 유전자의 전사후 조절자인 작은 내인성 비-단백질-코딩 RNA인 마이크로RNA (miRNA)로 조사되었다 (Rayner *et al.*, 2010, Science (New York, N.Y.) 328:1570-3; Najafi-Shoushtari *et al.*, 2010, Science (New York, N.Y.) 328:1566-9; Marquart *et al.*, 2010, PNAS). 스테롤-조절 요소 결합 인자-2를 코딩하는 유전자 내에 위치하는 인트론성 miRNA인 MiR-33은 ABCA1 및 ABCG1 둘 다의 간 발현을 억제하여, HDL-C 농도를 감소시킬 뿐만 아니라 (Yvan-Charvet *et al.*, 2008, Circulation 118:1837-47; Marquart *et al.*, 2010, PNAS), 대식세포에서의 ABCA1 발현을 억제하며, 따라서 감소된 콜레스테롤 유출을 초래한다 (Yvan-Charvet *et al.*, 2008, Circulation 118:1837-47). 올리고뉴클레오타이드에 의한 MiR-33의 길항작용은 마우스 모델에서 HDL-C를 상승시키고, 아테롬성동맥경화증을 감소시켰다 (Rayner *et al.*, 2011, The Journal of Clinical Investigation 121:2921-31).
- [0030] ABCA1 뿐만 아니라 ABCG1은 세포 콜레스테롤 함량에 의해 고도로 조절된다. 세포 지질 과다-적하는 옥시스테롤의 형성을 초래하며, 이는 핵 간 X 수용체 (LXR)를 활성화하여 ABCA1 및 ABCG1의 전사, 및 따라서 콜레스테롤 유출을 유도한다 (Jakobsson *et al.*, 2012, Trends in pharmacological sciences 33:394-404). 따라서, 콜레스테롤 유출은 세포-외 농도 및 HDL 입자의 조성, 및 ABC 수송체의 활성 둘 다에 의해 결정된다.
- [0031] 흥미롭게도, ABCA1 발현은 이미 적하된 HDL 입자의 세포 매질 중의 존재에 의해 하향-조절된 것으로 보인다 (Langmann *et al.*, 1999, Biochemical and biophysical research communications 257:29-33).
- [0032] 세포 콜레스테롤 항상성의 핵심적 조절자로서의 콜레스테롤 유출은 많은 세포 기능, 예컨대 조혈 줄기 세포의 증식 및 동원에 대한 중요한 조절 단계를 발휘한다 (Tall *et al.*, 2012, Arterioscler Thromb Vasc Biol 32:2547-52).
- [0033] ATP-결합 카세트 수송체 G4 (ABCG4)는 HDL로의 콜레스테롤 유출을 매개하여 거대핵세포 증식을 초래한다 (Murphy *et al.*, 2013, Nature medicine 19:586-94).
- [0034] 콜레스테롤 유출은 단핵구 및 대식세포에 대한 염증성 반응 (Westerterp *et al.*, 2013, Circulation research 112:1456-65), 림프구의 팽창 (Sorci-Thomas *et al.*, 2012, Arterioscler Thromb Vasc Biol 32:2561-5), 내피-산화질소 신타제 (eNOS)에 의한 산화질소 (NO) 생성 (Terasaka *et al.*, 2010, Arterioscler Thromb Vasc Biol 30:2219-25) 및 체장 β -세포로부터의 인슐린 생성 (Kruit *et al.*, 2012, Diabetes 61:659-64)을 조절한다.
- [0035] CETP는 또한 RCT에서 역할을 할 수 있다. CETP 활성 또는 그의 수용체, VLDL 및 LDL의 변화는 HDL 집단의 "재형성"에 있어서 역할을 한다. 예를 들어, CETP의 부재 하에서, HDL은 청소되지 않는 확대된 입자가 된다 (RCT 및 HDL의 검토를 위해서는, 문헌 [Fielding and Fielding, 1995, J. Lipid Res. 36:211-28]; [Barrans *et al.*, 1996, Biochem. Biophys. Acta 1300:73-85]; [Hirano *et al.*, 1997, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.

17(6):1053-59]을 참조한다).

- [0036] HDL은 또한 다른 지질 및 무극성 분자의 역 수송, 및 해독, 즉, 이화작용 및 배설을 위한 세포, 기관, 및 조직 으로부터 간으로의 지질의 수송에 있어서 역할을 한다. 이러한 지질로는 스핑고미엘린 (SM), 산화된 지질, 및 리소포스파티딜콜린을 들 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Robins and Fasulo (1997, J. Clin. Invest. 99:380-84)]은 HDL이 담즙 분비물 내로의 간에 의한 식물 스테롤의 수송을 자극함을 보여주었다.
- [0037] HDL의 주요 성분인 ApoA-I은 시험관내에서 SM과 회합할 수 있다. ApoA-I이 시험관내에서 소 뇌 SM (BBSM)과 재 구성되는 경우, 재구성의 최대 속도는 BBSM에 대한 상 전이 온도에 근접하는 온도인 28℃에서 일어난다 (Swaney, 1983, J. Biol. Chem. 258(2), 1254-59). 7.5:1 이하 (wt/wt)의 BBSM:ApoA-I 비에서, 입자 당 3개의 ApoA-I 분자를 포함하며, 360:1의 BBSM:ApoA-I 몰 비를 갖는 단일 재구성된 균질한 HDL 입자가 형성된다. 이는 전자 현미경에서 인지질/단백질의 상승된 비로 포스파티딜콜린과 ApoA-I의 재조합에 의해 얻어지는 것과 유사한 원반형 복합체로 보인다. 그러나, 15:1 (wt/wt)의 BBSM:ApoA-I 비에서, 보다 높은 인지질:단백질 몰 비 (535:1)를 갖는 보다 큰-직경 원반형 복합체가 형성된다. 이들 복합체는 포스파티딜콜린으로 형성된 ApoA-I 복합체보다 유의하게 보다 크고, 보다 안정하고, 변성에 대해 보다 저항성이다.
- [0038] 스핑고미엘린 (SM)은 초기 콜레스테롤 수용체 (프리-베타-HDL 및 감마-이동 ApoE-포함 지단백질)에서 상승되며, 이는 SM이 콜레스테롤 유출을 촉진시키는 이들 입자의 능력을 향상시킬 수 있음을 암시한다 (Dass and Jessup, 2000, J. Pharm. Pharmacol. 52:731-61; Huang *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1834-38; Fielding and Fielding 1995, J. Lipid Res. 36:211-28).
- [0039] **3.3.HDL 및 ApoA-I의 보호적 메커니즘**
- [0040] HDL의 보호적 메커니즘(들)의 연구는 HDL의 주요 성분인 아포지단백질 A-I (ApoA-I)에 집중되었다. ApoA-I의 높은 혈장 수준은 관상동맥 병변의 부재 또는 감소와 연관된다 (Maciejko *et al.*, 1983, N. Engl. J. Med. 309:385-89; Sedlis *et al.*, 1986, Circulation 73:978-84).
- [0041] 실험 동물에서의 ApoA-I의 또는 HDL의 주입은 유의한 생화학적 변화를 발휘할 뿐만 아니라, 아테롬성동맥경화 병변의 정도 및 중증도를 감소시킨다. 마시에지코 (Maciejko) 및 마오 (Mao) (1982, Arteriosclerosis 2:407a)에 의한 초기 보고 후, 바디몬 (Badimon) 등 (1989, Lab. Invest. 60:455-61; 1989, J. Clin. Invest. 85:1234-41)은 이들이 HDL (d=1.063 내지 1.325 g/ml)을 주입함으로써 콜레스테롤-공급된 토끼에서 아테롬성동맥경화 병변의 정도 (45%의 감소) 및 그의 콜레스테롤 에스테르 함량 (58.5%의 감소)을 유의하게 감소시킬 수 있음을 밝혀내었다. 이들은 또한 HDL의 주입이 확립된 병변의 50%에 가까운 퇴행을 초래함을 밝혀내었다. 문헌 (Esper *et al.* 1987, Arteriosclerosis 7:523a)은 HDL의 주입이 초기 동맥 병변으로 발달하는 유전된 고콜레스테롤혈증을 갖는 와타나베 (Watanabe) 토끼의 혈장 지단백질 조성을 현저하게 변화시킬 수 있음을 보여주었다. 이들 토끼에서, HDL 주입은 보호적 HDL 및 아테롬형성 LDL 사이의 비를 2배 초과로 만들 수 있다. 최근, 재조합 인간 아포지단백질 A-I 조작된 프리-β HDL인 CER-001의 몇몇 주입은 가족성 고콜레스테롤혈증의 전임상 모델인 LDL 수용체 녹-아웃 마우스에서 혈관 염증을 감소시키고, 식이-유도된 아테롬성동맥경화증의 퇴행을 촉진시킬 수 있었다 (HDLTardy *et al.*, Atherosclerosis 232 (2014) 110-118).
- [0042] 동물 모델에서 동맥 질환을 예방하는 HDL의 잠재성은 ApoA-I이 시험관내에서 섬유소용해 활성을 발휘할 수 있다는 관찰에 의해 더욱 강조되었다 (Saku *et al.*, 1985, Thromb. Res. 39:1-8). 론네버거 (Ronneberger) (1987, Xth Int. Congr. Pharmacol., Sydney, 990)는 ApoA-I이 비글 견에서 및 시노물구스 (Cynomologous) 원숭이에서 섬유소용해를 증가시킬 수 있음을 입증하였다. 유사한 활성이 시험관 내에서 인간 혈장에 대해 주목될 수 있다. 론네버거는 ApoA-I 처리된 동물에서 지질 침착 및 동맥 플라크 형성의 감소를 확인할 수 있었다.
- [0043] 시험관내 연구는 ApoA-I 및 레시틴의 복합체가 배양된 동맥 평활근 세포로부터의 유리 콜레스테롤의 유출을 촉진시킬 수 있음을 지시한다 (Stein *et al.*, 1975, Biochem. Biophys. Acta, 380:106-18). 이 메커니즘에 의해, HDL은 또한 이들 세포의 증식을 감소시킬 수 있다 (Yoshida *et al.*, 1984, Exp. Mol Pathol. 41:258-66).
- [0044] ApoA-I 또는 ApoA-I 모방체 펩티드를 포함하는 HDL을 사용한 주입 요법은 또한 ABCA1 수송체에 의해 혈장 HDL 수준을 조절하여, 심혈관 질환의 치료에서 효능을 초래하는 것으로 나타났다 (예를 들어, 문헌 [Brewer *et al.*, 2004, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24:1755-1760] 참조).
- [0045] 아르기닌 잔기가 시스테인으로 치환된 ApoA-I의 2가지 천연 발생 인간 다형성이 단리되었다. 아포지단백질 A-I

밀라노 (ApoA-I_M)에서, 이 치환은 잔기 173에서 일어나는 반면, 아포지단백질 A-I_{파리} (ApoA-I_P)에서, 이 치환은 잔기 151에서 일어난다 (Franceschini *et al.*, 1980, J. Clin. Invest. 66:892-900; Weisgraber *et al.*, 1983, J. Biol. Chem. 258:2508-13; Bruckert *et al.*, 1997, Atherosclerosis 128:121-28; Daum *et al.*, 1999, J. Mol. Med. 77:614-22; Klon *et al.*, 2000, Biophys. J. 79(3):1679-85). 위치 144에서 류신이 아르기닌으로 치환된 ApoA-I의 더 추가의 천연 발생 인간 다형성이 단리되었다. 이 다형성은 아포지단백질 A-I 사라고사 (ApoA-I_Z)로 지칭되었으며, 중증 저알파지질단백혈증 및 고밀도 지단백질 (HDL) 역 콜레스테롤 수송의 향상된 효과와 연관된다 (Recalde *et al.*, 2001, Atherosclerosis 154(3):613-623; Fiddymet *et al.*, 2011, Protein Expr. Purif. 80(1):110-116).

[0046] ApoA-I_M 또는 ApoA-I_P 중 하나의 디술피드-연결된 동종이량체를 포함하는 재구성된 HDL 입자는 디미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC) 에멀전을 청소하는 그의 능력 및 콜레스테롤 유출을 촉진시키는 그의 능력에 있어서 야생형 ApoA-I을 포함하는 재구성된 HDL 입자와 유사하다 (Calabresi *et al.*, 1997b, Biochemistry 36:12428-33; Franceschini *et al.*, 1999, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19:1257-62; Daum *et al.*, 1999, J. Mol. Med. 77:614-22). 둘 다의 돌연변이에서, 이형접합성 개체는 HDL의 수준을 감소시켰지만, 역설적으로, 아테롬성동맥경화증에 대한 감소된 위험이 있다 (Franceschini *et al.*, 1980, J. Clin. Invest. 66:892-900; Weisgraber *et al.*, 1983, J. Biol. Chem. 258:2508-13; Bruckert *et al.*, 1997, Atherosclerosis 128:121-28). 어느 하나의 변이체를 포함하는 재구성된 HDL 입자는 LCAT 활성화가 가능하지만, 야생형 ApoA-I을 포함하는 재구성된 HDL 입자와 비교할 경우 감소된 효능을 갖는다 (Calabresi *et al.*, 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 232:345-49; Daum *et al.*, 1999, J. Mol. Med. 77:614-22).

[0047] ApoA-I_M 돌연변이는 상염색체 우성 형질로서 전달되며; 패밀리 내에 8 세대의 운반체가 확인되었다 (Gualandri *et al.*, 1984, Am. J. Hum. Genet. 37:1083-97). ApoA-I_M 운반체 개체의 상태는 HDL-콜레스테롤 수준의 현저한 감소를 특징으로 한다. 이에도 불구하고, 운반체 개체는 명백하게 동맥 질환의 임의의 증가된 위험을 나타내지는 않는다. 사실, 계통적 기록의 조사에 의해, 이들 대상체는 아테롬성동맥경화증으로부터 "보호될" 수 있는 것으로 보인다 (Sirtori *et al.*, 2001, Circulation, 103: 1949-1954; Roma *et al.*, 1993, J. Clin. Invest. 91(4):1445-520).

[0048] 돌연변이의 운반체에서의 ApoA-I_M의 가능한 보호적 효과의 메커니즘은 하나의 알파-나선의 소실 및 소수성 잔기의 증가된 노출을 갖는 돌연변이 ApoA-I_M의 구조의 변형과 관련되는 것으로 보인다 (Franceschini *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260:1632-35). 다중 알파-나선의 밀집한 구조의 소실은 분자의 증가된 가요성을 초래하며, 이는 정상적인 ApoA-I에 비해 지질과 보다 용이하게 회합한다. 더욱이, 지단백질 복합체는 변성에 보다 감수성이며, 따라서, 이는 지질 전달이 또한 돌연변이체의 경우 개선됨을 암시한다.

[0049] 비엘리키 (Bielicki) 등 (1997, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17 (9):1637-43)은 ApoA-I_M이 야생형 ApoA-I에 비해 막 콜레스테롤을 보충하는 제한된 능력을 가짐을 입증하였다. 또한, 막 지질과 ApoA-I_M의 회합에 의해 형성된 발생기 HDL은 야생형 ApoA-I에 의해 형성된 보다 큰 9- 및 11-nm 복합체라기 보다는 우세하게 7.4-nm 입자였다. 이들 관찰은 ApoA-I 1차 서열에서의 Arg₁₇₃→Cys₁₇₃ 치환이 세포 콜레스테롤 보충 및 발생기 HDL 어셈블리의 정상적인 과정을 방해하였음을 지시한다. 돌연변이는 명백하게 세포로부터의 콜레스테롤 제거에 대한 감소된 효능과 연관된다. 따라서, 그의 항아테롬형성 특성은 RCT와 비관련될 수 있다. 이는 또한 HDL의 작은 입자로의 성숙을 제한하는 그의 능력으로 인한 것일 수 있다.

[0050] Arg₁₇₃→Cys₁₇₃ 치환에 기인한 가장 놀라운 구조적 변화는 ApoA-I_M의 이량체화이다 (Bielicki *et al.*, 1997, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17 (9):1637-43). ApoA-I_M은 그 자신과 동종이량체 및 ApoA-II와 이종이량체를 형성할 수 있다. 아포지단백질의 혼합물을 포함하는 혈액 분획의 연구는 순환에서의 이량체 및 복합체의 존재가 이포지단백질의 증가된 제거 반감기의 원인이 될 수 있음을 지시한다. 이러한 증가된 제거 반감기는 돌연변이의 운반체의 임상 연구에서 관찰되었다 (Gregg *et al.*, 1988, NATO ARW on Human Apolipoprotein Mutants: From Gene Structure to Phenotypic Expression, Limone S G). 다른 연구는 ApoA-I_M 이량체 (ApoA-I_M / ApoA-I_M)가 시험관내에서 HDL 입자의 상호전환에 있어서 억제 인자로서 작용할 수 있음을 지시한다 (Franceschini *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265:12224-31).

[0051] 3.4. 이상지질혈증 및 관련된 장애에 대한 현재의 치료

[0052] 이상지질혈증 장애는 상승된 혈청 콜레스테롤 및 트리글리세리드 수준 및 저하된 혈청 HDL:LDL 비와 연관된 질환이며, 고지질혈증, 특히 고콜레스테롤혈증, 관상동맥 심장 질환, 관상 동맥 질환, 혈관 및 혈관주위 질환, 및 심혈관 질환, 예컨대 아테롬성동맥경화증을 들 수 있다. 아테롬성동맥경화증과 연관된 증후군, 예컨대 동맥 부전에 의해 유발되는 일과성 허혈 발작 또는 간헐 파행이 또한 포함된다. 다수의 치료가 이상지질혈증 장애와 연관된 상승된 혈청 콜레스테롤 및 트리글리세리드를 저하시키기 위해 현재 이용가능하다. 그러나, 각각은 효능, 부작용 및 환자 집단의 정성화의 관점에서 그 자신의 단점 및 제한을 갖는다. 일부 이상지질혈증 장애는 HDL 합성, 성숙 또는 제거를 담당하는 유전자에서의 돌연변이로 인한 HDL 결핍, 예컨대 탄지에르병, ABCA1 결핍, ApoA-I 결핍, LCAT 결핍 또는 어안 질환 (그러나 이에 제한되지 않음)과 연관된다. 이들 장애는 가족성 원발성 저알파지질단백혈증 (FPHA)의 용어 하에 재그룹화될 수 있다.

[0053] 담즙-산-결합 수지는 장으로부터 간으로의 담즙산의 재생을 방해하는 약물의 부류; 예를 들어, 콜레스티라민 (퀘스트란 라이트 (Questran Light)®, 브리스톨-마이어스 스кви브 (Bristol-Myers Squibb)), 콜레스티폴 히드로클로라이드 (콜레스티드 (Colestid)®, 디 업존 컴퍼니 (The Upjohn Company)), 및 콜레세벨람 히드로클로라이드 (웰콜 (Welchol)®, 다이이찌-산교 컴퍼니 (Daiichi-Sankyo Company))이다. 경구로 복용될 경우, 이들 양으로-하전된 수지는 장에서 음으로 하전된 담즙산에 결합한다. 수지는 장으로부터 흡수될 수 없기 때문에, 이들은 그들과 함께 담즙산을 운반하여 배설된다. 그러나, 기껏해야 이러한 수지의 사용은 단지 혈청 콜레스테롤 수준을 약 20% 저하시키며, 변비 및 특정 비타민 결핍을 비롯한 위장관 부작용과 연관된다. 더욱이, 수지는 다른 약물에 결합하기 때문에, 다른 경구 의약품 수지의 섭취 적어도 1시간 전 또는 4 내지 6시간 후에 복용되어야 하며; 따라서, 심장 환자의 약물 처방을 복잡하게 한다.

[0054] 스타틴은 콜레스테롤 생합성 경로에 관여하는 핵심적 효소인 HMGCoA 리덕타제를 억제함으로써 콜레스테롤 합성을 차단하는 콜레스테롤 저해제이다. 스타틴, 예를 들어, 로바스타틴 (메바코르 (Mevacor)®), 심바스타틴 (조코르 (Zocor)®), 프라바스타틴 (프라바콜 (Pravachol)®), 플루바스타틴 (레스콜 (Lescol)®), 피타바스타틴 (리발로 (Livalo)®) 및 아토르바스타틴 (리피토르 (Lipitor)®)은 때때로 담즙-산-결합 수지와 조합으로 사용된다. 스타틴은 혈청 콜레스테롤 및 LDL-혈청 수준을 유의하게 감소시키며, 관상동맥 아테롬성동맥경화증의 진행을 감속시킨다. 그러나, 혈청 HDL 콜레스테롤 수준은 단지 중간 정도로 증가된다. LDL 저하 효과의 메커니즘은 LDL의 감소된 생산 및/또는 증가된 이화작용을 초래하는 VLDL 농도의 감소 및 LDL-수용체의 세포 발현의 유도 둘 다를 포함할 수 있다. 간 및 신장 기능 이상을 비롯한 부작용은 이들 약물의 사용과 연관된다 (The Physicians Desk Reference, 56th Ed., 2002, Medical Economics).

[0055] 니아신 (니코틴산)은 식이 보충제 및 항고지질혈증제로서 사용되는 수 용해성 비타민 B-복합체이다. 니아신은 VLDL의 생성을 감소시키며, LDL의 저하에 효과적이다. 일부의 경우, 이는 담즙-산 결합 수지와 조합으로 사용된다. 니아신은 적당한 용량으로 사용되는 경우 HDL을 증가시킬 수 있지만, 그의 유용성은 너무 높은 용량으로 사용되는 경우 심각한 부작용에 의해 제한된다. 니아스판 (Niaspan)®은 순수한 니아신보다 적은 부작용을 생성하는 확장-방출 니아신의 형태이다. 니아신/로바스타틴 (니코스타틴 (Nicostatin)®)은 니아신 및 로바스타틴 둘 다를 함유하는 제제이며, 각각의 약물의 유익을 조합한다. ARBITER 6-HALTS (콜레스테롤 6의 감소의 치료 효과의 조사를 위한 동맥 생물학-아테롬성동맥경화증에서의 HDL 및 LDL 치료 전략 (Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol 6-HDL and LDL Treatment Strategies in Atherosclerosis)) 시험은 니아신이 지질 프로파일을 바람직하게 변형할 뿐만 아니라 목동맥 및 관상 동맥에서 플라크 형성을 감소시킴을 보여주었다 (Villines *et al.*, 2010, J Am Coll Cardiol 55:2721-6). 불행하게도, 국립 보건원에 의해 지원된 대규모 결과 시험 AIM-HIGH (저 HDL/고 트리글리세리드를 사용한 대사 증후군에서의 아테롬성혈전증 개입 (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglyceride))은 3000명 약간 초과 환자 모집 후, 무용성 때문에 중단되었다 (Investigators *et al.*, 2011, N Engl J Med 365:2255-67). 높은 심혈관 위험의 25,673명의 환자에서의 심바스타틴에 추가로 라로피프란트 (홍조의 발생을 감소시키는 프로스타글란딘 D2 수용체 길항제)와 조합으로의 확장-방출 니아신의 효과를 조사한 HPS-THRIVE (심장 보호 연구 2-혈관 사건의 발생을 감소시키는 HDL의 치료 (Heart Protection Study 2-Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events)) 시험은 주요 혈관 사건에 대해 니아신-라로피프란트 조합의 유의한 유익을 나타내지 않았다 (Group, 2013, Eur Heart J 34:1279-91).

[0056] HDL-콜레스테롤 증가 약물의 신규한 부류는 CETP 억제제이다. HDL로부터 VLDL 또는 LDL로의 콜레스테롤 에스테르의 전환을 감소시킴으로써, CETP 억제제는 30 내지 140% (ref)의 혈장 HDL-콜레스테롤 수준의 현저하고 일정

한 증가를 생성한다. 스타틴에 회합되어, LDL-콜레스테롤은 변화되지 않고 잔류하거나 (달세트라핍) 또는 약 40% 더 감소한다 (토르세트라핍, 아나세트라핍, 또는 에바세트라핍). ILLUMINATE (아테롬성동맥경화 사건에서의 그의 영향을 이해하기 위한 지질 수준 관리의 조사 (Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events)) 시험에서, 15,067명의 환자에 대한 80 mg의 아토르바스타틴에의 토르세트라핍의 첨가는 아토르바스타틴 단독에 비해 80%의 HDL-콜레스테롤 증가 및 25%의 LDL-콜레스테롤 감소에도 불구하고 (Barter *et al.*, 2007, N Engl J Med 357:2109-22), 사망률 및 이환율의 증가와 연관되었다 (Barter *et al.*, 2007, N Engl J Med 357:2109-22). 2가지 다른 시험, 즉, B-모드 목동맥 초음파를 사용한 RADIANCE 2 (신규한 콜레스테릴-에스테르-전달 단백질 억제제로의 영상화에 의한 아테롬성동맥경화 질환 변화의 등급화 (Rating Atherosclerotic Disease Change by Imaging with a New Cholesteryl-Ester-Transfer Protein Inhibitor)) 시험 (Bots *et al.*, 2007, Lancet 370:153-60), 뿐만 아니라 관상동맥 혈관내 초음파를 사용한 ILLUSTRATE (CETP 억제 및 HDL 상승에 의한 아테롬성동맥경화증의 감소를 평가하기 위한 관상동맥 초음파를 사용한 지질 수준 관리의 조사 (Investigation of Lipid Level Management Using Coronary Ultrasound to Assess Reduction of Atherosclerosis by CETP Inhibition and HDL Elevation)) 시험 (Nissen *et al.*, 2007, N Engl J Med 356:1304-16)에서, 토르세트라핍은 지질 프로파일의 바람직한 변화에도 불구하고, 목동맥 내막-중막 두께를 감소시키지 않았으며, 이는 관상동맥 플라크 부피를 감소시키지 않았다. 이들 바람직하지 않은 결과는 아마도 오프-타겟 효과, 예컨대 아마도 부신으로부터의 증가된 알도스테론 분비와 관련되는 혈압의 증가에 기인하였다 (Hu *et al.*, 2009, Endocrinology 150:2211-9; Forrest *et al.*, 2008, British journal of pharmacology 154:1465-73). 토르세트라핍의 오프-타겟 효과를 결여한 것으로 보이는 다른 CETP 억제제, 예컨대 아나세트라핍, 달세트라핍, 및 에바세트라핍이 개발되었다. 이들 화합물은 알도스테론 분비에 영향을 미치지 않는다. DEFINE (아나세트라핍으로의 CETP 억제의 효능 및 내성의 측정 (Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib)) 시험에서, 아나세트라핍은 아토르바스타틴에 비해 HDL-콜레스테롤을 약 140% 증가시키고, LDL-콜레스테롤을 40% 감소시킨다 (Cannon *et al.*, 2010, The New England journal of medicine 363:2406-15). dal-OUTCOMES 시험의 중간 분석은 ACS 환자에서 위약에 비해 달세트라핍의 유익을 나타내지 않은 반면, HDL-콜레스테롤은 약 30%, 및 ApoA-I은 18% 증가하고, LDL-콜레스테롤은 변화가 없다 (Schwartz *et al.*, 2012, The New England journal of medicine 121105113014000). 효능의 결여는 스타틴에 의한 ABCA1의 하향조절과 관련되는 것으로 상정되었다 (Niesor *et al.* poster 167 presented at the American College of Cardiology, 62nd annual scientific sessions March 9-11, 2013, San Francisco, CA, USA).

[0057]

피브레이트는 또한 고콜레스테롤혈증과 연관될 수 있는 고지질혈증 (즉, 상승된 혈청 트리글리세리드)의 다양한 형태를 치료하는데 사용되는 지질-저하 약물의 부류이다. 피브레이트는 VLDL 분획을 감소시키며, HDL을 약간 증가시키는 것으로 보이지만, 혈청 콜레스테롤에 대한 이들 약물의 효과는 가변적이다. 미국에서, 피브레이트, 예컨대 클로피브레이트 (아트로미드 (Atromid)-S®), 페노피브레이트 (트리코르 (Tricor)®) 및 베자피브레이트 (베잘립 (Bezalip)®)는 항지질혈증 약물로서의 사용에 대해 승인되었지만, 고콜레스테롤혈증제로서는 승인을 받지 않았다. 예를 들어, 클로피브레이트는 VLDL 분획을 감소시킴으로써 혈청 트리글리세리드를 저하시키도록 (알려지지 않은 메커니즘을 통해) 작용하는 항지질혈증제이다. 혈청 콜레스테롤은 특정 환자 하위집단에서 감소될 수 있지만, 약물에 대한 생화학적 반응은 가변적이며, 어느 환자가 바람직한 결과를 얻을 것인지 예측하는 것은 항상 가능하지는 않다. 아트로미드-S®는 관상동맥 심장 질환의 예방에 효과적인 것으로 나타나지 않았다. 화학적으로 및 약물학적으로 관련된 약물인 겐피프로질 (로피드 (Lopid)®)은 혈청 트리글리세리드 및 VLDL 콜레스테롤을 중간 정도로 감소시키고, HDL 콜레스테롤—HDL₂ 및 HDL₃ 하위분획 뿐만 아니라 ApoA-I 및 A-II 둘 다 (즉, AI/AMT-HDL 분획)를 중간 정도로 증가시키는 지질 조절제이다. 그러나, 지질 반응은 특히 상이한 환자 집단 중에서 이질적이다. 더욱이, 관상동맥 심장 질환의 예방은 기존의 관상동맥 심장 질환의 병력 또는 증상이 없는 40 내지 55세의 남성 환자에서 관찰되었지만, 어느 정도로 이들 발견이 다른 환자 집단 (예를 들어, 여성, 노인 및 청년 남성)까지 추론될 수 있는지는 명확하지 않다. 사실, 확립된 관상동맥 심장 질환을 갖는 환자에서는 효능이 관찰되지 않았다. 독성, 예컨대 악성종양 (특히 위장관 암), 담낭 질환 및 비-관상동맥 사망률의 증가된 발생을 비롯한 심각한 부작용은 피브레이트의 사용과 연관된다.

[0058]

경구 에스트로겐 대체 요법은 폐경후 여성에서 중등도 고콜레스테롤혈증에 대해 고려될 수 있다. 그러나, HDL의 증가는 트리글리세리드의 증가를 수반할 수 있다. 에스트로겐 치료는 물론 특정 환자 집단 (폐경후 여성)에 제한되며, 악성 신생물의 유도, 담낭 질환, 혈전색전성 질환, 간 선종, 상승된 혈압, 글루코스 불내성, 및 고칼슘혈증을 비롯한 심각한 부작용과 연관된다.

- [0059] 고지질혈증의 치료에 유용한 다른 제제로는 콜레스테롤 흡수를 차단하거나 억제하는 에제티미브 (제티아 (Zetia)®; 머크 (Merck))를 들 수 있다. 그러나, 에제티미브의 억제제는 특정 독성을 나타내는 것으로 나타났다.
- [0060] HDL, 뿐만 아니라 인지질과 복합체화된 ApoA-I의 재조합 형태는 무극성 또는 양친매성 분자, 예를 들어, 콜레스테롤 및 유도체 (옥시스테롤, 산화된 스테롤, 식물 스테롤 등), 콜레스테롤 에스테르, 인지질 및 유도체 (산화된 인지질), 트리글리세리드, 산화 생성물, 및 지질다당류 (LPS)에 대한 싱크/스캐빈저로서 기능할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Casas *et al.*, 1995, J. Surg. Res. Nov 59(5):544-52] 참조). HDL은 또한 TNF-알파 및 다른 림포카인에 대한 스캐빈저로서 기능할 수 있다. HDL은 또한 인간 혈청 파라옥소나제, 예를 들어, PON-1, -2, -3에 대한 운반체로서 기능할 수 있다. HDL과 회합하는 에스테라제인 파라옥소나제는 세포 성분을 산화에 대해 보호하는데 중요하다. 산화적 스트레스 동안 일어나는 LDL의 산화는 아테롬성동맥경화증의 발달과 직접 관련되는 것으로 보인다 (Aviram, 2000, Free Radic. Res. 33 Suppl:S85-97). 파라옥소나제는 아테롬성동맥경화증 및 심혈관 질환에 대한 감수성에 있어서 역할을 하는 것으로 보인다 (Aviram, 1999, Mol. Med. Today 5(9):381-86). 인간 혈청 파라옥소나제 (PON-1)는 고-밀도 지단백질 (HDL)에 결합된다. 그의 활성은 아테롬성동맥경화증과 역으로 관련된다. PON-1은 유기포스페이트를 가수분해하며, HDL 및 저-밀도 지단백질 (LDL)의 산화의 억제에 의해 아테롬성동맥경화증에 대해 보호할 수 있다 (Aviram, 1999, Mol. Med. Today 5(9):381-86). 실험적 연구는 이 보호가 산화된 지단백질에서 특정 지질 과산화물을 가수분해하는 PON-1의 능력과 연관됨을 암시한다. PON-1 활성을 보존하거나 향상시키는 개입은 아테롬성동맥경화증 및 관상동맥 심장 질환의 개시를 지연시키는 것을 도울 수 있다.
- [0061] HDL은 추가로 항혈전제 및 피브리노겐 감소제로서, 및 출혈성 쇼크에서의 제제로서 역할을 갖는다 코케릴 (Cockerill) 등, WO 01/13939, 2001년 3월 1일에 공개됨). HDL, 및 특히 ApoA-I은 ApoA-I을 포함하는 지질 입자 내로의 패혈증에 의해 생성되는 지질다당류의 교환을 용이하게 하여, 지질다당류의 기능적 중성화를 초래하는 것으로 나타났다 (라이트 (Wright) 등, W09534289, 1995년 12월 21일에 공개됨; 라이트 등, 미국 특허 제 5,928,624호, 1999년 7월 27에 허여됨; 라이트 등, 미국 특허 제 5,932,536호, 1999년 8월 3일에 허여됨).
- [0062] 최근, 상이한 시험은 스타틴 요법 단독으로 달성된 것을 넘어, HDL-콜레스테롤을 증가시키는 약물, 예컨대 피브레이트, 니아신 또는 CETP의 억제제로 관상동맥 위험을 감소시키는 곤란성을 기재하였다 (상기 참조). 인간 HDL 대사의 몇몇 선천적 이상에서 뿐만 아니라 변경된 HDL 대사를 갖는 유전적 마우스 모델에 대해, HDL-C의 변화는 각각 심혈관 위험 또는 아테롬성동맥경화 플라크 크기의 변화와 연관되지 않았다 (Besler *et al.*, 2012, EMBO molecular medicine 4:251-68; Voight *et al.*, 2012, Lancet 6736:1-9; Frikke-Schmidt *et al.*, JAMA, June 4, 2008- Vol 299, No. 21; Holmes *et al.*, Eur Heart J first published online January 27, 2014 doi:10.1093/eurheartj/ehf571). 따라서, 치료 표적으로서 HDL의 병원성 역할 및 적합성은 의심스럽다. 이는 단순 HDL-콜레스테롤 수준 (바이오마커로서)이라기 보다는 HDL의 기능성이 장래의 임상 시험에서 심혈관 질환에서의 HDL의 유익을 평가하는데 중요할 수 있다는 결론을 초래한다. HDL의 기능성을 연구하는 경우, HDL 대사는 고도로 조절되는 것으로 보이며, 따라서, 극도의 변경, 예컨대 HDL 수준의 강한 증가 (예를 들어 CETP 억제제 요법으로 달성되는 바와 같음)는 하향-조절을 유도할 수 있으며, 이는 심혈관 질환에 대한 약간의 영향을 초래할 것이라고 가설화할 수 있다. 이 가설은 상이한 재구성된 HDL을 사용하고, 용량-반응 관계가 관찰되지 않은 2가지 임상 시험으로부터의 결과에 의해 강조된다. 더욱이, 플라크 퇴행에 대해 보다 낮은 용량보다는 최고 용량에서 보다 적은 효과를 나타내는 경향은 둘 다의 시험에서 기재되었다 (Nissen *et al.*, 2003, JAMA 290:2292-300; Tardif *et al.*, 2007, JAMA 297:1675-82). 최근의 임상 시험에서 CETP 억제제인 달세트라핀의 유익한 효과의 결여는 추가로 분석되었으며, 일부 스타틴이 ACS 환자에서 아테롬성동맥경화 플라크 퇴행에서 HDL 유익을 손상시킬 수 있는 대식세포에서의 ABCA1 발현에 대한 특이적 하향-조절 효과를 가질 수 있다는 결론을 초래한다. 전체적으로, 이들 관찰은 HDL 수준의 올바른 증가 또는 HDL의 성질 (프리-베타 HDL 대 구형 HDL), 또는 HDL 입자의 수가 심혈관 질환의 성공적인 치료에 핵심일 수 있다고 결론내릴 수 있게 한다.
- [0063] 건강한 대상체로부터의 HDL은 혈관구조에서, 및 특히 내피 세포에 대해 몇몇 보호적 효과를 발휘할 수 있다 (Besler *et al.*, 2011, The Journal of clinical investigation 121:2693-708; Yuhanna *et al.*, 2001, Nature medicine 7:853-7; Kuvin *et al.*, 2002, American heart journal 144:165-72). 건강한 대상체로부터의 HDL은 배양물에서 인간 대동맥 내피 세포로부터의 NO 방출을 자극하며, eNOS의 발현을 증가시킨다 (Besler *et al.*, 2011, The Journal of clinical investigation 121:2693-708; Yuhanna *et al.*, 2001, Nature medicine 7:853-7; Kuvin *et al.*, 2002, American heart journal 144:165-72). HDL은 부착 분자, 예컨대 혈관 세포 부착 분자 1 (VCAM1)의 발현을 억제하며, 따라서, 단핵구의 부착을 억제한다 (Nicholls *et al.*, 2005, Circulation

111:1543-50; Ansell *et al.*, 2003, *Circulation* 108:2751-6). HDL은 또한 상기 기재된 바와 같이 항혈전 효과를 발휘한다. 마우스 목동맥 모델에서, HDL은 혈관 손상 후 내피 복구를 향상시킨다 (Besler *et al.*, 2011, *The Journal of clinical investigation* 121:2693-708). 건강한 대상체로부터 얻어진 HDL은 시험관내에서 및 apoE-결핍 마우스에서 생체내에서 내피 세포 아포토시스를 감소시켰다 (Riwanto *et al.*, 2013, *Circulation* 127:891-904). 이러한 효과는 또한 ABCA1의 돌연변이를 갖는 환자에서 관찰된다 (Attie *et al.*, 2001, *J Lipid Res* 42:1717-26). 재구성된 HDL 입자 (1:150의 물 비의 ApoA-I/포스포티딜콜린)의 주입은 각각 아세틸 콜린의 동맥내 주입, 및 위팔 동맥의 혈량측정법 또는 고-해상도 초음파 및 유동-매개 혈관확장에 의한 아래팔 혈류의 측정에 의해 관찰된 바와 같이 손상된 내피 기능을 개선시킨다 (Spieker *et al.*, 2002, *Circulation* 105:1399-402). 이중-맹검 무작위화 위약-대조 시험 (dal-VESSEL)에서 관상동맥 심장 질환 (CHD)을 갖거나 그 위험이 있는 환자에서, CETP 억제제 (달세트라핀)는 NO-의존성 내피 기능, 혈압, 또는 염증 및 산화적 스트레스의 마커에 영향을 미치지 않고 CETP 활성을 감소시켰으며, HDL-C 수준을 증가시켰다 (Luescher *et al.*, 2012, *European heart journal* 33:857-65). 한 가지 가설은 건강한 대상체로부터의 HDL과 달리, 당뇨병, CAD, ACS, 또는 만성 신장 기능이상을 갖는 환자로부터의 HDL은 이들이 더이상 배양물 중의 내피 세포로부터 NO 방출을 자극하지 않기 때문에, 혈관 효과에서 기능이상적이라는 것이다 (Besler *et al.*, 2011, *The Journal of clinical investigation* 121:2693-708; Sorrentino *et al.*, 2010, *Circulation* 121:110-22; Speer *et al.*, 2013, *Immunity* 1-15).

- [0064] 그러나, ApoA-I, ApoA-I_M, ApoA-I_P 및 다른 변이체, 뿐만 아니라 재구성된 HDL의 치료적 용도는 현재 낮은 전체적 생산 수율 및 재조합적으로 발현된 단백질의 배양물에서의 단백질 분해의 발생을 고려하여, 치료제 투여에 요구되는 아포지단백질의 많은 양에 의해 및 단백질 생산의 비용에 의해 제한된다 (예를 들어, 문헌 [Mallory *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262(9):4241-4247]; [Schmidt *et al.*, 1997, *Protein Expression & Purification* 10:226-236] 참조). 초기 임상 시험에 의해 용량 범위는 심혈관 질환의 치료를 위해 주입 당 1.5 내지 4 g의 단백질입이 제안되었다. 완전한 치료에 요구되는 주입의 수는 알려져 있지 않다 (예를 들어, 문헌 [Eriksson *et al.*, 1999, *Circulation* 100(6):594-98]; [Carlson, 1995, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 5:85-91]; [Nanjee *et al.*, 2000, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20(9):2148-55]; [Nanjee *et al.*, 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(4):979-89]; [Nanjee *et al.*, 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(9):1203-14] 참조).
- [0065] 재조합 인간 ApoA-I은 이중성 숙주에서 발현되었지만, 성숙 단백질의 수율은 특히 수율을 추가로 감소시키고, 불순한 생성물을 초래하는 정제 방법과 결합되는 경우, 대규모 치료적 적용에 불충분하였다.
- [0066] 문헌 [Weinberg *et al.*, 1988, *J. Lipid Research* 29:819-824]에는 역상 고압 액체 크로마토그래피에 의해 인간 혈장으로부터 정제된 아포지단백질 A-I, A-II 및 A-IV 및 그의 이소형의 분리가 기재되어 있다.
- [0067] WO 2009/025754에는 인간 혈장으로부터의 알파-1-안티트립신 및 ApoA-I의 단백질 분리 및 정제가 기재되어 있다.
- [0068] 문헌 [Hunter *et al.*, 2009, *Biotechnol. Prog.* 25(2):446-453]에는 이. 콜라이 (*E. coli*)에서 재조합적으로 발현된 ApoA-I 밀라노 변이체의 대규모 정제가 기재되어 있다.
- [0069] 문헌 [Caparon *et al.*, 2009, *Biotechnol. And Bioeng.* 105(2):239-249]에는 정제된 아포지단백질 생성물에서 이들 단백질의 수준을 감소시키기 위해 2가지 숙주 세포 단백질을 고갈시키도록 유전적으로 조작된 이. 콜라이 숙주로부터의 ApoA-I 밀라노의 발현 및 정제가 기재되어 있다.
- [0070] 미국 특허 제6,090,921호에는 음이온-교환 크로마토그래피를 사용한 ApoA-I 및 ApoE를 함유하는 인간 혈장의 분획으로부터의 ApoA-I 또는 아포지단백질 E (ApoE)의 정제가 기재되어 있다.
- [0071] 문헌 [Brewer *et al.*, 1986, *Meth. Enzymol.* 128:223-246]에는 크로마토그래피 기술을 사용한 인간 혈액으로부터의 아포지단백질의 분리 및 특징화가 기재되어 있다.
- [0072] 문헌 [Weisweiler *et al.*, 1987, *Clinica Chimica Acta* 169:249-254]에는 고속-단백질 액체 크로마토그래피를 사용한 인간 HDL로부터의 ApoA-I 및 ApoA-II의 단리가 기재되어 있다.
- [0073] 문헌 [deSilva *et al.*, 1990, *J. Biol. Chem.* 265(24):14292-14297]에는 면역친화도 크로마토그래피 및 역상 고성능 액체 크로마토그래피에 의한 아포지단백질 J의 정제가 기재되어 있다.
- [0074] 지단백질 및 지단백질 복합체는 현재 지단백질 요법의 실현가능성을 확립하는 상이한 지단백질-기재 제제를 사

용한 임상 연구와 함께, 임상적 사용을 위해 개발중이다 (Tardif, 2010, Journal of Clinical Lipidology 4:399-404). 한 가지 연구는 자가 탈지질화된 HDL을 평가하였다 (Waksman *et al.*, 2010, J Am. Coll. Cardiol. 55:2727-2735). 또다른 연구는 재조합 ApoA-I_M 및 팔미토일-올레오일-PC (POPC)의 복합체인 ETC-216을 평가하였다 (Nissen *et al.*, 2003, JAMA 290:2292-2300). CSL-111은 대두 포스파티딜콜린 (SBPC)과 복합체화된 혈장으로부터 정제된 재구성된 인간 ApoA-I이다 (Tardif *et al.*, 2007, JAMA 297:1675-1682). 현재의 탐구적 약물은 아테롬성동맥경화 플라크를 감소시키는데 있어서 효능을 나타내었지만, 효과는 2차 효과, 예컨대 트랜스아미나제의 증가 또는 ApoA-I 항체의 형성을 수반하였다 (Nanjee *et al.*, 1999, Arterioscler. Vasc. Throm. Biol. 19:979-89; Nissen *et al.*, 2003, JAMA 290:2292-2300; Spieker *et al.*, 2002, Circulation 105:1399-1402; Nieuwdorp *et al.*, 2004, Diabetologia 51:1081-4; Drew *et al.*, 2009, Circulation 119, 2103-11; Shaw *et al.*, 2008, Circ. Res. 103:1084-91; Tardiff *et al.*, 2007, JAMA 297:1675-1682; Waksman, 2008, Circulation 118:S 371; 초 (Cho), 미국 특허 제7,273,849 B2호, 2007년 9월 25일에 허여됨). 예를 들어, ERASE 임상 시험 (Tardiff *et al.*, 2007, JAMA 297:1675-1682)은 2가지 용량의 CSL-111: 40 mg/kg 및 80 mg/kg의 ApoA-I을 이용하였다. 80 mg/kg 용량 군은 간 독성 (심각한 트랜스아미나제 상승에 의해 나타난 바와 같음)으로 인해 중단되어야 했다. 심지어 40 mg/kg 용량 군에서, 몇몇 환자는 트랜스아미나제 상승을 경험한다. 독성은 잠재적으로 잔류의 콜레이트, 즉, 재구성된 HDL의 제조에 사용되는 세정제의 존재에 기인한다 (라이트 등, US 2013/0190226에 의해 강조된 바와 같음).

[0075] 따라서, 혈청 콜레스테롤을 저하시키고, HDL 혈청 수준을 증가시키고, 이상지질혈증 및/또는 이상지질혈증과 연관된 질환, 상태 및/또는 장애를 예방 및/또는 치료하는데 보다 효과적이면서, 부작용, 예컨대 간 독성 및 트리글리세리드, LDL-트리글리세리드, 또는 VLDL-트리글리세리드의 증가를 최소화하는 콜레스테롤 저하 약물의 투약 처방, 뿐만 아니라 이러한 투약 처방의 확인 및 이러한 치료를 받는 대상체의 모니터링 방법에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

[0076] 4. 요약

[0077] 이 개인맞춤형 의료의 시대에, 약물의 과학 및 유전체학을 조합한 약리유전체학은 치료 선택, 개시, 용량 맞춤화, 또는 회피를 보다 양호하게 알려주는 치료 제품과 함께 사용하도록 의도되는 진단 제품인 소위 "동반 진단제"의 사용 및 문의를 촉진시켰다. 본 개시내용은 부분적으로 HDL 치료제 (하기 섹션 6.1에 정의된 바와 같음), 특히 HDL 모방체, 탈지질화된 또는 지질 부족 HDL, 또는 콜레스테롤 유출 및 역 지질 수송의 성분을 하향 조절하는 작용의 메커니즘을 통해 투여 후 HDL 수준을 증가시키는 다른 화합물, 예컨대 ABCA1 및 ABCG1 수송체 및 SREBP1, 즉 지방산의 생합성을 조절하는 전사 인자로의 대상체의 치료에 대한 반응으로 반전된 U자형 용량-효과 곡선의 발견에 관한 것이다. 이 작용 메커니즘의 발견은 HDL 치료제로의 치료를 모니터링하는데 및/또는 특정 대상체 또는 대상체의 하위-군 또는 다른 군에 대한 HDL 치료제의 유효 투여량을 확인하는데 유용한 동반 진단 검정의 설계를 허용한다. 따라서, 본 개시내용은 다른 것들 중에서도 HDL 치료제로의 치료를 받고 있는 대상체와 협력하여 사용될 수 있는 HDL 마커 동반 진단 검정에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 HDL 치료제로의 치료를 받고 있는 대상체가 치료학적 유효 또는 최적 용량을 받고 있는지 여부를 측정하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 HDL 치료제로의 치료를 받고 있는 대상체가 안전성을 최적화하면서 치료학적 유효 또는 최적 용량을 받고 있는지 여부를 측정하는 방법에 관한 것이다.

[0078] 본원에 기재된 바와 같은 방법은 대상체가 상태 (하기 섹션 6.1에 정의된 바와 같음)에 대해 HDL 치료제로 치료되고 있거나, 또는 상태를 앓고 있는 대상체를 치료하기 위해 HDL 치료제에 대한 투약 스케줄을 확인하거나 최적화하기 위해 채용될 수 있다.

[0079] 또한, HDL 치료제로의 치료에 대한 대상체의 반응의 가능성의 예측 방법이 본원에서 제공된다.

[0080] 특정 측면에서, 본 개시내용은 상태를 앓고 있는 대상체를 HDL 치료제로 치료하거나, 상태의 치료를 위한 HDL 치료제의 적합한 용량을 확인하거나, 상태를 앓고 있는 대상체에서 콜레스테롤을 동원하거나, 대상체에서의 HDL 치료제의 효능을 모니터링하는 방법에 관한 것이다. 방법은 전형적으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하고 (1회 이상, 예를 들어 투약 처방에 따라), 개체로부터의 시험 샘플에서 적어도 하나의, 일부 실시양태에서 2개 또는 3개 이상의 HDL 마커의 유전자 발현의 변화를 모니터링하는 것을 포함한다. 임의의 변화는 대상체 자신의 기준선, 대상체의 이전 측정, 및/또는 개체의 집단에서 하나 이상의 HDL 마커를 측정하는 것으로부터 얻어지는 대조군에 비교된 바와 같을 수 있다. 개체의 집단은 임의의 적절한 집단, 예를 들어, 건강한 개체, 상태를 앓

고 있는 개체, 유전적으로 매칭된 개체 동일 수 있다. 측정 후, 용량, 투약의 빈도 또는 둘 다는 HDL 치료제가 콜레스테롤 유출 경로의 성분을 치료 효능이 악화되도록 하는 정도로 하향 조절하는 경우 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 변경하지 않거나, 심지어 증가시키는 용량이 확인된다.

[0081] 일부 실시양태에서, 방법은 (a) 대상체 또는 대상체의 집단으로부터 제1 시험 샘플을 얻는 단계; (b) 시험 샘플에서 하나 이상의 HDL 마커 (하기 섹션 6.1에 정의된 바와 같음)의 발현 수준을 측정하는 단계; (c) HDL 치료제의 용량 (또는 일련의 용량)을 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하는 단계; (d) 대상체 또는 대상체의 집단으로부터 제2 시험 샘플을 얻는 단계; 및 (e) 제2 시험 샘플에서 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 샘플은 HDL 치료제로의 치료 이전에 얻어진다. 다른 실시양태에서, 제1 샘플은 대상체 또는 대상체의 집단이 단계 (c)의 용량과 상이한 HDL 치료제의 용량으로 치료된 후에 얻어진다.

[0082] 다른 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 용량을 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하는 단계; (b) 대상체 또는 대상체의 집단으로부터 시험 샘플을 얻는 단계; 및 (c) 시험 샘플에서 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 발현 수준이 컷오프량 초과 또는 미만인지 측정하는 단계를 포함한다. 임의로, 단계 (a) 내지 (c)는 적합한 용량이 확인될 때까지 HDL 치료제의 하나 이상의 추가의 용량에 대해 반복된다. 추가의 용량은 HDL 치료제의 보다 높은/보다 낮은 양, 보다 높은/보다 낮은 투약 빈도, 또는 보다 빠르/보다 느린 주입 시간을 포함할 수 있다.

[0083] 시험 샘플은 바람직하게는 말초 혈액 단핵 세포 또는 순환 단핵구 또는 대식세포의 샘플이다. 이는 또한 림프 단핵 세포 또는 순환 단핵구 또는 대식세포의 샘플일 수 있다. 샘플은 예를 들어, 비치료된 대상체 또는 대상체의 집단으로부터, 또는 HDL 치료제의 투여 후, 예를 들어 투여 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 또는 24시간 후의 대상체 또는 대상체의 집단으로부터 얻어질 수 있다. 다양한 실시양태에서, 샘플은 투여 2 내지 10, 2 내지 12, 4 내지 6, 4 내지 8, 4 내지 24, 4 내지 16, 6 내지 8 또는 6 내지 10시간 후에 얻어질 수 있다. 대상체는 단일요법 또는 예를 들어, 1종 이상의 지질 제어 의약, 예컨대 아토르바스타틴, 에세티미브, 니아신, 로수바스타틴, 심바스타틴, 아스피린, 플루바스타틴, 로바스타틴, 및 프라바스타틴과의 조합 요법 처방의 일부로서 HDL 치료제로 치료될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적합한 용량의 확인은 건강한 개체에서 수행되고, 다른 실시양태에서, 이는 상태를 앓고 있는 개체의 집단에서 수행된다. 다양한 실시양태에서, 적합한 용량은 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 및/또는 집단 평균에 비해 20% 내지 80%, 30% 내지 70%, 40% 내지 60%, 또는 50%만큼 감소시키는 용량이다. 다른 실시양태에서, 적합한 용량은 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 또는 집단 평균에 비해 50% 이하, 및 일부 실시양태에서, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 또는 10% 이하만큼 감소시키는 용량이다. 더 다른 실시양태에서, 용량은 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 또는 집단 평균에 비해 전혀 감소시키지 않는 것이다.

[0084] 더 또다른 실시양태에서, 본 개시내용의 동반 진단 검정에 사용하기 위한 키트가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 키트는 (a) 적어도 1종의 HDL 치료제 및 (b) HDL 마커의 발현을 정량화하는데 유용한 적어도 1종의 진단 시약 (예를 들어, 핵산 검정의 경우 HDL 마커의 검출용 프라이머 및/또는 프로브, 및 단백질 검정의 경우 적어도 하나의 항-HDL 마커 항체 (폴리클로날 또는 모노클로날))를 포함한다. 또다른 실시양태에서, HDL 마커는 생물학적 샘플 (예를 들어 혈액 또는 림프)로부터 세포를 분리하는데 사용되는 세포 분류기 또는 FACS 기기의 도움으로 측정된다.

[0085] 또한, 가족성 저알파지단백혈증, 예를 들어, ABCA1 결핍을 앓고 있는 대상체를 HDL 치료제로 치료하는 방법이 본원에서 제공된다. 바람직하게는, 요법은 2단계로, 즉, 초기의 보다 강한 "유도" 단계 및 후속의 보다 덜 강한 "유지" 단계로 주어진다. 임의로, 요법은 본원에 기재된 방법을 사용하여 확인되는 투약 스케줄에 따라 주어진다.

[0086] 또한, LCAT 결핍을 앓고 있는 대상체 (동형접합체 또는 이형접합체)를 HDL 치료제로, 임의로 본원에 기재된 방법을 사용하여 확인되는 투약 스케줄을 사용하여 치료하는 방법이 본원에서 제공된다.

[0087] 또한, ApoA-I 결핍을 앓고 있는 대상체 (동형접합체 또는 이형접합체)를 HDL 치료제로, 임의로 본원에 기재된 방법을 사용하여 확인되는 투약 스케줄을 사용하여 치료하는 방법이 본원에서 제공된다.

[0088] 또한, 낮은 HDL 수준 (남성에서 40 mg/dl 미만의 HDL-콜레스테롤 또는 여성에서 50 mg/dl 미만의 HDL-콜레스테롤)을 앓고 있는 대상체를 HDL 치료제로, 임의로 본원에 기재된 방법을 사용하여 확인되는 투약 스케줄을 사용

하여 치료하는 방법이 본원에서 제공된다.

- [0089] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 제1 용량을 대상체에게 투여하고, (b) 상기 제1 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고; (c) (i) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 제1 용량보다 낮은 상기 HDL 치료제의 제2 용량을 투여하거나; 또는 (ii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되지 않는 경우, 대상체를 상기 HDL 치료제의 제1 용량으로 치료하는 것을 포함한다.
- [0090] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에서의 HDL 치료제의 효능의 모니터링 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) 대상체를 제1 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 치료하고; (b) 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 투약 스케줄의 효과를 평가하고; (c) (i) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 상한 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 보다 낮은 용량의 HDL 치료제를 투여하는 것, 보다 긴 기간에 걸쳐 HDL 치료제를 대상체 내로 주입하는 것, 및 보다 적은 빈도 기준으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하는 것 중 하나 이상을 포함하는 제2 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 대상체를 치료하거나; (ii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 하한 컷오프량 초과만큼 감소되지 않는 경우, 보다 높은 용량의 HDL 치료제를 투여하는 것, 보다 짧은 기간에 걸쳐 HDL 치료제를 대상체 내로 주입하는 것, 및 보다 많은 빈도 기준으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하는 것 중 하나 이상을 포함하는 제2 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 대상체를 치료하거나; 또는 (iii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 상한 및 하한 컷오프량 사이의 양만큼 감소되는 경우, 대상체를 제1 투약 스케줄에 따라 치료하기를 계속하는 것을 포함한다.
- [0091] 컷오프량은 상기 투여 이전의 대상체 자신의 기준선에 상대적일 수 있거나, 컷오프량은 대조량, 예컨대 예를 들어, 건강한 대상체 또는 대상체와 동일한 질환 상태를 갖는 집단 또는 대상체와 하나 이상의 질환 위험 유전자를 공유하는 집단으로부터의 집단 평균에 상대적일 수 있다.
- [0092] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 제1 용량을 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 상기 제1 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고; (c) 제1 용량보다 높거나 낮은 상기 HDL 치료제의 제2 용량을 투여하고; (d) 상기 제2 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고; (e) 임의로 단계 (c) 및 (d)를 상기 HDL 치료제의 하나 이상의 추가의 용량으로 반복하고; (f) 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 컷오프량 초과만큼 감소시키지 않는 최고 용량을 확인함으로써, 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 상기 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함한다.
- [0093] 특정 실시양태에서, 상기 제2 용량의 투여 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제2 용량의 효과를 평가한다. 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 상기 HDL 치료제의 제3 용량이 투여될 수 있으며, 여기서 상기 HDL 치료제의 제3 용량은 제2 용량보다 낮다.
- [0094] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 대상체의 기준선량에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량으로의 지단백질 복합체; 및 (b) 담즙-산 수치, 니아신, 스타틴, 피브레이트, PCSK9 억제제, 에제티미브, 및 CETP 억제제로부터 임의로 선택되는 콜레스테롤 감소 요법의 조합을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0095] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 대조량에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량으로의 지단백질 복합체; 및 (b) 담즙-산 수치, 니아신, 스타틴, 피브레이트, PCSK9 억제제, 에제티미브, 및 CETP 억제제로부터 임의로 선택되는 콜레스테롤 감소 요법의 조합을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0096] 대조량은 집단 평균, 예를 들어, 건강한 대상체 또는 대상체와 동일한 질환 상태를 갖는 집단 또는 대상체와 하

나 이상의 질환 위험 유전자를 공유하는 집단으로부터의 집단 평균일 수 있다. 대상체는 인간일 수 있거나, 대상체의 집단은 인간 대상체의 집단이다. 대상체는 비-인간 동물, 예를 들어, 마우스일 수 있거나, 대상체의 집단은 비-인간 동물의 집단일 수 있다.

- [0097] 본원에 기재된 방법의 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 HDL 마커는 ABCA1이다. 예를 들어, ABCA1 mRNA 발현 수준 또는 ABCA1 단백질 발현 수준이 측정된다. 다양한 실시양태에서, ABCA1 컷오프량은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%이거나, 상기 컷오프량 중 임의의 2개에 의해 경계된 임의의 범위, 예를 들어, 20% 내지 80%, 30% 내지 70%, 40% 내지 60%, 10% 내지 50%, 10% 내지 40%, 20% 내지 50% 등으로부터 선택된다. ABCA1 발현 수준은 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정될 수 있다.
- [0098] 본원에 기재된 방법의 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 HDL 마커는 ABCG1이다. 예를 들어, ABCG1 mRNA 발현 수준 또는 ABCG1 단백질 발현 수준이 측정된다. 다양한 실시양태에서, ABCG1 컷오프량은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%이거나, 상기 컷오프량 중 임의의 2개에 의해 경계된 임의의 범위, 예를 들어, 20% 내지 80%, 30% 내지 70%, 40% 내지 60%, 10% 내지 50%, 10% 내지 40%, 20% 내지 50% 등으로부터 선택된다. ABCG1 발현 수준은 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정된다.
- [0099] 본원에 기재된 방법의 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 HDL 마커는 SREBP-1이다. 예를 들어, SREBP-1 mRNA 발현 수준 또는 SREBP-1 단백질 발현 수준이 측정된다. 다양한 실시양태에서, SREBP1 컷오프량은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%이거나, 상기 컷오프량 중 임의의 2개에 의해 경계된 임의의 범위, 예를 들어, 20% 내지 80%, 30% 내지 70%, 40% 내지 60%, 10% 내지 50%, 10% 내지 40%, 20% 내지 50% 등으로부터 선택된다. SREBP-1 발현 수준은 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정된다.
- [0100] 특정 실시양태에서, HDL 치료제는 지단백질 복합체이다. 지단백질 복합체는 아포지단백질, 예컨대 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoE 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 지단백질 복합체는 아포지단백질 펩티드 모방체, 예컨대 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, 또는 ApoE 펩티드 모방체 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 지단백질 복합체는 CER-001, CSL-111, CSL-112, CER-522, 또는 ETC-216일 수 있다.
- [0101] 특정 실시양태에서, HDL 치료제는 소분자, 예컨대 CETP 억제제 또는 판토텐산 유도체이다.
- [0102] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 컷오프량을 측정하는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 컷오프량은 HDL 치료제에 대한 용량 반응 곡선을 생성함으로써 측정될 수 있다. 컷오프량은 용량 반응 곡선의 변곡점에서의 HDL 마커의 발현 수준의 25%, 40%, 50%, 60% 또는 75%일 수 있다. 특정 실시양태에서, 컷오프는 상기 컷오프값 중 임의의 2개에 의해 경계된 범위, 예를 들어, 용량 반응 곡선의 변곡점에서의 HDL 마커의 발현 수준의 30% 내지 70%, 40% 내지 60%, 25% 내지 50%, 25% 내지 75%로부터 선택된다.
- [0103] 특정 실시양태에서, 대상체 또는 대상체의 집단은 ABCA1 결핍을 갖는다. 대상체 또는 대상체의 집단은 ABCA1 돌연변이에 대해 동형접합성일 수 있다. 대상체 또는 대상체의 집단은 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성일 수 있다.
- [0104] 다른 실시양태에서, 대상체 또는 대상체의 집단은 HDL 결핍, 저알파지질단백혈증, 또는 원발성 가족성 저알파지질단백혈증을 갖는다.
- [0105] 다른 실시양태에서, 대상체 또는 대상체의 집단은 LCAT 결핍 또는 어안 질환을 갖는다. 대상체 또는 대상체의 집단은 LCAT 돌연변이에 대해 동형접합성일 수 있다. 대상체 또는 대상체의 집단은 LCAT 돌연변이에 대해 이형접합성일 수 있다.
- [0106] 다른 실시양태에서, 대상체 또는 대상체의 집단은 ABCG1 결핍을 갖는다. 대상체 또는 대상체의 집단은 ABCG1 돌연변이에 대해 동형접합성일 수 있다. 대상체 또는 대상체의 집단은 ABCG1 돌연변이에 대해 이형접합성일 수 있다.
- [0107] 다른 실시양태에서, 대상체 또는 대상체의 집단은 ApoA-I 결핍을 갖는다. 대상체 또는 대상체의 집단은 ApoA-I 돌연변이에 대해 동형접합성일 수 있다. 대상체 또는 대상체의 집단은 ApoA-I 돌연변이에 대해 이형접합성일 수 있다.
- [0108] 더 다른 실시양태에서, 대상체 또는 대상체의 집단은 ABCG8 결핍을 갖는다. 대상체 또는 대상체의 집단은

ABCG8 돌연변이에 대해 동형접합성일 수 있다. 대상체 또는 대상체의 집단은 ABCG8 돌연변이에 대해 이형접합성일 수 있다.

- [0109] 더 다른 실시양태에서, 대상체 또는 대상체의 집단은 PLTP 결핍을 갖는다. 대상체 또는 대상체의 집단은 PLTP 돌연변이에 대해 동형접합성일 수 있다. 대상체 또는 대상체의 집단은 PLTP 돌연변이에 대해 이형접합성일 수 있다.
- [0110] 환자는 상기 유전자 중 하나 이상에서 유전적 결함을 가질 수 있으며, 즉, 혼합된 유전적 결함을 갖는다.
- [0111] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체에게 투여하고; (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고; (c) 상기 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함한다.
- [0112] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체에게 투여하고; (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고; (c) 기준선 발현 수준을 유지하거나, 또는 심지어 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 상승시키는 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함한다. 수준은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 경계된 범위에서 증가될 수 있으며, 예를 들어, 수준은 10% 이하, 20% 이하, 50% 이하, 10% 내지 50%, 20% 내지 60% 등 증가될 수 있다.
- [0113] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 상기 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 상승시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함한다.
- [0114] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고; (c) 기준선 발현 수준을 유지하거나, 또는 심지어 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 상승시키는 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함한다. 수준은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 경계된 범위에서 증가될 수 있으며, 예를 들어, 수준은 10% 이하, 20% 이하, 50% 이하, 10% 내지 50%, 20% 내지 60% 등 증가될 수 있다.
- [0115] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 HDL 치료제의 최고 용량을 확인하는 것을 포함한다. 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법은 (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함할 수 있다.
- [0116] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 요법에 적합한 HDL 치료제의 투약 간격의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 HDL 치료제의 가장 빈번한 투약 처방의 최고 용량을 확인하는 것을 포함한다. 요법에 적합한 HDL 치료제의 투약 간격의 확인 방법은 (a) HDL 치료제를 하나 이상의 투약 빈도에 따라 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 50% 내지 100% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 투약 빈도를 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함할 수 있다.
- [0117] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 투약 빈도는 (a) 2일마다 1 내지 4시간 주입으로서의 투여; (b) 3일마다 1 내

지 4시간 주입으로서의 투여; (c) 1주마다 24시간 주입으로서의 투여; 및 (d) 2주마다 24시간 주입으로서의 투여로부터 선택되는 하나 이상의 투약 빈도를 포함한다.

[0118] 콜레스테롤 유출은 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서 측정될 수 있다.

[0119] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 ABCA1 결핍을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 치료 유효량의 HDL 치료제, 예컨대 CER-001을 투여하는 것을 포함한다. 대상체는 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성 또는 동형접합성일 수 있다.

[0120] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 가족성 원발성 저알파지질단백혈증을 앓고 있는 대상체의 치료 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) 대상체에게 HDL 치료제를 유도 처방에 따라 투여하고; 이어서 (b) 대상체에게 HDL 치료제를 유지 처방에 따라 투여하는 것을 포함한다. 유지 처방은 HDL 치료제를 보다 낮은 용량, 보다 낮은 빈도, 또는 둘 다로 투여하는 것을 수반할 수 있다. 대상체는 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성 또는 동형접합성일 수 있다. 대상체는 LCAT 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성일 수 있다. 대상체는 ApoA-I 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성일 수 있다. 대상체는 ABCG1 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성일 수 있다. 대상체는 또한 지질 제어 의약, 예컨대 아토르바스타틴, 에제티미브, 니아신, 로수바스타틴, 심바스타틴, 아스피린, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴 또는 그의 조합으로 치료될 수 있다.

[0121] HDL 치료제는 CER-001일 수 있고/거나, 유도 처방은 4주의 기간 동안일 수 있다. 유도 처방은 HDL 치료제를 1주 2회, 3회 또는 4회 투여하는 것을 포함할 수 있다. HDL 치료제가 지단백질 복합체, 예컨대 CER-001인 경우, 유도 처방에서 투여되는 용량은 8 내지 15 mg/kg (단백질 중량 기준으로)으로부터 선택될 수 있다. 특정 실시양태에서, 유도 용량은 8 mg/kg, 12 mg/kg 또는 15 mg/kg이다. 유지 처방은 HDL 치료제를 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 1년, 적어도 18개월, 적어도 2년 동안, 또는 무기한으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 유지 처방은 HDL 치료제를 1주 1회 또는 2회 투여하는 것을 포함할 수 있다. HDL 치료제가 지단백질 복합체, 예컨대 CER-001인 경우, 유지 처방에서 투여되는 용량은 1 내지 6 mg/kg (단백질 중량 기준으로)으로부터 선택될 수 있다. 특정 실시양태에서, 유지 용량은 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 6 mg/kg이다.

[0122] 특정 실시양태에서, (a) 유도 처방은 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 및/또는 집단 평균에 비해 20% 내지 80% 또는 40% 내지 60%만큼 감소시키는 용량을 이용하고/거나; (b) 유지 처방은 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 및/또는 집단 평균에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량을 이용한다.

[0123] 단수 형태는 본 출원에서, 특허 출원에서 통상적인 바와 같이, 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는다면 하나 이상을 의미하기 위해 사용됨을 유념해야 한다. 또한, 용어 "또는"은 본 출원에서, 특허 출원에서 통상적인 바와 같이, 분리적 "또는" 또는 결합적 "및"을 의미하기 위해 사용된다.

[0124] 본 개시내용의 특징 및 이점은 하기 그의 실시양태의 상세한 설명으로부터 더욱 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0125] 5.도면의 간단한 설명

도 1은 CHI SQUARE 연구 설계를 나타내고;

도 2a 내지 2c는 CER-001의 제1 및 제6 주입의 투여 후 ApoA-I, 인지질 및 총 혈장 농도를 나타내고;

도 3은 MHICC 및 SAHMRI 사이의 프레임의 분포를 나타내고;

도 4는 TAV 및 PAV의 LS 평균 변화 - mITT 집단을 나타내고;

도 5는 TAV 및 PAV의 LS 평균 변화 - mPP 집단을 나타내고;

도 6a 내지 6b는 CER-001의 반전된 U자형 용량-효과 곡선을 나타내고;

도 7은 J774 대식세포에서의 ABCA1 발현에 대한 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 효과를 나타내고;

도 8은 J774 대식세포에서의 ABCG1 발현에 대한 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 효과를 나타내고;

- 도 9는 J774 대식세포에서의 SR-BI 발현에 대한 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 효과를 나타내고;
- 도 10은 J774 대식세포에서의 SREBP-1 발현에 대한 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 효과를 나타내고;
- 도 11은 J774 대식세포에서의 SREBP-2 발현에 대한 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 효과를 나타내고;
- 도 12는 J774 대식세포에서의 LXR 발현에 대한 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 효과를 나타내고;
- 도 13은 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 용량 ($\mu\text{g/mL}$)으로 처리된 ABCA1의 J774 대식세포에서의 발현을 나타내고;
- 도 14는 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 용량 ($\mu\text{g/mL}$)으로 처리된 ABCG1의 J774 대식세포에서의 발현을 나타내고;
- 도 15는 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 용량 ($\mu\text{g/mL}$)으로 처리된 SREBP-1의 J774 대식세포에서의 발현을 나타내고;
- 도 16은 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 용량 ($\mu\text{g/mL}$)으로 처리된 SR-BI의 J774 대식세포에서의 발현을 나타내고;
- 도 17은 J774 대식세포를 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I로 처리한 후 시간 경과에 따른 ABCA1의 감소하는 mRNA 수준을 나타내고;
- 도 18은 cAMP의 존재 및 부재 하에서의 J774 대식세포에서의 ABCA1 mRNA 수준을 나타내고;
- 도 19는 cAMP의 존재 및 부재 하에서의 J774 대식세포에서의 ABCG1 mRNA 수준을 나타내고;
- 도 20은 J774 대식세포에서의 ABCA1 단백질 수준에 대한 CER-001 및 HDL₃의 효과를 나타내고;
- 도 21은 J774 대식세포에서의 ABCA1 단백질 수준에 대한 CER-001 및 HDL₃의 효과를 나타내고;
- 도 22는 증가하는 농도의 CER-001의 존재 하에서의 J774 대식세포에서의 ABCA1 mRNA 수준의 조절에 대한 cAMP의 효과를 나타내고;
- 도 23은 증가하는 농도의 CER-001의 존재 하에서의 J774 대식세포에서의 ABCA1 mRNA 수준의 조절에 대한 cAMP의 0으로 설정된 효과를 나타내고;
- 도 24는 증가하는 농도의 CER-001의 존재 하에서의 J774 대식세포에서의 ABCG1 mRNA 수준의 조절에 대한 cAMP의 효과를 나타내고;
- 도 25는 증가하는 농도의 CER-001의 존재 하에서의 J774 대식세포에서의 ABCG1 mRNA 수준의 조절에 대한 cAMP의 0으로 설정된 효과를 나타내고;
- 도 26은 증가하는 농도의 CER-001의 존재 하에서의 J774 대식세포에서의 ABCA1 mRNA 수준의 조절에 대한 cAMP의 효과를 나타내고;
- 도 27은 CER-001, HDL₃, 및 ApoA-I로의 처리 후 ABCA1의 기준선량으로 복귀하는데 필요한 시간을 나타내고;
- 도 28은 CER-001, HDL₃, 및 ApoA-I로의 처리 후 ABCG1의 기준선량으로 복귀하는데 필요한 시간을 나타내고;
- 도 29는 CER-001, HDL₃, 및 ApoA-I로의 처리 후 SR-BI의 기준선량으로 복귀하는데 필요한 시간을 나타내고;
- 도 30은 HepG2 간세포에서의 ABCA1 수준에 대한 CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I의 효과를 나타내고;
- 도 31은 HepG2 간세포에서의 SR-BI 수준에 대한 CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I의 효과를 나타내고;
- 도 32는 Hepa 1.6 간세포에서의 ABCA1 수준에 대한 CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I의 효과를 나타내고;
- 도 33은 Hepa 1.6 간세포에서의 SR-BI 수준에 대한 CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I의 효과를 나타내고;

- 도 34는 CER-001 및 HDL₃에 의한 ABCA1 하향-조절 후의 ApoA-I 첨가의 효과를 나타내고;
- 도 35는 CER-001 및 HDL₃에 의한 ABCG1 하향-조절 후의 ApoA-I 첨가의 효과를 나타내고;
- 도 36은 CER-001 및 HDL₃에 의한 SR-BI 하향-조절 후의 ApoA-I 첨가의 효과를 나타내고;
- 도 37은 J774 대식세포에서의 ABCA1 mRNA 수준에 대한 HDL₂의 효과를 나타내고;
- 도 38은 J774 대식세포에서의 ABCG1 mRNA 수준에 대한 HDL₂의 효과를 나타내고;
- 도 39는 J774 대식세포에서의 SR-BI mRNA 수준에 대한 HDL₂의 효과를 나타내고;
- 도 40은 콜레스테롤 유출에 대한 β -시클로텍스트린의 효과를 나타내고;
- 도 41은 β -시클로텍스트린의 존재 하에서의 J774 대식세포에서의 ABCA1 mRNA 수준에 대한 용량-의존성 감소를 나타내고;
- 도 42는 β -시클로텍스트린의 존재 하에서의 J774 대식세포에서의 ABCG1 mRNA 수준에 대한 용량-의존성 감소를 나타내고;
- 도 43은 β -시클로텍스트린의 존재 하에서의 J774 대식세포에서의 SR-BI mRNA 수준에 대한 용량-의존성 증가를 나타내고;
- 도 44는 J774 대식세포에서의 LXR mRNA 수준에 대한 β -시클로텍스트린의 효과를 나타내고;
- 도 45는 J774 대식세포에서의 SREBP1 mRNA 수준에 대한 β -시클로텍스트린의 효과를 나타내고;
- 도 46은 J774 대식세포에서의 SREBP2 mRNA 수준에 대한 β -시클로텍스트린의 효과를 나타내고;
- 도 47은 CER-001 및 HDL₃으로 처리된 마우스에 대한 결찰된 목동맥 중의 비에스테르화된 콜레스테롤 함량을 나타내고;
- 도 48은 CER-001 및 HDL₃으로 처리된 마우스에 대한 결찰된 목동맥 중의 총 콜레스테롤 함량을 나타내고;
- 도 49는 CER-001 주입 후의 혈장 총 콜레스테롤 수준을 나타내고;
- 도 50은 HDL₃ 주입 후의 혈장 총 콜레스테롤 수준을 나타내고;
- 도 51은 CER-001 주입 후의 혈장 비에스테르화된 콜레스테롤 수준을 나타내고;
- 도 52는 HDL₃ 주입 후의 혈장 비에스테르화된 콜레스테롤 수준을 나타내고;
- 도 53은 CER-001 및 HDL₃에 대한 투여-후 혈장 총 콜레스테롤 수준을 나타내고;
- 도 54는 CER-001 및 HDL₃에 대한 투여-후 혈장 비에스테르화된 콜레스테롤 수준을 나타내고;
- 도 55는 CER-001로의 투여량 후 혈장 ApoA-I 수준을 나타내고;
- 도 56은 HDL₃으로의 투여량 후 혈장 ApoA-I 수준을 나타내고;
- 도 57은 결찰된 목동맥에서의 ABCA1 발현의 웨스턴 블롯 측정을 나타내고;
- 도 58은 CER-001의 마지막 주사 24시간 후의 간에서의 ABCA1 수준을 나타내고;
- 도 59는 CER-001의 마지막 주사 24시간 후의 간에서의 SR-BI 수준을 나타내고;
- 도 60은 CER-001 및 HDL₃으로 주사된 마우스의 대변에서 측정된 콜레스테롤 함량을 나타내고;
- 도 61은 HDL 입자 발달의 개관을 나타내고;
- 도 62는 역 지질 수송 (RLT) 경로의 개관을 나타내고;
- 도 63은 HDL 성숙 단계의 개관을 나타내고;

도 64는 인간 ApoA-I의 아미노산 서열 (서열식별번호 (SEQ ID NO): 1)을 나타내고;

도 65aa 내지 65ac 및 도 65b는 각각 인간 ABCA1의 뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 서열 (각각 서열식별번호: 2 및 3)을 나타내고;

도 66aa 내지 66ab 및 도 66b는 각각 인간 ABCG1의 뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 서열 (각각 서열식별번호: 4 및 5)을 나타내고;

도 67aa 내지 67ab 및 도 67b는 각각 인간 SREBP1의 뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 서열 (각각 서열식별번호: 6 및 7)을 나타내고;

도 68a 내지 68g는 SAMBA 임상 시험에서의 대상체에서의 콜레스테롤 에스테르화의 시간과정을 나타내고;

도 69a 내지 69g는 SAMBA 임상 시험에서의 대상체에서의 LCAT에 의한 적화된 콜레스테롤의 에스테르화를 나타내고;

도 70은 1개월 후의 SAMBA 임상 시험에서의 개별적 대상체에서의 목동맥 혈관벽 두께 변화를 나타내고;

도 71은 1개월 후의 SAMBA 임상 시험에서의 개별적 대상체에서의 대동맥 혈관벽 두께 변화를 나타내고;

도 72는 1개월 및 6개월 후의 SAMBA 대상체에서의 평균 혈관벽 두께 변화를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

6. 상세한 설명

6.1. 정의

본원에 사용된 하기 용어는 하기 의미를 갖는 것으로 의도된다:

상태 또는 상태들은 이상지질혈증 장애 (예컨대 고지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 관상동맥 심장 질환, 관상 동맥 질환, 혈관 및 혈관주위 질환, 및 심혈관 질환, 예컨대 아테롬성동맥경화증) 및 이상지질혈증과 연관된 질환 (예컨대 관상동맥 심장 질환, 관상 동맥 질환, 급성 관상동맥 증후군, 불안정 협심증, 심근 경색, 뇌졸중, 일과성 허혈 발작 (TIA), 내피 기능이상, 혈전증, 예컨대 아테롬성혈전성 혈관 질환, 염증성 질환, 예컨대 혈관 내피 염증, 심혈관 질환, 고혈압, 저산소증-유도된 혈관신생, 내피 세포의 아포토시스, 황반 변성, 제I형 당뇨병, 제II형 당뇨병, 허혈, 재협착, 혈관 또는 혈관주위 질환, 이상지질단백혈증, 높은 수준의 저밀도 지단백질 콜레스테롤, 높은 수준의 초저밀도 지단백질 콜레스테롤, 낮은 수준의 고밀도 지단백질, 높은 수준의 지단백질 Lp(a) 콜레스테롤, 높은 수준의 아포지단백질 B, 아테롬성동맥경화증, 예컨대 동맥 부전에 의해 유발된 간헐 파행, 가속화된 아테롬성동맥경화증, 이식편 아테롬성동맥경화증, 가족성 고콜레스테롤혈증 (FH), 가족성 복합 고지질혈증 (FCH), 지단백질 리파제 결핍, 예컨대 고중성지질혈증, 저알파지단백혈증, 및 고콜레스테롤혈증 지단백질) 중 하나, 그 이상, 또는 모두를 의미한다. 일부 실시양태에서, 이상지질혈증 장애는 가족성 원발성 저알파지단백혈증 (FPHA), 예컨대 탄지예르병, ABCA1 결핍, ApoA-I 결핍, LCAT 결핍 또는 어안 질환과 연관된다.

"IUSDEC"는 "반전된 U자형 용량-효과 곡선"을 의미한다. IUSDEC는 치료제의 용량 및 환자 반응 사이의 비선형 관계이다. 주어진 치료제의 증가하는 투여량의 효과는 최댓값 (양의 기울기를 갖는 용량 반응 곡선의 부분)까지 증가하는 것으로 보이며, 그 후 (변곡점) 효과는 감소한다 (음의 기울기를 갖는 용량 반응 곡선의 부분).

"HDL 치료제"는 고콜레스테롤혈증 또는 고지질혈증 및 관련된 질환 상태의 치료에 유용한 치료제를 의미한다. HDL 치료제의 예로는 HDL 모방체 지단백질 복합체 (예를 들어, CER-001, CSL-111, CSL-112, CER-522, ETC-216) 및 소분자 (예를 들어, 스타틴)를 들 수 있다.

"HDL 마커"는 그의 발현이 HDL 모방체로의 치료에 대한 반응으로 IUSDEC와 상관되는 분자 마커를 의미한다. 예시적인 HDL 마커는 ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 및 SREBP1이다. HDL 마커는 예를 들어 섹션 6.2에 기재된 바와 같이 mRNA 또는 단백질 수준에서 검정될 수 있다.

6.2. 동반 진단 방법

역 콜레스테롤 수송 (RCT)은 축적된 콜레스테롤이 배설을 위해 혈관벽으로부터 간으로 수송되는 경로이며, 따라서 아테롬성동맥경화증을 예방한다. RCT의 주요 구성요소는 수용체, 예컨대 고-밀도 지단백질 (HDL) 및 아포지단백질 A-I (ApoA-I), 및 효소, 예컨대 레시틴:콜레스테롤 아실트랜스페라제 (LCAT), 인지질 전달 단백질

(PLTP), 간 리파제 (HL) 및 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP)을 포함한다. RCT의 중요한 부분은 축적된 콜레스테롤이 예를 들어, 혈관벽의 내막하에서 대식세포로부터, ATP-결합 막 카세트 수송체 A1 (ABCA1) 및 G1 (ABCG1)에 의해, 또는 수동 확산, 스캐빈저 수송체 B1 (SR-B1), 카베올린 및 스테롤 27-히드록실라제를 비롯한 다른 메커니즘에 의해 제거되고, HDL 및 ApoA-I에 의해 수집되는 콜레스테롤 유출이다. 그 후, HDL 중의 에스테르화된 콜레스테롤은 배설을 위해 간으로 전달된다. 스테롤 조절 요소 결합 인자 1 유전자 (SREBP1)는 지방산 및 콜레스테롤의 생합성을 조절함으로써 RCT에 영향을 미친다.

- [0135] 본 개시내용은 부분적으로 HDL 치료제로의 치료에 대한 IUSDEC-유형 반응의 발견에 기초한다. 본 개시내용은 추가로 부분적으로 HDL 치료제 IUSDEC의 근원적인 작용의 메커니즘, 즉, HDL 치료제로의 치료에 대한 반응으로 콜레스테롤 유출에 관여하는 단백질 (본원에서 HDL 마커로 지칭됨) (예를 들어, ABCA1, ABCG1)의 발현의 하향조절, 또는 RCT 경로 (예를 들어, SREBP1)의 조절의 발견에 기초한다. 이러한 단백질의 하향조절은 HDL 치료제로의 치료에 대한 반응에서 IUSDEC와 상관되는 것으로 밝혀졌다.
- [0136] 본 개시내용은 부분적으로 변곡점, 즉, 용량-반응 관계가 최대화되는 곳 근처의 용량-반응 곡선에서의 용량을 이용하기 위해 진단하고, 예측하고, HDL 치료제를 용량 최적화하는데 이 현상을 사용하는 것에 관한 것이다.
- [0137] 본 개시내용은 부분적으로 과량의 HDL 치료제를 사용하지 않으면서 변곡점, 즉, 용량-반응 관계가 최적화되는 곳 근처의 용량-반응 곡선에서의 용량을 이용하기 위해 진단하고, 예측하고, HDL 치료제를 용량 최적화하는데 이 현상을 사용하는 것에 관한 것이다.
- [0138] 다른 측면에서, 본 개시내용은 예를 들어, 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포로부터의 콜레스테롤 유출을 매개하는데 있어서 HDL 마커의 발현 및/또는 기능에 대한 영향을 최소화하는 치료제 용량 및 투약 스케줄의 확인에 관한 것이다. 일부 측면에서, 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 한정된 컷오프점, 예를 들어, HDL 마커의 참조량의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 초과만큼 감소시키지 않는 용량이 선택된다. 특정 실시양태에서, 컷오프는 상기 컷오프량 중 임의의 2개에 의해 경계된 참조물의 임의의 범위, 예를 들어, 20% 내지 80%, 30% 내지 70%, 40% 내지 60%, 50% 내지 50%, 10% 내지 40%, 20% 내지 50% 등으로부터 선택되며, 20% 내지 80% 범위일 수 있다. 참조물은 대상체 자신의 기준선 또는 일부 집단 평균일 수 있다. 집단은 연령-, 성별- 및/또는 질환 위험 인자 (예를 들어, 유전적 또는 생활방식 위험 인자) 매칭된 집단일 수 있다. 집단 평균은 정상적인 집단 또는 대상체와 동일하거나 유사한 상태를 앓고 있는 집단일 수 있다. 특정 HDL 마커 및 컷오프점은 특정 HDL 치료제, 대상체의 상태, 및 대상체가 받고 있을 수 있는 다른 요법에 의존할 것이다.
- [0139] 일부 측면에서, 특히 조합 요법이 포함되는 경우, 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 20% 초과, 일부 실시양태에서 10% 이하만큼 감소시키지 않는, 및 더 다른 실시양태에서 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 전혀 감소시키지 않는 용량이 선택된다.
- [0140] 본원에 기재된 바와 같은 HDL 마커의 사용은 섹션 6.6의 임의의 치료 방법을 최적화하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 제1 용량을 대상체에게 투여하고, (b) 상기 제1 용량을 투여한 후, 대상체로부터의 시험 샘플, 바람직하게는 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고; (c) (i) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 제1 용량보다 낮은 상기 HDL 치료제의 제2 용량을 투여하거나; 또는 (ii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되지 않는 경우, 대상체를 상기 HDL 치료제의 제1 용량으로 치료하는 것을 포함한다.
- [0141] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에서의 HDL 치료제의 효능의 모니터링 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) 대상체를 제1 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 치료하고, (b) 대상체로부터의 시험 샘플, 바람직하게는 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 투약 스케줄의 효과를 평가하고; (c) (i) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 상한 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 보다 낮은 용량의 HDL 치료제를 투여하는 것, 보다 긴 기간에 걸쳐 HDL 치료제를 대상체 내로 주입하는 것, 및 보다 적은 빈도 기준으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하는 것 중 하나 이상을 포함하는 제2 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 대상체를 치료하거나; (ii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 하한 컷오프량 초과만큼 감소되지 않는 경우, 보다 높은 용량의 HDL 치료제를 투여하는 것, 보다 짧은 기간에 걸쳐 HDL 치료제를 대상체 내로 주입하는 것, 및 보다 많은 빈도 기준으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하는 것 중 하나 이상을 포함하는 제2 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 대상

체를 치료하거나; 또는 (iii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 상한 및 하한 컷오프랑 사이의 양만큼 감소되는 경우, 대상체를 제1 투약 스케줄에 따라 치료하기를 계속하는 것을 포함한다.

- [0142] 컷오프랑은 상기 투여 이전의 대상체 자신의 기준선에 상대적일 수 있거나, 컷오프랑은 대조량, 예컨대 예를 들어, 건강한 대상체 또는 대상체와 동일한 질환 상태를 갖는 집단으로부터의 집단 평균에 상대적일 수 있다.
- [0143] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 제1 용량을 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 상기 제1 용량을 투여한 후, 대상체로부터의 시험 샘플, 바람직하게는 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고; (c) 제1 용량보다 높거나 낮은 상기 HDL 치료제의 제2 용량을 투여하고; (d) 상기 제2 용량을 투여한 후, 대상체로부터의 시험 샘플, 바람직하게는 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고; (e) 임의로 단계 (c) 및 (d)를 상기 HDL 치료제의 하나 이상의 추가의 용량으로 반복하고; (f) 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 컷오프랑 초과만큼 감소시키지 않는 최고 용량을 확인함으로써, 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 상기 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함한다.
- [0144] 특정 실시양태에서, 상기 제2 용량의 투여 후, 상기 시험 샘플 (예를 들어, 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포)에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제2 용량의 효과를 평가한다. 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프랑 초과만큼 감소되는 경우, 상기 HDL 치료제의 제3 용량이 투여될 수 있으며, 여기서 상기 HDL 치료제의 제3 용량은 제2 용량보다 낮다.
- [0145] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) 상기 대상체로부터의 시험 샘플 (예를 들어, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포)에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 대상체의 기준선량에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량으로의 지단백질 복합체; 및 (b) 담즙-산 수치, 니아신, 스타틴, 피브레이트, PCSK9 억제제, 에제티미브, 및 CETP 억제제로부터 임의로 선택되는 콜레스테롤 감소 요법의 조합을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0146] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) 상기 대상체로부터의 시험 샘플 (예를 들어, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포)에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 대조량에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량으로의 지단백질 복합체; 및 (b) 담즙-산 수치, 니아신, 스타틴, 피브레이트, PCSK9 억제제, 에제티미브, 및 CETP 억제제로부터 임의로 선택되는 콜레스테롤 감소 요법의 조합을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0147] 대조량은 집단 평균, 예를 들어, 건강한 대상체 또는 대상체와 동일한 질환 상태를 갖는 집단으로부터의 집단 평균일 수 있다. 대상체는 인간일 수 있거나, 대상체의 집단은 인간 대상체의 집단이다. 대상체는 비-인간 동물, 예를 들어, 마우스일 수 있거나, 대상체의 집단은 비-인간 동물의 집단일 수 있다.
- [0148] 본원에 기재된 방법의 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 HDL 마커는 ABCA1이다. 예를 들어, ABCA1 mRNA 발현 수준 또는 ABCA1 단백질 발현 수준이 측정된다. ABCA1 컷오프랑은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%이거나, 상기 컷오프랑 중 임의의 2개에 의해 경계된 임의의 범위, 예를 들어, 20% 내지 80%, 30% 내지 70%, 40% 내지 60%, 10% 내지 50%, 10% 내지 40%, 20% 내지 50% 등으로부터 선택될 수 있다. ABCA1 발현 수준은 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정될 수 있다.
- [0149] 본원에 기재된 방법의 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 HDL 마커는 ABCG1이다. 예를 들어, ABCG1 mRNA 발현 수준 또는 ABCG1 단백질 발현 수준이 측정된다. ABCG1 컷오프랑은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%이거나, 상기 컷오프랑 중 임의의 2개에 의해 경계된 임의의 범위, 예를 들어, 20% 내지 80%, 30% 내지 70%, 40% 내지 60%, 10% 내지 50%, 10% 내지 40%, 20% 내지 50% 등으로부터 선택될 수 있다. ABCG1 발현 수준은 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정될 수 있다.
- [0150] 본원에 기재된 방법의 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 HDL 마커는 SREBP-1이다. 예를 들어, SREBP-1 mRNA 발현 수준 또는 SREBP-1 단백질 발현 수준이 측정된다. SREBP-1 컷오프랑은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%이거나, 상기 컷오프랑 중 임의의 2개에 의해 경계된 임의의 범위, 예를 들어, 20% 내지

80%, 30% 내지 70%, 40% 내지 60%, 10% 내지 50%, 10% 내지 40%, 20% 내지 50% 등으로부터 선택될 수 있다. SREBP-1 발현 수준은 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정될 수 있다.

[0151] 일부 실시양태에서, 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 변경하지 않거나, 또는 심지어 증가시키는 용량이 확인된다. 수준은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 경계된 범위에서 증가될 수 있으며, 예를 들어, 수준은 10% 이하, 20% 이하, 50% 이하, 10% 내지 50%, 20% 내지 60% 등 증가될 수 있다.

[0152] 특정 실시양태에서, HDL 치료제는 지단백질 복합체이다. 지단백질 복합체는 아포지단백질, 예컨대 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoE 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 지단백질 복합체는 아포지단백질 펩티드 모방체, 예컨대 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, 또는 ApoE 펩티드 모방체 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 지단백질 복합체는 CER-001, CSL-111, CSL-112, CER-522, 또는 ETC-216일 수 있다. 다른 실시양태에서, HDL 치료제는 탈지질화된 또는 지질 부족 지단백질이다.

[0153] 특정 실시양태에서, HDL 치료제는 소분자, 예컨대 CETP 억제제 또는 판토텐산 유도체이다.

[0154] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 컷오프량을 측정하는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 컷오프량은 HDL 치료제에 대한 용량 반응 곡선을 생성함으로써 측정될 수 있다. 컷오프량은 용량 반응 곡선의 변곡점에서의 HDL 마커의 발현 수준의 25%, 40%, 50%, 60% 또는 75%일 수 있다. 특정 실시양태에서, 컷오프는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 경계된 범위, 예를 들어, 용량 반응 곡선의 변곡점에서의 HDL 마커의 발현 수준의 30% 내지 70%, 40% 내지 60%, 25% 내지 50%, 25% 내지 75% 등으로부터 선택된다.

[0155] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체에게 투여하고; (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고; (c) 상기 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 상승시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함한다.

[0156] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고; (c) 상기 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 상승시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함한다.

[0157] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 HDL 치료제의 최고 용량을 확인하는 것을 포함한다. 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법은 (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함할 수 있다.

[0158] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 요법에 적합한 HDL 치료제의 투약 간격의 확인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 HDL 치료제의 가장 빈번한 투약 처방의 최고 용량을 확인하는 것을 포함한다. 요법에 적합한 HDL 치료제의 투약 간격의 확인 방법은 (a) HDL 치료제를 하나 이상의 투약 빈도에 따라 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 50% 내지 100% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 투약 빈도를 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함할 수 있다.

[0159] 6.3.HDL 치료제

[0160] 본 개시내용의 HDL 치료제는 지단백질 복합체, 탈지질화된 또는 지질 부족 지단백질, 펩티드, 융합 단백질 및 HDL 모방체를 포함한다. "지단백질" 및 "아포지단백질"은 본원에서 호환적으로 사용됨을 유념한다.

- [0161] 지단백질 복합체는 단백질 분획 (예를 들어, 아포지단백질 분획) 및 지질 분획 (예를 들어, 인지질 분획)을 포함할 수 있다. 단백질 분획은 지단백질 복합체에 존재하는 경우 콜레스테롤을 동원할 수 있는 1종 이상의 지질-결합 단백질, 예컨대 아포지단백질, 펩티드, 또는 아포지단백질 펩티드 유사체 또는 모방체를 포함한다. 이러한 아포지단백질 및 아포지단백질 펩티드의 비-제한적 예로는 바람직하게는 성숙 형태의 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V 및 ApoE를 들 수 있다. 지질-결합 단백질은 또한 활성 다형성 형태, 이소형, 변이체 및 돌연 변이체 뿐만 아니라 상기 아포지단백질의 말단절단된 형태이며, 이들 중 가장 통상적인 것은 아포지단백질 A-I_릴라노 (ApoA-I_M), 아포지단백질 A-I_{파리} (ApoA-I_P), 및 아포지단백질 A-I_{사라고사} (ApoA-I_Z)이다. 시스테인 잔기를 함유하는 아포지단백질 돌연변이체가 또한 공지되어 있으며, 또한 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 공개 제 2003/0181372호 참조). 아포지단백질은 단량체, 또는 동종이량체 또는 이종이량체일 수 있는 이량체의 형태일 수 있다. 예를 들어, ApoA-I (Duverger *et al.*, 1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(12):1424-29), ApoA-I_M (Franceschini *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260:1632-35), ApoA-I_P (Daum *et al.*, 1999, J. Mol. Med. 77:614-22), ApoA-II (Shelness *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260(14):8637-46; Shelness *et al.*, 1984, J. Biol. Chem. 259(15):9929-35), ApoA-IV (Duverger *et al.*, 1991, Euro. J. Biochem. 201(2):373-83), ApoE (McLean *et al.*, 1983, J. Biol. Chem. 258(14):8993-9000), ApoJ 및 ApoH의 동종- 및 이종이량체 (실현가능한 경우)가 사용될 수 있다.
- [0162] 아포지단백질은 복합체에 포함되는 경우 아포지단백질이 일부 생물학적 활성을 보유하는 한, 그의 단리를 용이하게 하는 요소, 예컨대 His 태그, 또는 다른 목적을 위해 설계된 다른 요소에 상응하는 잔기를 포함할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 아포지단백질 분획은 본질적으로 ApoA-I로, 가장 바람직하게는 단일 이소형으로 이루어진다. 지단백질 복합체 중의 ApoA-I은 도 64의 ApoA-I 지단백질의 아미노산 25 내지 267에 상응하는 단백질 (서열식별번호: 1)과 적어도 90% 또는 적어도 95% 서열 동일성을 가질 수 있다. 임의로, ApoA-I은 서열식별번호: 1의 전장 ApoA-I 아미노산 25에 상응하는 위치 (및 성숙 단백질의 위치 1)에서 아스파르트산을 추가로 포함한다. 바람직하게는, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 ApoA-I은 성숙 단백질 (즉, 신호 및 프로펩티드 서열이 결여됨)로 정확하게 프로세싱되며, 산화, 및/또는 탈아미드화 및/또는 말단절단되지 않는다.
- [0163] 아포지단백질에 상응하는 펩티드 및 펩티드 유사체, 뿐만 아니라 ApoA-I, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, 및 ApoE의 활성을 모방하는 효능제가 사용될 수 있다. 펩티드 및 펩티드 유사체의 비-제한적 예는 미국 특허 제 6,004,925호, 제6,037,323호 및 제6,046,166호 (다세옥스 (Dasseux) 등에게 허여됨), 미국 특허 제5,840,688호 (츠 (Tso)에게 허여됨), 미국 공개 제2004/0266671호, 제2004/0254120호, 제2003/0171277호 및 제2003/0045460호 (포겔만 (Fogelman)에게), 미국 공개 제2003/0087819호 (비엘리키에게) 및 PCT 공개 제W02010/093918호 (다세옥스 등에게)에 개시되어 있으며, 이들의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 이들 펩티드 및 펩티드 유사체는 L-아미노산 또는 D-아미노산 또는 L- 및 D-아미노산의 혼합물로 구성될 수 있다. 이는 또한 하나 이상의 비-펩티드 또는 아미드 연결, 예컨대 하나 이상의 널리 공지된 펩티드/아미드 동배체를 포함할 수 있다. 이러한 "펩티드 및/또는 펩티드 모방체" 아포지단백질은 예를 들어, 미국 특허 제6,004,925호, 제6,037,323호 및 제6,046,166호에 기재된 기술을 비롯한 관련 기술분야에 공지된 펩티드 합성을 위한 임의의 기술을 사용하여 합성 또는 제조될 수 있다.
- [0164] 지단백질은 탈지질화된 형태로, 또는 단백질 분획에 추가로 지질 분획을 함유하는 지단백질 복합체로 HDL 치료제로서 사용될 수 있다. 지질 분획은 전형적으로 중성이거나, 음으로 하전되거나, 양으로 하전되거나, 또는 그의 조합일 수 있는 1종 이상의 인지질을 포함한다. 인지질 상의 지방산쇄는 바람직하게는 길이가 12 내지 26 또는 16 내지 26 탄소이며, 포화된 것부터 단일-불포화된 것까지 포화도가 다양할 수 있다. 예시적인 인지질로는 작은 알킬쇄 인지질, 달걀 포스파티딜콜린, 대두 포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린, 디미리스토일포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린, 1-미리스토일-2-팔미토일포스파티딜콜린, 1-팔미토일-2-미리스토일포스파티딜콜린, 1-팔미토일-2-스테아로일포스파티딜콜린, 1-스테아로일-2-팔미토일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 디올레오포스파티딜에탄올아민, 디라우로일포스파티딜글리세롤 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜글리세롤, 디포스파티딜글리세롤, 예컨대 디미리스토일포스파티딜글리세롤, 디팔미토일포스파티딜글리세롤, 디스테아로일포스파티딜글리세롤, 디올레오일포스파티딜글리세롤, 디미리스토일포스파티드산, 디팔미토일포스파티드산, 디미리스토일포스파티딜에탄올아민, 디팔미토일포스파티딜에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜세린, 디팔미토일포스파티딜세린, 뇌 포스파티딜세린, 뇌 스펅고미엘린, 달걀 스펅고미엘린, 유액 스펅고미엘린, 팔미토일 스펅고미엘린, 피토스펙고미엘린, 디팔미토일스펙고미엘린, 디스테아로일스펙고미엘린, 디팔미토일포스파티딜글리세롤 염, 포스파티드산, 갈락토세레브로시드,

강글리오시드, 세레브로시드, 디라우틸포스파티딜콜린, (1,3)-D-만노실-(1,3)디글리세리드, 아미노페닐글리코시드, 3-콜레스테릴-6'-(글리코실티오)핵심 에테르 당지질, 및 콜레스테롤 및 그의 유도체를 들 수 있다. SM 및 팔미토일스핑고미엘린을 포함하는 인지질 분획은 임의로 리소인지질, 팔미토일스핑고미엘린 이외의 스펡고미엘린, 갈락토세레브로시드, 강글리오시드, 세레브로시드, 글리세리드, 트리글리세리드, 및 콜레스테롤 및 그의 유도체를 포함하나 이에 제한되지 않는 소량의 임의의 유형의 지질을 포함할 수 있다.

[0165] 특정 실시양태에서, 지질 분획은 적어도 1종의 중성 인지질, 및 임의로, 1종 이상의 음으로 하전된 인지질을 함유한다. 중성 및 음으로 하전된 인지질 둘 다를 포함하는 지단백질 복합체에서, 중성 및 음으로 하전된 인지질은 동일하거나 상이한 수의 탄소 및 동일하거나 상이한 포화도를 갖는 지방산 쇄를 가질 수 있다. 일부 예에서, 중성 및 음으로 하전된 인지질은 동일한 아실 꼬리, 예를 들어 C16:0, 또는 팔미토일, 아실 쇄를 가질 것이다. 구체적인 실시양태에서, 특히 달걀 SM이 중성 지질로서 사용되는 것들에서, 아포지단백질 분획:지질 분획의 중량 비는 약 1:2.7 내지 약 1:3 (예를 들어, 1:2.7) 범위이다.

[0166] 생리학적 pH에서 적어도 부분적 음전하를 갖는 임의의 인지질은 음으로 하전된 인지질로서 사용될 수 있다. 비-제한적 예로는 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤 및 포스파티드산의 음으로 하전된 형태, 예를 들어, 염을 들 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 음으로 하전된 인지질은 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 또는 DPPG, 포스파티딜글리세롤이다. 바람직한 염으로는 칼륨 및 나트륨 염을 들 수 있다.

[0167] 일부 실시양태에서, HDL 치료제는 미국 특허 제8,206,750호 또는 WO 2012/109162 (및 그의 미국 대응출원 US 2012/0232005)에 기재된 지단백질 복합체이며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 특정 실시양태에서, 지단백질 복합체의 단백질 성분은 WO 2012/109162 (및 US 2012/0232005)의 섹션 6.1에, 및 바람직하게는 섹션 6.1.1에 기재된 바와 같고, 지질 성분은 WO 2012/109162 (및 US 2012/0232005)의 섹션 6.2에 기재된 바와 같으며, 이는 임의로 WO 2012/109162 (및 US 2012/0232005)의 섹션 6.3에 기재된 양으로 함께 복합체화될 수 있다. 이들 섹션의 각각의 내용은 본원에 참조로 포함된다. 특정 측면에서, 지단백질 복합체는 WO 2012/109162 (및 US 2012/0232005)의 섹션 6.4 (그의 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 균질성인 복합체의 집단에 있다.

[0168] 구체적인 실시양태에서, 지단백질 복합체는 본질적으로 2 내지 4 ApoA-I 당량, 2 분자의 하전된 인지질, 50 내지 80 분자의 레시틴 및 20 내지 50 분자의 SM으로 이루어진다.

[0169] 또다른 구체적인 실시양태에서, 지단백질 복합체는 본질적으로 2 내지 4 ApoA-I 당량, 2 분자의 하전된 인지질, 50 분자의 레시틴 및 50 분자의 SM으로 이루어진다.

[0170] 더 또다른 구체적인 실시양태에서, 지단백질 복합체는 본질적으로 2 내지 4 ApoA-I 당량, 2 분자의 하전된 인지질, 80 분자의 레시틴 및 20 분자의 SM으로 이루어진다.

[0171] 더 또다른 구체적인 실시양태에서, 지단백질 복합체는 본질적으로 2 내지 4 ApoA-I 당량, 2 분자의 하전된 인지질, 70 분자의 레시틴 및 30 분자의 SM으로 이루어진다.

[0172] 더 또다른 구체적인 실시양태에서, 지단백질 복합체는 본질적으로 2 내지 4 ApoA-I 당량, 2 분자의 하전된 인지질, 60 분자의 레시틴 및 40 분자의 SM으로 이루어진다.

[0173] 구체적인 실시양태에서, 지단백질 복합체는 지질 성분이 본질적으로 약 90 내지 99.8 중량% SM 및 약 0.2 내지 10 중량% 음으로 하전된 인지질, 예를 들어, 약 0.2 내지 1 중량%, 0.2 내지 2 중량%, 0.2 내지 3 중량%, 0.2 내지 4 중량%, 0.2 내지 5 중량%, 0.2 내지 6 중량%, 0.2 내지 7 중량%, 0.2 내지 8 중량%, 0.2 내지 9 중량%, 또는 0.2 내지 10 중량% 총 음으로 하전된 인지질(들)로 이루어진 3성분 복합체이다. 또다른 구체적인 실시양태에서, 지단백질 복합체는 지질 분획이 본질적으로 약 90 내지 99.8 중량% 레시틴 및 약 0.2 내지 10 중량% 음으로 하전된 인지질, 예를 들어, 약 0.2 내지 1 중량%, 0.2 내지 2 중량%, 0.2 내지 3 중량%, 0.2 내지 4 중량%, 0.2 내지 5 중량%, 0.2 내지 6 중량%, 0.2 내지 7 중량%, 0.2 내지 8 중량%, 0.2 내지 9 중량% 또는 0.2 내지 10 중량% 총 음으로 하전된 인지질(들)로 이루어진 3성분 복합체이다.

[0174] 더 또다른 구체적인 실시양태에서, 지단백질 복합체는 지질 분획이 본질적으로 약 9.8 내지 90 중량% SM, 약 9.8 내지 90 중량% 레시틴 및 약 0.2 내지 10 중량% 음으로 하전된 인지질, 예를 들어, 약 0.2 내지 1 중량%, 0.2 내지 2 중량%, 0.2 내지 3 중량%, 0.2 내지 4 중량%, 0.2 내지 5 중량%, 0.2 내지 6 중량%, 0.2 내지 7 중량%, 0.2 내지 8 중량%, 0.2 내지 9 중량%, 내지 0.2 내지 10 중량% 총 음으로 하전된 인지질

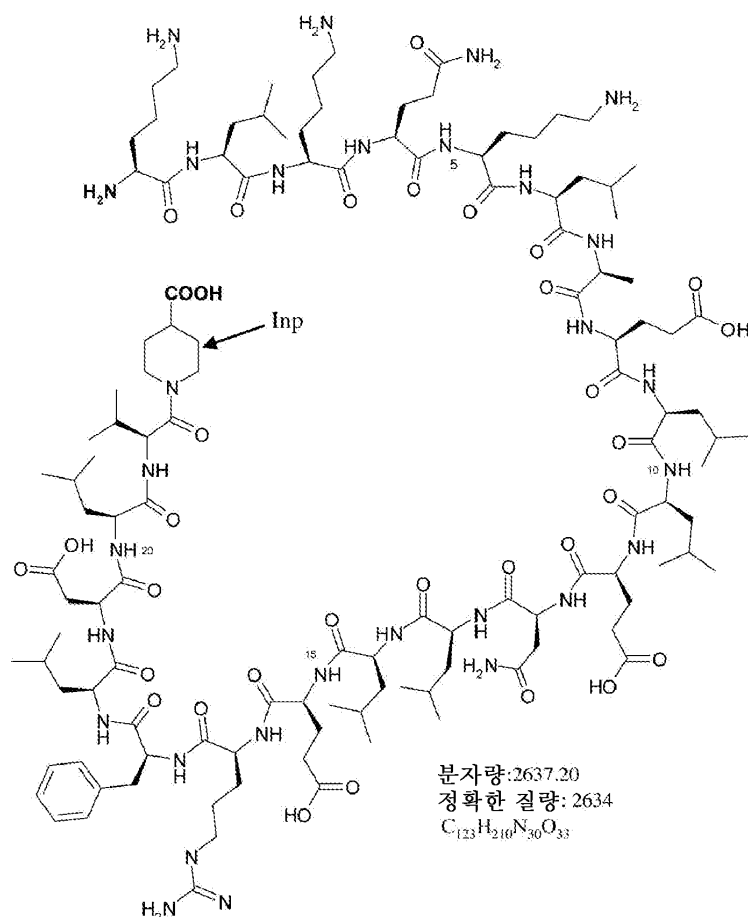
(들)로 이루어진 4성분 복합체이다.

- [0175] 또다른 구체적인 실시양태에서, 지단백질 복합체는 33 중량% 프로ApoA-I, 65 중량% 스펡고미엘린 및 2 중량% 포스파티딜글리세롤로 이루어진다.
- [0176] 또다른 구체적인 실시양태에서, 지단백질 복합체는 ApoA-I 아포지단백질 및 지질 분획을 포함하며, 여기서 지질 분획은 본질적으로 스펡고미엘린 및 약 3 중량%의 음으로 하전된 인지질로 이루어지고, 지질 분획 대 ApoA-I 아포지단백질의 몰 비는 약 2:1 내지 200:1이고, 상기 지단백질 복합체는 2 내지 4 ApoA-I 당량을 함유하는 작은 또는 큰 원반형 입자이다.
- [0177] 복합체는 단일 유형의 지질-결합 단백질, 또는 동일하거나 상이한 종으로부터 유래될 수 있는 2종 이상의 상이한 지질-결합 단백질의 혼합물을 포함할 수 있다. 요구되지는 않지만, 지단백질 복합체는 바람직하게는 요법에 대한 면역 반응을 유도하는 것을 회피하기 위해, 치료되는 동물 종으로부터 유래되거나, 그에 대한 아미노산 서열에 상응하는 지질-결합 단백질을 포함할 것이다. 따라서, 인간 환자의 치료를 위해, 인간 기원의 지질-결합 단백질이 본 개시내용의 복합체에 바람직하게 사용된다. 펩티드 모방체 아포지단백질의 사용은 또한 면역 반응을 감소시키거나 회피할 수 있다.
- [0178] 바람직한 실시양태에서, 지질 성분은 2가지 유형의 인지질: 스펡고미엘린 (SM) 및 음으로 하전된 인지질을 포함한다. SM은 그것이 생리학적 pH에서 약 0의 순 전하를 갖는다는 점에서 "중성" 인지질이다. 따라서, 본원에 사용된 표현 "SM"은 천연 공급원으로부터 유래되거나 얻어진 스펡고미엘린, 뿐만 아니라 천연 발생 SM이 그러하듯이 LCAT에 의한 가수분해에 영향받지 않는 천연 발생 SM의 유사체 및 유도체를 포함한다.
- [0179] SM은 사실상 임의의 공급원으로부터 얻어질 수 있다. 예를 들어, SM은 유액, 달걀 또는 버로부터 얻어질 수 있다. SM 유사체 또는 유도체가 또한 사용될 수 있다. 유용한 SM 유사체 및 유도체의 비-제한적 예로는 팔미토일스핑고미엘린, *N*-팔미토일-4-히드록시스핑가닌-1-포스포콜린 (피토스핑고미엘린의 형태), 팔미토일스핑고미엘린, 스테아로일스핑고미엘린, D-에리트로-N-16:0-스핑고미엘린 및 그의 디히드로 이성질체, D-에리트로-N-16:0-디히드로-스핑고미엘린을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 합성 SM, 예컨대 합성 팔미토일스핑고미엘린 또는 *N*-팔미토일-4-히드록시스핑가닌-1-포스포콜린 (피토스핑고미엘린)은 동물 기원의 스펡고지질보다 더 균질한 복합체를 생성하고, 더 적은 오염물 및/또는 산화 생성물을 갖기 위해 사용될 수 있다.
- [0180] 천연 공급원으로부터 단리된 스펡고미엘린은 하나의 특정 포화 또는 불포화 아실 쇠에서 인공적으로 풍부화될 수 있다. 예를 들어, 유액 스펡고미엘린 (아반티 포스포리피드 (Avanti Phospholipid), 미국 알라바마주 알라바스터)은 긴 포화 아실 쇠 (즉, 20개 이상의 탄소 원자를 갖는 아실 쇠)를 특징으로 한다. 대조적으로, 달걀 스펡고미엘린은 짧은 포화 아실 쇠 (즉, 20개 미만의 탄소 원자를 갖는 아실 쇠)를 특징으로 한다. 예를 들어, 단지 약 20%의 유액 스펡고미엘린은 C16:0 (16 탄소, 포화) 아실 쇠를 포함하는 반면, 약 80%의 달걀 스펡고미엘린은 C16:0 아실 쇠를 포함한다. 용매 추출을 사용하여, 유액 스펡고미엘린의 조성은 달걀 스펡고미엘린의 것과 필적하는 아실 쇠 조성을 갖도록 풍부화될 수 있거나, 반대로 또한 같다.
- [0181] SM은 특정 아실 쇠를 갖도록 반-합성적일 수 있다. 예를 들어, 유액 스펡고미엘린을 먼저 유액으로부터 정제할 수 있고, 그 후 하나의 특정 아실 쇠, 예를 들어, C16:0 아실 쇠를 절단하고, 또다른 아실 쇠로 대체할 수 있다. SM은 또한 예를 들어, 대규모 합성에 의해 전적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 1993년 6월 15일에 허여된 발명의 명칭이 D-에리트로-스핑고미엘린의 합성인 동 (Dong) 등의 미국 특허 제5,220,043호; 문헌 [Weis, 1999, Chem. Phys. Lipids 102 (1-2):3-12]을 참조한다.
- [0182] 반-합성 또는 합성 SM을 포함하는 아실 쇠의 길이 및 포화 수준은 선택적으로 다양화될 수 있다. 아실 쇠는 포화 또는 불포화일 수 있으며, 약 6개 내지 약 24개의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 각각의 쇠는 동일한 수의 탄소 원자를 함유할 수 있거나, 대안적으로 각각의 쇠는 상이한 수의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반-합성 또는 합성 SM은 하나의 쇠는 포화되고, 하나의 쇠는 불포화되도록 혼합된 아실 쇠를 포함한다. 이러한 혼합된 아실 쇠 SM에서, 쇠 길이는 동일하거나 상이할 수 있다. 다른 실시양태에서, 반-합성 또는 합성 SM의 아실 쇠는 둘 다 포화되거나, 둘 다 불포화될 수 있다. 다시, 쇠는 동일하거나 상이한 수의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반-합성 또는 합성 SM을 포함하는 둘 다의 아실 쇠는 동일하다. 구체적인 실시양태에서, 쇠는 천연-발생 지방산, 예컨대 예를 들어 미리스트산, 올레산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 또는 아라키돈산의 아실 쇠에 상응한다. 또다른 실시양태에서, 포화 또는 불포화 관능화된 쇠를 갖는 SM이 사용된다. 또다른 구체적인 실시양태에서, 둘 다의 아실 쇠는 포화되고, 6 내지 24개의 탄소 원자를 갖는다.

- [0183] 바람직한 실시양태에서, SM은 C16:0 아실 쇠를 갖는 팔미토일 SM, 예컨대 합성 팔미토일 SM이거나, 주요 성분으로서 팔미토일 SM을 포함하는 달걀 SM이다.
- [0184] 구체적인 실시양태에서, 관능화된 SM, 예컨대 피토스핑고미엘린이 사용된다.
- [0185] 지질 성분은 바람직하게는 음으로 하전된 인지질, 즉, 생리학적 pH에서 순 음전하를 갖는 인지질을 포함한다. 음으로 하전된 인지질은 단일 유형의 음으로 하전된 인지질, 또는 2종 이상의 상이한 음으로 하전된 인지질의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하전된 인지질은 음으로 하전된 글리세로인지질이다. 적합한 음으로 하전된 인지질의 구체적인 예로는 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-[포스포-*rac*-(1-글리세롤)], 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜세린, 및 포스파티드산을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 음으로 하전된 인지질은 1종 이상의 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤 및/또는 포스파티드산을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 음으로 하전된 인지질은 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-[포스포-*rac*-(1-글리세롤)], 또는 DPPG로 이루어진다.
- [0186] SM과 같이, 음으로 하전된 인지질은 천연 공급원으로부터 얻어지거나, 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. 합성 음으로 하전된 인지질을 채용하는 실시양태에서, 아실 쇠의 정체성은 SM에 관해 상기 논의된 바와 같이 선택적으로 다양화될 수 있다. 본원에 기재된 음으로 하전된 지단백질 복합체의 일부 실시양태에서, 음으로 하전된 인지질 상의 둘 다의 아실 쇠는 동일하다. 일부 실시양태에서, SM 및 음으로 하전된 인지질 상의 아실 쇠는 모두 동일하다. 구체적인 실시양태에서, 음으로 하전된 인지질(들), 및/또는 SM은 모두 C16:0 또는 C16:1 아실 쇠를 갖는다. 구체적인 실시양태에서, SM의 지방산 모이어티는 우세하게 C16:1 팔미토일이다. 한 구체적인 실시양태에서, 하전된 인지질(들) 및/또는 SM의 아실 쇠는 팔미트산의 아실 쇠에 상응한다.
- [0187] 사용되는 인지질은 바람직하게는 적어도 95% 순수하고/거나, 감소된 수준의 산화제를 갖는다. 천연 공급원으로부터 얻어진 지질은 바람직하게는 보다 적은 고도불포화 지방산 모이어티 및/또는 산화에 감수성이지 않은 지방산 모이어티를 갖는다. 샘플에서의 산화의 수준은 meq O/kg으로 약칭되는, 샘플의 kg 당 단리되는 아이오딘의 밀리-당량 수로 표현되는 과산화물 값을 제공하는 아이오드적정 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Gray, J.I., Measurement of Lipid Oxidation: A Review, Journal of the American Oil Chemists Society, Vol. 55, p. 539-545 (1978)]; [Heaton, F.W. and Uri N., Improved Iodometric Methods for the Determination of Lipid Peroxides, Journal of the Science of food and Agriculture, vol 9. P, 781-786 (1958)]을 참조한다. 바람직하게는, 산화의 수준, 또는 과산화물 수준은 낮으며, 예를 들어, 5 meq O/kg 미만, 4 meq O/kg 미만, 3 meq O/kg 미만, 또는 2 meq O/kg 미만이다.
- [0188] SM 및 팔미토일스핑고미엘린을 포함하는 지질 성분은 임의로 소량의 추가의 지질을 포함할 수 있다. 사실상 리소인지질, 갈락토세레브로시드, 강글리오시드, 세레브로시드, 글리세리드, 트리글리세리드, 및 콜레스테롤 및 그의 유도체를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 유형의 지질이 사용될 수 있다.
- [0189] 포함되는 경우, 이러한 임의적 지질은 전형적으로 약 15 중량% 미만의 지질 분획을 포함할 것이지만, 일부 예에서는 보다 많은 임의적 지질이 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 임의적 지질은 약 10 중량% 미만, 약 5 중량% 미만, 또는 약 2 중량% 미만을 포함한다. 일부 실시양태에서, 지질 분획은 임의적 지질을 포함하지 않는다.
- [0190] 구체적인 실시양태에서, 인지질 분획은 달걀 SM 또는 팔미토일 SM 또는 피토스핑고미엘린 및 DPPG를 90:10 내지 99:1 범위, 보다 바람직하게는 95:5 내지 98:2 범위의 중량 비 (SM: 음으로 하전된 인지질)로 함유한다. 한 실시양태에서, 중량 비는 97:3이다.
- [0191] 지단백질 복합체는 또한 다양한 치료적 또는 진단적 적용을 위한 소수성, 친지질성 또는 무극성 활성제를 전달하는 운반체로서 사용될 수 있다. 이러한 적용을 위해, 지질 성분은 지방산, 약물, 핵산, 비타민, 및/또는 영양분을 포함하나 이에 제한되지 않는 1종 이상의 소수성, 친지질성 또는 무극성 활성제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 소수성, 친지질성 또는 무극성 활성제는 치료 범주에 의해 제한되지 않으며, 예를 들어, 진통제, 항-염증제, 구충제, 항-부정맥제, 항-박테리아제, 항-바이러스제, 항-응고제, 항-우울제, 항-당뇨병제, 항-간질제, 항-진균제, 항-통풍제, 항-고혈압제, 항-말라리아제, 항-편두통제, 항-무스카린제, 항-신생물제, 발기 기능 이상 개선제, 면역억제제, 항-원충제, 항-갑상선제, 항불안제, 진정제, 수면제, 신경이완제, β -차단제, 심장 수축제, 코르티코스테로이드, 이노제, 항-파킨슨제, 위-장관제, 히스타민 수용체 길항제, 각질용해제, 지질 조절제, 항-협심증제, cox-2 억제제, 류코트리엔 억제제, 마크롤리드, 근육 이완제, 영양제, 핵산 (예를 들어, 소간섭 RNA), 아편유사 진통제, 프로테아제 억제제, 성 호르몬, 자극제, 근육 이완제, 항-골다공증제, 항-비만제,

인지 향상제, 항-요실금제, 영양성 오일, 항-양성 전립선 비대증제, 필수 지방산, 비-필수 지방산, 및 이들의 혼합물일 수 있다.

- [0192] 지단백질 복합체의 지질 성분 대 단백질 성분의 몰 비는 다양할 수 있으며, 다른 인자 중에서도 단백질 성분을 포함하는 아포지단백질의 정체성(들), 지질 성분을 포함하는 지질의 정체성 및 양, 및 지단백질 복합체의 바람직한 크기에 의존할 것이다. 아포지단백질, 예컨대 ApoA-I의 생물학적 활성은 아포지단백질을 포함하는 양친매성 나선에 의해 매개되는 것으로 생각되기 때문에, ApoA-I 단백질 당량을 사용하여 지질:아포지단백질 몰 비의 아포지단백질 분율을 표현하는 것이 편리하다. 일반적으로, ApoA-I은 나선을 계산하는데 사용되는 방법에 따라 6 내지 10개의 양친매성 나선을 함유하는 것으로 받아들여진다. 다른 아포지단백질은 이들이 함유하는 양친매성 나선의 수에 기초한 ApoA-I 당량의 관점에서 표현될 수 있다. 예를 들어, 전형적으로 디솔피드-가교된 이량체로서 존재하는 ApoA-II은 ApoA-I의 각각의 분자가 ApoA-I의 분자보다 2배 많은 양친매성 나선을 함유하기 때문에, 2 ApoA-I 당량으로 표현될 수 있다. 역으로, 단일 양친매성 나선을 함유하는 펩티드 아포지단백질은 각각의 분자가 ApoA-I의 분자보다 1/10 내지 1/6의 양친매성 나선을 함유하기 때문에, 1/10 내지 1/6 ApoA-I 당량으로 표현될 수 있다. 일반적으로, 지단백질 복합체의 지질:ApoA-I 당량 몰 비 (본원에서 "Ri"로 정의됨)는 약 105:1 내지 110:1 범위일 것이다. 일부 실시양태에서, Ri는 약 108:1이다. 중량으로의 비는 인지질에 대해 대략 650 내지 800의 MW를 사용하여 얻어질 수 있다.
- [0193] 일부 실시양태에서, 지질:ApoA-I 당량의 몰 비 ("RSM")는 약 80:1 내지 약 110:1, 예를 들어, 약 80:1 내지 약 100:1 범위이다. 구체적인 예에서, 지단백질 복합체에 대한 RSM은 약 82:1일 수 있다.
- [0194] 바람직한 실시양태에서, 지단백질 복합체는 바람직하게는 성숙, 전장 ApoA-I인 단백질 분획, 및 중성 인지질, 스핑고미엘린 (SM), 및 음으로 하전된 인지질을 포함하는 지질 분획을 포함하는 음으로 하전된 지단백질 복합체이다.
- [0195] 구체적인 실시양태에서, 지질 성분은 달걀 SM 또는 팔미토일 SM 또는 피토SM 및 DPPG를 90:10 내지 99:1 범위, 보다 바람직하게는 95:5 내지 98:2 범위, 예를 들어, 97:3의 중량 비 (SM:음으로 하전된 인지질)로 함유한다.
- [0196] 구체적인 실시양태에서, 단백질 성분 대 지질 성분의 비는 전형적으로 약 1:2.7 내지 약 1:3 범위이며, 1:2.7이 바람직하다. 이는 대략 1:90 내지 1:140 범위의 ApoA-I 단백질 대 지질의 몰 비에 상응한다. 일부 실시양태에서, 지단백질 복합체 중의 단백질 대 지질의 몰 비는 약 1:90 내지 약 1:120, 약 1:100 내지 약 1:140, 또는 약 1:95 내지 약 1:125이다.
- [0197] 특정 실시양태에서, 복합체는 CER-001, CSL-111, CSL-112, CER-522 또는 ETC-216이다.
- [0198] CER-001은 ApoA-I, 스핑고미엘린 (SM) 및 DPPG를 97:3의 SM:DPPG 중량:중량 비를 갖는 1:2.7 지단백질 중량:총 인지질 중량 비로 포함한다. 바람직하게는, SM은 달걀 SM이지만, 합성 SM 또는 피토 SM으로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복합체는 WO 2012/109162의 실시예 4에 기재된 방법에 따라 제조된다.
- [0199] CSL-111은 대두 포스파티딜콜린 (SBPC)과 복합체화된 혈장으로부터 정제된 재구성된 인간 ApoA-I이다 (Tardif *et al.*, 2007, JAMA 297:1675-1682).
- [0200] CSL-112는 혈장으로부터 정제되고, 재구성되어 정맥내 주입에 적합한 HDL을 형성하는 ApoA-I의 제제이다 (Diditchenko *et al.*, 2013, DOI 10.1161/ATVBAHA.113.301981).
- [0201] ETC-216 (MDCO-216으로도 공지됨)은 재조합 ApoA-I_{펠라노}를 함유하는 HDL의 지질-고갈된 형태이다. 문헌 [Nicholls *et al.*, 2011, Expert Opin Biol Ther. 11(3):387-94. doi: 10.1517/14712598.2011.557061]을 참조한다.
- [0202] 또다른 실시양태에서, 복합체는 3개의 인지질 및 22 아미노산 펩티드, 즉, CT80522의 조합을 포함하는 지단백질 복합체인 CER-522이다:



CT80522

[0203]

[0204]

CER-522의 인지질 성분은 48.5:48.5:3 중량 비의 달걀 스펅고미엘린, 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린 (디팔미토일포스파티딜콜린, DPPC) 및 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-[포스포-*rac*-(1-글리세롤)] (디팔미토일포스파티딜-글리세롤, DPPG)로 이루어진다. CER-522 복합체 중 펩티드 대 총 인지질의 비는 1:2.5 (w/w)이다.

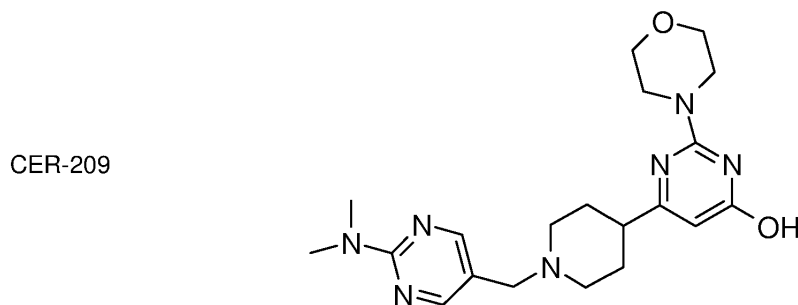
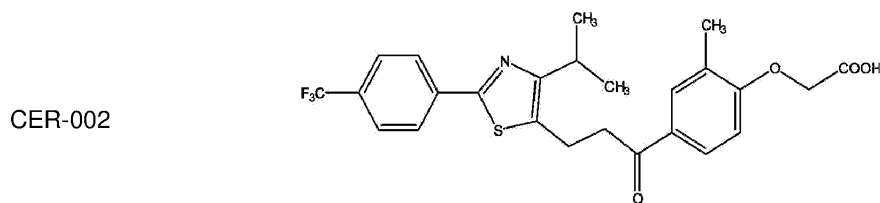
[0205]

| |
|---|
| HDL 치료제의 추가의 예로는 미국 특허 제8,617,615호; 제8,206,750호; 제8,378,068호; 제7,994,120호; 제7,566,695호; 제7,312,190호; 제7,307,058호; 제7,273,848호; 제7,250,407호; 제7,211,565호; 제7,189,689호; 제7,189,411호; 제7,157,425호; 제6,900,177호; 제6,844,327호; 제6,753,313호; 제6,734,169호; 제6,716,816호; 제6,630,450호; 제6,602,854호; 제6,573,239호; 제6,455,088호; 제6,376,464호; 제6,329,341호; 제6,287,590호; 제6,265,377호; 제6,046,166호; 제6,037,323호; 제6,004,925호; 제6,743,778호; 제8,383,592호; 제8,101,565호; 제8,044,021호; 제7,985,728호; 제7,985,727호; 제8,568,766; 제8,557,767호; 제8,404,635호; 제8,148,328호; 제8,048,851호; 제7,994,132호; 제7,820,784호; 제7,807,640호; 제7,723,303호; 제7,638,494호; 제7,531,514호; 제7,199,102호; 제7,166,578호; 제7,148,197호; 제7,144,862호; 제6,933,279호; 제6,930,085호; 제8,541,236호; 제8,148,323호; 제8,071,746호; 제7,572,771호; 제7,223,726호; 제8,163,699호; 제8,415,293호; 제7,691,965호; 제7,601,802호; 제7,439,323호; 제7,217,785호; 제8,158,601호; 제8,653,245호; 제8,557,962호; 제7,491,693호; 제7,749,315호; 제5,059,528호; 제RE38,556호; 제6,258,596호; 제5,866,551호; 제6,953,840호; 제8,119,590호; 제7,193,056호; 제6,767,994호; 제6,617,134; 제6,559,284호; 제6,454,950호; 제6,306,433호; 제6,107,467호; 제5,990,081호; 제5,876,968호; 제5,721,114호; 제8,343,932호; 제7,786,352호; 제8,536,117호; 제8,143,224호; 제7,781,219호; 제7,776,563호; 제7,390,504호; 제7,378,396호; 제6,897,039호; 제7,273,849호; 제8,637,460호; 제8,268,787호; 제8,048,851호; 제8,048,015호; 제8,030,281호; 제7,402,246호; 제7,393,826호; 제7,375,191호; 제7,361,739호; 제7,364,658호; 제7,361,739호; 제7,364,658호; 제7,361,739호; 제7,297,262호; 제7,297,261호; 제7,195,710호; |
|---|

제7,166,223호; 제7,033,500호; 제6,897,039호; 제8,252,739호; 제7,847,079호; 제7,592,010호; 제7,550,432호; 제7,521,424호; 제7,507,414호; 제7,507,413호; 제7,482,013호; 제7,238,667호; 제7,094,577호; 제7,081,354호; 제7,056,701호; 제7,045,318호; 제7,041,478호; 제6,994,857호; 제6,989,365호; 제6,987,006호; 제6,972,322호; 제6,946,134호; 제6,926,898호; 제6,909,014호; 제6,905,688호 및 미국 특허 공개 제20040266662호 (이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 지단백질 복합체, 탈지질화된 아포지단백질, 펩티드, 융합 단백질 및 HDL 모방체를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0206] 본 개시내용의 HDL 치료제는 그의 투여가 증가된 HDL 수준을 초래하는 소분자를 포함한다. 예시적인 소분자는 CETP 억제제, 예를 들어, 토르세트라핀, 아나세트라핀, 에바세트라핀, DEZ-001 (이전에 TA-8995) 및 달세트라핀, 및 미국 특허 제8,053,440호; 제5,783,600호; 제5,756,544호; 제5,750,569호; 제5,648,387호; 제8,642,653호; 제8,623,915호; 제8,497,301호; 제8,309,604호; 제8,153,690호; 제8,084,498호; 제8,067,466호; 제7,838,554호; 제7,812,199호; 제7,709,515호; 제7,705,177호; 제7,576,130호; 제7,335,799호; 제7,335,689호; 제7,304,093호; 제7,192,940호; 제7,119,221호; 제6,909,014호; 제6,831,105호; 제6,790,953호; 제6,713,507호; 제6,703,422호; 제6,699,910호; 제6,673,780호; 제6,646,170호; 제6,506,799호; 제6,459,003호; 및 제6,410,802호 (이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 소분자를 들 수 있다.

[0207] 본 개시내용의 소분자 HDL 치료제로는 또한 CER-002 및 CER-209를 들 수 있다:



[0208]

[0209] HDL 치료제는 제약 조성물로서 제제화될 수 있다. 본 개시내용에 의해 고려되는 제약 조성물은 대상체에의 투여 및 전달에 적합한 제약학적으로 허용되는 담체 중에 활성 성분으로서 HDL 치료제를 포함한다.

[0210] 주사가능한 조성물은 수성 또는 오일성 비히클 중에 활성 성분의 멸균 현탁액, 용액 또는 에멀전을 포함한다. 조성물은 또한 제제화제, 예컨대 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, HDL 치료제가 HDL 모방체인 경우, 모방체는 인산염 완충 염수 (10 mM 인산나트륨, 80 mg/mL 수크로스, pH 8.2) 중에 HDL 치료제를 포함하는 주사가능한 조성물로서 제제화된다. 주사용 조성물은 단위 투여 형태로, 예를 들어, 앰플로 또는 다중용량 용기로 제공될 수 있으며, 첨가되는 보존제를 포함할 수 있다. 주입을 위해, 조성물은 HDL 치료제와 혼화성인 물질, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트 또는 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 혼화성 물질로 제조된 주입 백에 공급될 수 있다.

[0211] 지단백질 복합체 또는 탈지질화된 지단백질인 HDL 치료제의 적합한 투여 형태는 HDL 치료제를 약 1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL의 지단백질, 바람직하게는 약 5 mg/mL 내지 약 15 mg/mL의 지단백질의 최종 농도로 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 투여 형태는 HDL 치료제를 약 8 mg/mL 내지 약 10 mg/mL 아포지단백질 A-I, 바람직하게는 약 8 mg/mL의 최종 농도로 포함한다.

[0212] 6.4.HDL 마커

[0213] 본 개시내용은 부분적으로 HDL 치료제로의 증가하는 투약 (증가된 빈도, 증가된 용량, 또는 둘 다에

의해서든지)에 의해 하향조절되는 HDL 마커의 이용에 관한 것이다. HDL 마커는 단핵구, 대식세포 및 단핵 세포로부터의 축적된 콜레스테롤 또는 콜레스테릴 에스테르의 제거에 직접적으로 또는 간접적으로 관여하고, ATP-결합 막 카세트 수송체 A1 (ABCA1) 및 G1 (ABCG1) 및 스테롤 조절 요소 결합 인자 1 유전자 (SREBP1)를 포함하며, 이는 지방산 및 콜레스테롤의 생합성, 및 지질 대사에 중요한 역할을 한다. 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 단일 HDL 마커에 대해 검정한다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 복수 (예를 들어, 2개 또는 3개)의 HDL 마커에 대해 검정한다. 본 개시내용의 방법에서 검정될 수 있는 HDL 마커의 예시적인 조합으로는 단독으로 또는 추가의 마커와 조합으로의 ABCA1 + ABCG1; ABCA1 + SREBP1; ABCG1 + SREBP1; 및 ABCA1 + ABCG1 + SREBP1을 들 수 있다. HDL 마커의 검정 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 하기에 예시된다.

[0214] **6.4.1.ABCA1**

[0215] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 ABCA1 발현 수준 및 발현 수준의 변경 (예를 들어, HDL 치료제로의 치료에 대한 반응으로)에 대한 검정을 수반한다. 그의 발현 수준에 대해 검정될 수 있는 ABCA1 mRNA 서열은 수탁 번호 AB055982.1로 할당되며, 그의 발현 수준에 대해 검정될 수 있는 ABCA1 단백질은 수탁 번호 AAF86276으로 할당된다. 이들 서열을 각각 도 65aa 내지 65ac 및 65b에 나타낸다.

[0216] 예를 들어 문헌 [Vinals *et al.*, 2005, Cardiovascular Research 66:141-149]; [Sporstø *et al.*, 2007, BMC Mol Biol. 8:5]; [Genvigir *et al.*, 2010, Pharmacogenomics 11(9):1235-46]; [Wang *et al.*, 2007, Biochem Biophys Res Commun. 353(3):650-4]; [Holven *et al.*, 2013, PLOS ONE 8(11):e78241]; 및 [Rubic & Lorenz, 2006, Cardiovascular Research 69:527-35]에 기재된 바와 같은 본 방법에 따른 ABCA1 발현에 대해 검정하는데 사용될 수 있는 몇몇 RT-PCR 및 항체 검출 시스템이 개발되었다.

[0217] **6.4.2.ABCG1**

[0218] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 ABCG1 발현 수준 및 발현 수준의 변경 (예를 들어, HDL 치료제로의 치료에 대한 반응으로)에 대한 검정을 수반한다. 그의 발현 수준에 대해 검정될 수 있는 ABCG1 mRNA 서열은 수탁 번호 NM_207629.1로 할당되며, 그의 발현 수준에 대해 검정될 수 있는 ABCG1 단백질은 수탁 번호 P45844로 할당된다. 이들 서열을 각각 도 66aa 내지 66ab 및 66b에 나타낸다.

[0219] 예를 들어, 문헌 [Sporstø *et al.*, 2007, BMC Mol Biol. 8:5]; [Genvigir *et al.*, 2010, Pharmacogenomics 11(9):1235-46]; [Wang *et al.*, 2007, Biochem Biophys Res Commun. 353(3):650-4]; [Holven *et al.*, 2013, PLOS ONE 8(11):e78241]; 및 [Rubic & Lorenz, 2006, Cardiovascular Research 69:527-35]에 기재된 바와 같은 본 방법에 따른 ABCA1 발현에 대해 검정하는데 사용될 수 있는 몇몇 RT-PCR 및 항체 검출 시스템이 개발되었다.

[0220] **6.4.3.SREBP1**

[0221] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 SREBP1 발현 수준 및 발현 수준의 변경 (예를 들어, HDL 치료제로의 치료에 대한 반응으로)에 대한 검정을 수반한다. 그의 발현 수준에 대해 검정될 수 있는 SREBP1 mRNA 서열은 수탁 번호 BC063281.1로 할당되며, 그의 발현 수준에 대해 검정될 수 있는 SREBP1 단백질은 수탁 번호 P36956으로 할당된다. 이들 서열을 각각 도 67aa 내지 67ab 및 67b에 나타낸다.

[0222] **6.5.단핵구**

[0223] 단핵구는 골수에서 생성되어 혈류에서 방출되며, 또한 뇌척수액과 같은 다른 생물학적 유체, 또는 림프에 존재할 수 있고, 순환을 떠난 후 상이한 유형의 조직-대식세포 또는 수지상 세포를 발생시킬 수 있다. 골수 중의 단핵구, 그의 자손 및 즉각적 전구체는 또한 "단핵 포식세포 시스템" (MPS)으로 명명되었다. 이는 단핵구성 및 과립구성 세포를 발생시키는 골수 중의 과립구/대식세포 콜로니 형성 단위 (CFU-GM) 전구체로부터 유래된다.

[0224] 새롭게 형성된 단핵구는 골수를 떠나고, 말초 혈액으로 이동한다. 순환 단핵구는 모세 혈관의 내피 세포에 부착할 수 있고, 다양한 조직 내로 이동할 수 있으며 (van Furth *et al.*, 1992, Production and Migration of Monocytes and Kinetics of Macrophages. In: van Furth R ed. Mononuclear Phagocytes. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), 여기서 이는 대식세포 또는 수지상 세포로 분화될 수 있다. 단핵구, 대식세포, 및 수지상 세포는 아테롬성동맥경화증의 개시 및 진행에 있어서 핵심적 세포이다. 정상적인 환경 하에서, 유동하는 혈액과 접촉하는 내피 단층은 단핵구의 단단한 부착을 저항한다. 그러나, 전-염증성 인자의 노출 시, 내피 세포에서 다양한 백혈구 부착 분자의 발현의 지속적인 증가가 있으며, 이는 단핵구가 내피

세포 막에 부착하는 것을 가능하게 한다 (Libby, 2002, Nature 420:868-874). 일단 이들이 이동하면, 단핵구는 조직-잔류 대식세포가 되고, 이는 다시 변형된 지단백질의 노출 시 지질-적화된 발포체 세포로 발달한다 (Osterud and Bjorklid, 2003, Physiol. Rev. 83:1069-1112).

[0225] 본 개시내용의 진단 및 용량 최적화 방법은 전형적으로 동물 모델에서 또는 세포 배양물에서 시험관내에서 환자 수준, 집단 수준에 대한 최적 투약을 확인하기 위해 HDL 치료제로의 치료 이전, 동안 및/또는 후에 단핵구 또는 대식세포를 HDL 마커 발현에 대해 검정하는 것을 수반한다.

[0226] 말초 혈액 단핵구의 분리 방법은 관련 기술분야에서 통상적이다. 이러한 방법으로는 밀도-구배 원심분리 (단리를 위해 세포의 비중의 차이가 이용됨), 성분체집술, 플라스틱 표면 기기, 예컨대 폴리스티렌 플라스크에의 단핵구의 접착, 및 분자 마커를 이용한 세포 분류 방법을 들 수 있다.

[0227] 단핵 세포는 밀도-구배 원심분리 방법에 의해 분리될 수 있다.

[0228] 단핵구는 플라스틱 (폴리스티렌) 기재에의 그의 부착의 부착을 통해 분리될 수 있는데, 이는 단핵구가 예를 들어, 말초 혈액에서 발견되는 다른 세포, 예컨대 림프구 및 자연 살해 (NK) 세포보다 플라스틱에 부착하는 경향이 더 크기 때문이다. 오염 세포는 기재의 격렬한 세척에 의해 제거될 수 있다.

[0229] 단핵구는 또한 원심분리로부터 반대 방향으로 완충제를 유동시켜 특정 세포 층을 형성하면서 세포 현탁액을 경사를 갖는 챔버에서 원심분리하는 방법인 경사법을 사용하여 분리될 수 있다.

[0230] 단핵구 및 대식세포는 바람직하게는 세포 표면 마커, 예컨대 CD14 및 CD16을 이용한 세포 분류 방법 (예를 들어, 형광 활성화 세포 분류 (FACS), 자기-활성화 세포 분류 (MACS), 또는 유동 세포측정)의 사용에 의해 분리된다. 예시적인 세포 분류 방법 및 마커는 문헌 [Mittar *et al.*, August 2011 BD Biosciences publication entitled "Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation"]에 개시되어 있다.

[0231] 6.6. 치료 방법

[0232] 본 개시내용은 상태의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 유효량의 HDL 치료제를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 대상체는 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간이다. 치료 방법은 본원에 기재된 방법에 의해 확인되는 HDL 치료제의 용량 (양 및/또는 투약 스케줄 및/또는 주입 시간)을 이용하고/거나, 치료의 효능을 모니터링하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 HDL 마커를 이용한 동반 진단 검정을 수반할 수 있다.

[0233] ABCA1의 결함은 대립유전자 장애 가족성 저알파지질단백혈증 (FHA) 또는 보다 중증 장애 탄지예르병 (TD)을 초래하며, 이는 혈장 중의 HDL-C 콜레스테롤의 크게 감소된 수준, 손상된 콜레스테롤 유출, 및 세포내 콜레스테롤 에스테르를 축적하는 경향을 특징으로 한다. 본 개시내용은 이러한 장애의 치료 방법을 제공한다.

[0234] 본원에 기재된 HDL 치료제 및 조성물은 사실상 HDL 모방체가 유용한 것으로 나타난 모든 목적을 위해, 예컨대 ABCA1 관련된 질환 또는 결핍의 치료 또는 예방, ABCG1 관련된 질환 또는 결핍의 치료 또는 예방, 및 HDL 결핍, ApoA-I 결핍 또는 LCAT 결핍의 치료 또는 예방을 위해 사용될 수 있다. HDL 치료제는 질환, 예컨대 황반 변성, 뇌졸중, 아테롬성동맥경화증, 급성 관상동맥 증후군, 내피 기능이상, 가속화된 아테롬성동맥경화증, 이식편 아테롬성동맥경화증, 허혈, 및 일과성 허혈 발작을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

[0235] 본 개시내용의 HDL 치료제 및 조성물은 특히 심혈관 질환, 장애, 및/또는 연관된 상태를 치료 또는 예방하는데 유용하다. 대상체에서의 심혈관 질환, 장애, 및/또는 연관된 상태의 치료 또는 예방 방법은 일반적으로 대상체에게 특정 증상을 치료 또는 예방하는데 유효한 처방에 따라 본원에 기재된 HDL 치료제 또는 제약 조성물의 낮은 (15 mg/kg 미만) 용량 또는 양을 투여하는 것을 포함한다.

[0236] HDL 치료제는 치료적 유익을 제공하는데 충분하거나 유효한 양으로 투여된다. 심혈관 질환, 장애, 및/또는 연관된 상태의 치료의 맥락에서, 치료적 유익은 하기 중 하나 이상이 일어나는 경우 추론될 수 있다: 기준선에 비해 콜레스테롤 동원의 증가, 아테롬성동맥경화 플라크 부피의 감소, 퍼센트 아테롬 부피 (IVUS에 의해 얻어진 측정치)의 증가 (Nicholls *et al.*, 2010, J Am Coll Cardiol 55:2399-407), 초음파 영상화 기술 (내막 중막 두께)에 의해 또는 MRI에 의해 측정된 바와 같은 혈관벽 두께의 감소 (Duivenvoorden *et al.*, 2009, Circ Cardiovasc Imaging. 2:235-242.), 평균 혈장 트리글리세리드 농도의 증가 또는 간 트랜스아미나제 (알라닌 아미노트랜스페라제) 수준의 정상 범위 초과 증가가 없는, 기준선 수준에 비해 유리 콜레스테롤의 고밀도 지단

백질 (HDL) 분획의 증가. 완전한 치료는 바람직하기는 하지만 치료적 유익이 존재하는데 요구되지는 않는다.

- [0237] 일부 실시양태에서, HDL 치료제는 주사 당 약 1 mg/kg ApoA-I 당량 내지 약 15 mg/kg ApoA-I 당량의 용량으로 투여되는 지단백질 복합체이다. 일부 실시양태에서, 지단백질 복합체는 약 1 mg/kg, 2 mg/kg, 또는 3 mg/kg ApoA-I 당량의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 지단백질 복합체는 약 6 mg/kg ApoA-I 당량의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 지단백질 복합체는 약 8 mg/kg, 12 mg/kg 또는 15 mg/kg ApoA-I 당량의 용량으로 투여된다.
- [0238] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 상태의 치료 또는 예방 방법은 예를 들어, 본원에 기재된 HDL 치료제의 효능의 모니터링 방법에 따라, HDL 치료제의 치료 효능을 모니터링하는 단계를 포함한다. HDL 치료제의 용량 및/또는 투약 스케줄의 효능은 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 2개 이상의 시점에서, 예를 들어, HDL 치료제의 용량의 투여 전 및 HDL 치료제의 용량의 투여 후에 비교함으로써 모니터링될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 HDL 치료제의 용량의 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정된다. 또다른 실시양태에서, 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준은 투약 스케줄, 예를 들어, HDL 치료제가 2일마다, 3일마다, 1주마다, 또는 2주마다 투여되는 투약 스케줄에 따른 HDL 치료제의 투여 전후에 측정된다.
- [0239] 발현 수준은 단백질 발현 수준 또는 mRNA 발현 수준일 수 있다. 한 실시양태에서, 발현 수준은 예를 들어, 섹션 6.4에 기재된 바와 같은 항체 검출 시스템을 사용하여 측정된 단백질 발현 수준이다. 또다른 실시양태에서, 발현 수준은 RT-PCR을 사용하여 측정된 mRNA 발현 수준이다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준은 섹션 6.5에 기재된 임의의 방법에 따라 단리된 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서 측정된다. HDL 치료제의 용량 및/또는 투약 스케줄은 발현 수준이 섹션 6.2에 기재된 하나 이상의 HDL 마커에 대한 컷오프량 초과만큼 감소되는지 여부에 따라 유지 또는 변형될 수 있다.
- [0240] 치료되는 대상체는 심혈관 질환, 장애, 및/또는 연관된 상태를 앓고 있는 개체이다. 본원에 기재된 HDL 치료제 및 조성물로 치료 또는 예방될 수 있는 이러한 심혈관 질환, 장애 및/또는 연관된 상태의 비-제한적 예로는 말초 혈관 질환, 재협착, 아테롬성동맥경화증, 및 아테롬성동맥경화증의 많은 임상적 증상, 예컨대, 예를 들어, 뇌졸중, 허혈성 뇌졸중, 일과성 허혈 발작, 심근 경색, 급성 관상동맥 증후군, 협심증, 간헐 파행, 위험성 팔다리 허혈, 판막 협착증, 및 동맥 판막 경화증을 들 수 있다. 대상체는 급성 관상동맥 증후군, 예컨대 심근 경색 (ST 상승이 있거나 없음) 또는 불안정 협심증의 이전의 발생을 갖는 개체일 수 있다. 치료되는 대상체는 임의의 동물, 예를 들어, 포유동물, 특히 인간일 수 있다.
- [0241] 한 실시양태에서, 방법은 기관 이식, 예컨대 심장 이식 (예를 들어, 심장 동종이식 혈관병증 (CAV)), 신장 이식, 또는 간 이식 (Garcia-Garcia et al., 2010, European Heart Journal 3:2456-2469 at 2465, under "Cardiac Allograft Disease")을 갖는 대상체에서의 심혈관 질환, 가속화된 아테롬성동맥경화증의 치료 또는 예방 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 본원에 기재된 HDL 치료제 또는 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0242] 특정 측면에서, 방법은 심혈관 질환의 치료 또는 예방 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 본원에 기재된 HDL 치료제 또는 조성물을 (a) 투여 후 환자의 기준선 ApoA-I를 변경하지 않고/거나 (b) 투여 후 대략 2시간까지 약 5 mg/dL 내지 100 mg/dL만큼, 및/또는 투여 대략 24시간 후 약 5 mg/dL 내지 20 mg/dL만큼, 투여 이전의 기준선 (초기) 수준보다 높은 유리 또는 복합체화된 아포지단백질의 혈청 수준을 달성하는데 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0243] 또다른 측면에서, 방법은 심혈관 질환의 치료 또는 예방 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 본원에 기재된 HDL 치료제 또는 조성물을 투여 후 적어도 1일 동안 투여 이전의 초기 HDL-콜레스테롤 분획보다 적어도 약 10% 더 높은 HDL-콜레스테롤 분획의 순환 혈장 농도를 달성하는데 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0244] 또다른 측면에서, 방법은 심혈관 질환의 치료 또는 예방 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 본원에 기재된 HDL 치료제 또는 조성물을 투여 5분 내지 1일 후에 30 내지 300 mg/dL인 HDL-콜레스테롤 분획의 순환 혈장 농도를 달성하는데 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0245] 또다른 측면에서, 방법은 심혈관 질환의 치료 또는 예방 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 본원에 기재된 HDL 치료제 또는 조성물을 투여 5분 내지 1일 후에 30 내지 300 mg/dL인 콜레스테릴 에스테르의 순환 혈장 농도를 달성하는데 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다.

- [0246] 더 또다른 측면에서, 방법은 심혈관 질환의 치료 또는 예방 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상 체에게 본원에 기재된 HDL 치료제 또는 조성물을 투여 후 적어도 1일 동안 투여 이전의 기준선 (초기) 수준을 적어도 약 10% 초과하는 대변 콜레스테롤 배설의 증가를 달성하는데 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0247] 본원에 기재된 HDL 치료제 또는 조성물은 단독으로 또는 상기 상태를 치료 또는 예방하는데 사용되는 다른 약물의 조합 요법으로 사용될 수 있다. 이러한 요법으로는 관여하는 약물의 동시 또는 순차적 투여를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 이상지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 예컨대 가족성 고콜레스테롤혈증 (동형접합성 또는 이형접합성) 또는 아테롬성동맥경화증의 치료에서, HDL 치료제는 현재 사용되는 임의의 하나 이상의 콜레스테롤 저하 요법; 예를 들어, 담즙-산 수지, 니아신, 스타틴, 콜레스테롤 흡수의 억제제 및/또는 피브레이트와 함께 투여될 수 있다. 이러한 조합 처방은 특히 유익한 치료 효과를 생성할 수 있는데, 이는 각각의 약물이 콜레스테롤 합성 및 수송에서 상이한 표적에 대해 작용하기 때문이며; 즉, 담즙-산 수지는 콜레스테롤 재생, 킬로미크론 및 LDL 집단에 영향을 미치고; 니아신은 주로 VLDL 및 LDL 집단에 영향을 미치고; 스타틴은 콜레스테롤 합성을 억제하여, LDL 집단을 감소시키는 (및 아마도 LDL 수용체 발현을 증가시키는) 반면; 본원에 기재된 HDL 치료제는 RCT에 영향을 미치고, HDL을 증가시키고, 콜레스테롤 유출을 촉진시킨다.
- [0248] 또다른 실시양태에서, 본원에 기재된 HDL 치료제 또는 조성물은 피브레이트와 함께 사용되어 관상동맥 심장 질환; 관상 동맥 질환; 심혈관 질환, 제협착, 혈관 또는 혈관주위 질환; 아테롬성동맥경화증 (아테롬성동맥경화증의 치료 및 예방을 포함함)을 치료 또는 예방할 수 있다.
- [0249] 본원에 기재된 HDL 치료제 또는 조성물은 작은 HDL 분획, 예를 들어, 프리-베타, 프리-감마 및 프리-베타-유사 HDL 분획, 알파 HDL 분획, HDL₃ 및/또는 HDL₂ 분획을 증가시키는 투여량으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여량은 예를 들어, 영상화 기술, 예컨대 자기 공명 영상화 (MRI) 또는 혈관내 초음파 (IVUS)에 의해 측정된 바와 같이 아테롬성동맥경화 플라크 감소를 달성하는데 유효하다. IVUS에 따르는 파라미터로는 기준선으로부터의 퍼센트 아테롬 부피의 변화 및 총 아테롬 부피의 변화를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. MRI에 따르는 파라미터로는 IVUS에 대한 것들, 및 지질 조성 및 플라크의 석회화를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0250] 플라크 퇴행은 환자를 그 자신의 대조군으로서 사용하여 (0 시간 대 마지막 주입의 종료 시의 시간 t, 또는 마지막 주입 후 수 주 내, 또는 요법의 시작 후 3개월, 6개월, 또는 1년 내에) 측정될 수 있다.
- [0251] 투여는 정맥내 (IV), 근육내 (IM), 진피내, 피하 (SC), 및 복강내 (IP) 주사를 비롯한 비경구 투여 경로에 의해 가장 양호하게 달성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여는 관류기, 침투기 또는 카테터에 의한다. 일부 실시양태에서, HDL 치료제는 주사에 의해, 피하로 삽입가능한 펌프에 의해 또는 데포 제제에 의해, 비경구 투여를 통해 얻어지는 것과 동등한 순환 혈청 농도를 달성하는 양으로 투여된다. HDL 치료제는 또한 예를 들어, 스텐트 또는 다른 장치에서 흡수될 수 있다.
- [0252] 투여는 다양한 상이한 치료 처방을 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 정맥내 주사는 주사의 누적 총 부피가 1일 독성 용량에 도달하지 않게 하루 동안 주기적으로 투여될 수 있다. 방법은 HDL 치료제를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12일의 간격으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, HDL 치료제는 1주 1회, 1주 2회, 1주 3회 이상의 간격으로 투여된다.
- [0253] 방법은 HDL 치료제를 상기 기재된 임의의 간격으로 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12회 이상 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 가족성 원발성 저알파지질단백혈증을 앓고 있는 대상체에서, HDL 치료제는 수 개월, 수 년 동안 또는 무기한으로 투여될 수 있다.
- [0254] 예를 들어, 한 실시양태에서, HDL 치료제는 각각의 투여 사이에 1주의 간격으로 6회 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여는 일련의 주사로서 수행된 후, 6개월 내지 1년 동안 중단되고, 그 후 또다른 계열이 시작될 수 있다. 그 후, 주사의 유지 계열이 1년마다 또는 3 내지 5년마다 투여될 수 있다. 일련의 주사는 1일 (복합체의 특정화된 혈장 수준을 유지하기 위한 관류), 수 일 (예를 들어, 8일의 기간에 걸친 4회의 주사) 또는 수 주 (예를 들어, 4주의 기간에 걸친 4회의 주사)에 걸쳐 수행된 후, 6개월 내지 1년 후에 재시작될 수 있다. 만성 상태에 대해, 투여는 계속진행 기초로 수행될 수 있다. 임의로, 방법은 HDL 치료제가 보다 빈번히 투여되는 경우, 유도 단계가 선행될 수 있다.
- [0255] 또다른 실시양태에서, HDL 치료제로의 치료는 유도 투약 처방에 따라 개시된 후, 투여의 용량 및/또는 빈도가 감소되는 유지 처방이 이어질 수 있다. 예를 들어, 유도 처방은 HDL 치료제를 1주 2회, 3회 또는 4회 투여하는 것을 수반할 수 있다. HDL 치료제가 지단백질 복합체, 예컨대 CER-001인 경우, 유도 용량은 단백질 기준으로 4

내지 15 mg/kg 범위 (예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 또는 15 mg/kg)일 수 있다. 유지 처방은 HDL 치료제를 1주 1회, 2회 또는 3회 투여하는 것을 수반할 수 있다. HDL 치료제가 지단백질 복합체, 예컨대 CER-001인 경우, 유지 용량은 단백질 기준으로 0.5 내지 8 mg/kg 범위 (예를 들어, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 mg/kg)일 수 있다. 유도 투약 스케줄은 가족성 원발성 저알파지질단백혈증을 앓고 있는 대상체에게 특히 적합하다. 예시적인 투약 스케줄은 실시예 4에 기재되어 있다.

[0256] 더 또다른 대안에서, 투여 당 1 mg/kg 내지 8 mg/kg의 용량으로의 약 1 내지 12 용량으로 시작한 후, 투여 당 4 mg/kg 내지 15 mg/kg의 반복되는 용량이 이어지는 상승하는 용량이 투여될 수 있다. 환자의 필요에 따라, 투여는 1시간 초과와 기간으로의 저속 주입에 의해, 1시간 이하의 급속 주입에 의해, 또는 단일 볼루스 주사에 의해 서일 수 있다. 용량은 1주 1회, 2회, 3회 이상 투여될 수 있다.

[0257] 다양한 HDL 치료제의 독성 및 치료 효능은 LD50 (집단의 50%에 대해 치사적인 용량) 및 ED50 (집단의 50%에서 치료학적으로 유효한 용량)을 측정하기 위한 세포 배양물 또는 실험 동물에서의 표준 제약 절차를 사용하여 측정될 수 있다. 독성 및 치료 효과 사이의 용량 비는 치료 지수이며, 이는 비 LD50/ED50으로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 HDL 치료제가 바람직하다. 따를 수 있는 파라미터의 비-제한적 예로는 간 기능 트랜스아미나제 (2X 정상 기준선 수준 이하)를 들 수 있다. 이는 너무 많은 콜레스테롤이 간으로 와서, 이러한 양을 흡수할 수 없다는 지시이다. 적혈구에 대한 효과가 또한 모니터링될 수 있는데, 이는 적혈구로부터의 콜레스테롤의 동원이 이를 취약성이 되게 하거나, 그의 형상에 영향을 미치기 때문이다. 본원에 기재된 ABCA1, ABCG1 또는 HDL 마커의 하향조절이 또한 모니터링될 수 있다.

[0258] 환자는 의료 행위 수 일 내지 수 주 전 (예를 들어, 예방적 치료), 또는 의료 행위 동안 또는 후에 치료될 수 있다. 투여는 또다른 침습적 요법, 예컨대 혈관성형술, 목동맥 절제, 회전아테롬제거기 또는 기관 이식 (예를 들어, 심장, 신장, 간 등)에 부수적이거나 그와 동시적일 수 있다.

[0259] 특정 실시양태에서, HDL 치료제는 그의 콜레스테롤 합성이 스타틴 또는 콜레스테롤 합성 억제제 (예컨대 PCSK9 억제제, 그러나 이에 제한되지 않음)에 의해 제어되는 환자에게 투여된다. 다른 실시양태에서, HDL 치료제는 담즙 염 및 콜레스테롤을 포획하고, 담즙산 배설을 증가시키고, 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시키기 위해, 결합수지, 예를 들어, 반-합성 수지, 예컨대 콜레스티라민으로의, 또는 섬유, 예를 들어, 식물 섬유로의 치료를 받고 있는 환자에게 투여된다.

[0260] 7. 실시예 1: CER-001의 용량 반응 분석

[0261] 7.1. CHI SQUARE 임상 시험

[0262] CER-001은 정맥내로 주사되는 경우 천연 HDL의 생물학적 특성을 모방하는 음전하를 갖는 유전자조작된 재조합 인간 아포지단백질 A-I 고밀도 지단백질 (HDL)이다. 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 WO2012/109162의 실시예 3 및 4에서 "화학적 H"로 기재된 CER-001은 재조합 인간 아포지단백질 A-I, 및 스펅고미엘린 (Sph) 및 디팔미토일 포스파티딜글리세롤 (DPPG)을 함유하는 인지질로 구성된다. 단백질-대-인지질 비는 1:2.7이며, 97% Sph 및 3% DPPG를 함유한다.

[0263] WO2012/109162의 실시예 8에 기재된 바와 같이, 건강한 지원자에서의 0.25, 0.75, 2, 5, 10, 30 및 45 mg/kg의 단일 IV 용량으로의 CER-001의 I상 연구는 복합체가 증가하는 용량으로 및 15 mg/kg 초과와 수준에서 내성이 양호하고, 콜레스테롤 동원을 증가시키며, 트리글리세리드의 증가가 관찰되었음을 나타내었다.

[0264] I상 연구에 기초하여, "HDL 주입은 아테롬성동맥경화증 퇴행을 유의하게 촉진시킬 수 있는가 ("Can HDL Infusions Significantly QUICKen Artherosclerosis REGression") ("CHI SQUARE")라는 표제의 II상 연구가 개시되었다. ST 분절 상승 심근 경색, 비-ST 상승 심근 경색 또는 불안정 협심증의 진단의 지시제인 급성 흉부 통증 또는 다른 협심증 등가 증상을 나타내는 504명의 대상체를 등록하였다. 적격성이 되기 위해, 대상체는 혈관조영적 시각 추정 또는 경피 관상동맥 중재술 ("PCI")의 이전의 내력에 의해 루멘 직경의 20% 초과와 감소를 갖는 임의의 3가지 주요 천연 관상 동맥에서의 적어도 하나의 병변에 의해 정의되는 바와 같은 관상 동맥 질환의 혈관조영적 증거를 가져야 한다. PCI에 대한 표적 혈관은 연구 IVUS에 대한 표적 관상 동맥이 아니었으며, 이전의 PCI를 갖는 임의의 혈관은 표적 관상 동맥으로서 사용될 수 없었다.

[0265] 연구 설계는 도 1에 예시되어 있다. 1차 종료점은 3차원 IVUS (혈관내 초음파)에 의해 평가된 표적 관상 동맥의 30 mm 분절에서의 총 플라크 부피의 명목 변화였다. 핵심적 2차 종료점은 표적 30 mm 분절에서의 플라크 부피의 % 변화 및 % 아테롬 부피의 변화, 표적 30 mm 분절에서의 총 혈관 부피의 변화, 및 가장 적은 및 가장 많은 질환에 걸린 5 mm 분절에서의 기준선으로부터의 플라크, 루멘 및 총 혈관 부피의 변화였다. 이환율 및 사

망물은 탐구 종료점이었다.

7.2.결과

IV CER-001 투여 후, 아포지단백질 A-I은 용량-의존성 방식으로 (주입 1) 및 I상으로부터 예측된 것과 일치하는 규모로 증가한다. 이 효과는 주입 6에서 보존되었으며, 이는 시간 경과에 따라 효능의 약화가 없음을 지시한다. 도 2a를 참조한다.

인지질은 또한 용량 의존성 방식으로 (주입 1) 및 I상으로부터 예측된 것과 일치하는 규모로 증가한다. 이 효과는 주입 6에서 보존되었으며, 이는 시간 경과에 따라 효능의 약화가 없음을 지시한다. 도 2b를 참조한다. 인지질 및 ApoA-I 용량 반응 곡선의 기울기 비는 CER-001에서의 인지질 대 단백질 비와 일치하는 2.8이다.

혈장 총 콜레스테롤은 용량-의존성 방식으로 (주입 1) 및 I상으로부터 예측된 것과 일치하는 규모로 증가한다. 이 효과는 주입 6에서 보존되었으며, 이는 시간 경과에 따라 효능의 약화가 없음을 지시한다. 도 2c를 참조한다. 이들 데이터는 3 mg/kg의 CER-001의 효능이 15 mg/kg의 ETC-216에 필적함을 나타낸다.

CER-001은 3, 6, 및 12 mg/kg의 용량에서 실험실 파라미터에서 명백한 용량-관련된 독성 없이 전체적으로 내성이 양호하였다.

7.2.1.IVUS - 첫번째 접근법

기준선에서의 평균 총 아테롬 부피는 $155.24 \pm 67.99 \text{ mm}^3$ 였다. 총 아테롬 부피의 변화에 대한 조정된 평균은 위약, CER-001 3 mg/kg, CER-001 6 mg/kg 및 CER-001 12 mg/kg 군에서 각각 -2.71, -3.13, -1.50 및 -3.05 mm^3 였다 (위약 대비 12 mg/kg의 미리 특정화된 1차 분석에 대해 $p=0.81$). 또한, CER-001 6 mg/kg (명목 $p=0.45$) 및 3 mg/kg (명목 $p=0.77$) 군에 대해 위약에 비해 차이는 없었다. 퍼센트 아테롬 부피의 변화는 모든 연구 군 중에서 유사하였다 (위약, CER-001 3 mg/kg ($p=0.86$), CER-001 6 mg/kg ($p=0.95$) 및 CER-001 12 mg/kg ($p=0.53$) 군에서 0.02, -0.02, 0.01 및 0.19% (위약 대비 명목 p -값)).

하기 논의되는 "동행 (walk-along)" 접근법과 대조적으로, 프레임 쌍은 최적 가독성을 위해 개별적으로 선택되었다. 프레임은 에코발생의 부재 (칼슘) 및 측부 가지에 기초하여 선택되었다. 30 mm 초과와 후퇴의 유익을 제외하고, 최대 31개의 프레임이 30 mm 분절에 걸쳐 선택되었다. 31개 초과와 프레임이 이용가능한 경우 분석 세트에 포함하기 위해 31개의 프레임을 선택하는데 미리-한정된 기준은 사용되지 않았다.

약 60%의 쌍형성된 화상 세트를 31개의 프레임에서 클러스터링하고, 약 16%의 쌍형성된 화상 세트를 16개의 프레임에서 클러스터링하였다.

16-프레임 화상 세트에서의 "클러스터링"은 분석용 화상 세트를 정성화하기 위해 프레임이 1 mm보다 작은 (즉, 0.3 mm만큼 낮은) 간격으로 선택되었음을 암시한다.

31-프레임 화상 세트에서의 "클러스터링"은 1 mm 미만의 간격이 또한 화상 쌍의 수를 31로 최대화하는데 사용될 수 있었음을 암시한다.

분석의 보다 상세사항은 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Tardif *et al.*, 2014, Eur. Heart Journal, first published online April 29, 2014 doi:10.1093/eurheartj/ehu171]]에 기재되어 있다.

이 접근법 하에서, 126명의 환자/치료 부문에서, CHI SQUARE는 심혈관 사건에 대한 유의성을 나타내는 것으로 언더파워되었다 (대략 5000명의 환자/부문이 요구되었을 것임).

7.2.2.IVUS 분석 - 두번째 접근법

IVUS 데이터의 사후 분석을 남 오스트레일리아 건강 의료 연구 기관 (South Australian Health & Medical Research Institute) (SAHMRI)에 의해 수행하였다.

이 경우, 기준선 및 추적 사이에 유사한 프레임-카운트가 있었다. 선택된 프레임의 수는 정규 분포되었다 (도 3).

분석은 이전의 HDL 모방체에 비해 기준선 대비 PAV 및 TAV의 통계적으로 유의하고 필적하는 규모의 감소를 입증하였다 (도 4). 연구는 mITT 집단에서는 1차 종료점에 도달하지 않았지만, 프로토콜에 대해 변형된 (modified Per Protocol) (mPP) 집단에서, 3 mg/kg 용량은 TAV 및 PAV 둘 다에서 위약 대비 명목 통계적 유의성에 도달하였다 (도 5).

[0283] 도 6a 내지 6b에서 볼 수 있는 바와 같이, SAHMRI 분석의 결과는 인간에서의 CER-001에 대한 반전된 U자형 용량-효과 곡선과 일치한다.

[0284] 표 1에 나타난 바와 같이, 기준선 PAV가 30 이상인 환자에서, 3 mg/kg의 최저 용량은 모든 환자 (mITT)에 대해 총 아테롬성동맥경화 부피 (TAV)의 변화 및 PAV의 변화에 대해 위약 대비 통계적 유의성을 얻었다.

[0285] <표 1>

| 표 1 | | | | | | | | | |
|--|--------|---------|-----------------------------|----------------------|---------------------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| 파라미터 | 정규성 검정 | | ANCOVA 모델링으로부터의 LS 평균 및 p-값 | | | | | | |
| | W | p-값 | 위약 (n=69) | 3 mg/kg (n=58) | p-값 [†] | 6 mg/kg (n=78) | p-값 [†] | 12 mg/kg (n=66) | p-값 [†] |
| PAV | 0.927 | <0.0001 | -0.259 | -0.963 | 0.131 (P) 0.038* (NP) | -0.619 | 0.404 (P) 0.287 (NP) | +0.177 | 0.331 (P) 0.587 (NP) |
| TAV | 0.986 | 0.009 | -2.744 | -6.258 | 0.124 (P) 0.035* (NP) | -3.429 | 0.744 (P) 0.500 (NP) | -2.726 | 0.994 (P) 0.927 (NP) |
| [†] 공변량으로서 기준선 값을 사용한 ANCOVA 모델로부터의 모수 검정; 공변량으로서 사실상 기준선 값을 사용한 랭킹된 데이터에 대한 ANCOVA 모델로부터의 비모수 검정. 샤피로-윌크 (Shapiro-Wilk) 검정이 0.5 미만의 p-값을 갖는 경우, 비모수 결과가 사용되어야 한다. *통계적으로 유의한 결과 | | | | | | | | | |

[0286]

[0287] 기준선에서 30 이상의 PAV를 갖는 환자의 하위집단에서의 용량 반응은 총 집단에서와 동일한 패턴을 따랐지만, 3 mg/kg 용량에서 TAV 및 PAV의 보다 더 현저한 변화를 가졌다.

[0288] 8. 실시예 2: CER-001 또는 HDL₃으로의 처리 후의 역 지질 수송에 관련된 유전자의 조절

[0289] 8.1. 도입

[0290] 연구 A 내지 P의 목적은 CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I로의 마우스 대식세포 (J774)의 처리 후의 역 지질 수송 (RLT)에 관련된 유전자의 조절을 측정하는 것이었다. 역 콜레스테롤 수송 (RCT)은 말초 세포가 축적된 콜레스테롤을 세포의 수용체, 예컨대 고-밀도 지단백질 (HDL)로 방출한 후, 배설을 위한 간으로의 콜레스테롤 전달을 매개하고, 따라서 아테롬성동맥경화증을 예방하는 경로이다. 콜레스테롤 유출을 연구하는 한 가지 접근법은 대식세포를 [³H]-콜레스테롤-산화된-LDL로 표지하고, 수용체 분자의 존재 하에서 이들 세포로부터의 콜레스테롤 방출을 측정하는 것이다. ABCA1, ABCG1 및 SR-BI은 콜레스테롤 유출에 관련된 막 단백질이다.

[0291] 8.2. 물질

[0292] 이들 연구에 사용된 물질은 CER-001 (1:2.7 단백질 대 총 지질 비, 13.5 mg/mL ApoA-I의 농도에서 97% 달걀 스펅고미엘린/3% DPPG를 갖는 하전된 지단백질 복합체), 정제된 인간 HDL₃ 및 정제된 ApoA-I을 포함하였다. 물질을 약 -20℃에서 저장하였다.

[0293] HDL₃ 지단백질 분획을 섹션 8.3.1에 기재된 공정에 따라 인간 혈장으로부터 제조하였다. 간략하게, VLDL, IDL 및 LDL 분획을 먼저 KBr 구배 (d<1.055) 및 순차적 초원심분리 (100,000 x g에서 24시간 동안 3회)로 제거하였다. LDL 분획을 콜레스테롤 유출 실험에서의 장래의 사용을 위해 보관하였다. 그 후, HDL₃ 분획을 KBr 구배 (d=1.19)로부터 분리하였다 - 100,000 x g에서 40시간 동안. 지단백질 분획을 인산염 완충 염수 (PBS)에 대해 광범위하게 투석한 후, 실험에 이용하였다.

[0294] 8.3. 프로토콜

[0295] 8.3.1. 혈장 지단백질의 분리

[0296] **혈장의 수령.** 신선한 혈장 (동결되지 않음)의 부피를 측정한다. 첨가제를 최종 농도: EDTA: 0.1% (w/v), NaN₃: 0.01% (w/v)로 첨가한다. 혈장을 20,000 rpm, 4℃에서 20분 동안 원심분리한다. 세포 debris 및 가능한 클로미크론을 제거하여 투명한 혈장을 제공한다.

- [0297] 지단백질 **단리**. 지단백질은 KBr 용액 중에서의 순차적 부유 초원심분리 (VLDL, $d = 1.006 \text{ g/mL}$; LDL, $1.006 < d < 1.063 \text{ g/mL}$)에 의해 얻는다. HDL₂를 먼저 $d = 1.125 \text{ g/mL}$ 에서 단리한 후 ($110,000 \times g$ 에서 40시간 동안), $d = 1.19 \text{ g/mL}$ 에서 HDL₃을 단리한다 ($110,000 \times g$ 에서 40시간 동안). 사용 전, 지단백질을 인산염-완충 염수에 대해 광범위하게 투석한다. 염수 용액의 부피는 혈청 부피 - 수화된 단백질의 부피에 상응하는 7%이다.
- [0298] **8.3.2.RNA 추출**
- [0299] **단계 1 - 균질화**: 조직 샘플 (50 mg) 또는 배양된 세포 (6-웰 플레이트의 1 웰)를 1 ml TRI 시약® 중에서 균질화한다. 균질화물을 1.5 ml RN아제-무함유 튜브에서 실온에서 5분 동안 인큐베이션한다. 조직 샘플에 대해, $12,000 \times g$ 에서 10분 동안 4°C에서 원심분리하고, 상청액을 새로운 튜브에 옮긴다. 주의: 배양된 세포 샘플에 대해서는 필요하지 않음.
- [0300] **단계 2 - RNA 추출**: 브로모 클로로프로판 (BCP) 100 μl 를 균질화물 1 ml에 첨가하고, 잘 혼합한다 (15초 동안 볼텍싱). 실온에서 5분 동안 인큐베이션한다. $12,000 \times g$ 에서 10분 동안 4°C에서 원심분리한다. 수성 상부 상 400 μl 를 새로운 1.5 ml RN아제-무함유 튜브에 옮긴다.
- [0301] **단계 3 - 최종 RNA 정제**: 100% 에탄올 200 μl 를 첨가하고, 즉시 혼합한다 (5초 동안 볼텍싱). 샘플을 $12,000 \times g$ 에서 30초 동안 원심분리에 의해 필터 카트리지를 통해 통과시킨다. 필터를 세척 용액 500 μl 로 2회 세척한다 ($12,000 \times g$ 에서 30초 동안). 30초 더 원심분리하여 잔류의 세척 용액을 제거한다. 필터 카트리지를 새로운 수집 튜브에 옮긴다. 용리 완충제 50 내지 100 μl 를 필터 컬럼에 첨가하고, 실온에서 2분 동안 인큐베이션하고, $12,000 \times g$ 에서 30초 동안 원심분리하여 RNA를 필터로부터 용리한다. 회수된 RNA를 -80°C에서 저장한다.
- [0302] **단계 4 - RNA 농도를 측정**: RNA 용액의 농도를 샘플 1.5 μl 에 대해 나노드롭 (Nanodrop) 분광광도계 상에서 260 nm에서의 그의 흡광도를 측정함으로써 측정한다. RNA 품질을 평가하기 위해, 아질런트 (Agilent) 2100 생물분석기를 사용한 분석을 섹션 8.3.3에 기재된 바와 같이 수행할 수 있다.
- [0303] **8.3.3.아질런트 생물분석기를 사용한 RNA 품질 측정**
- [0304] 모든 시약을 사용 전에 실온에서 30분 동안 평형화한다. 염료 농축물을 실온으로 하면서 광으로부터 보호한다.
- [0305] **단계 1 - 겔을 제조**: 아질런트 RNA 6000 나노 겔 매트릭스 550 μl 를 스핀 필터 내로 정치시킨다. $1500 \times g$ 에서 10분 동안 원심분리한다. 여과된 겔 65 μl 를 키트에 포함된 0.5 ml RN아제-무함유 마이크로퓨즈 튜브 내로 분취한다. 여과된 겔은 1개월 내에 사용한다.
- [0306] **단계 2 - 겔-염료 믹스를 제조**: RNA 6000 나노 염료 농축물을 10초 동안 볼텍싱하고, 스핀 다운시킨다. RNA 6000 나노 염료 농축물 1 μl 를 여과된 겔의 65 μl 분취액에 첨가한다. 튜브를 캡핑하고, 철저히 볼텍싱하고, 겔 및 염료의 완전한 혼합을 육안으로 검사한다. 튜브를 실온에서 $13,000 \times g$ 에서 10분 동안 스핀시킨다. 제조된 겔-염료 믹스는 1일 내에 사용한다. 각각의 사용 전에 항상 겔-염료 믹스를 $13,000 \times g$ 에서 10분 동안 재-스핀시킨다.
- [0307] **단계 3 - 겔-염료 믹스를 적하**: 겔-염료 믹스를 적하하기 전에, 칩 프라임 스테이션의 기저 플레이트가 위치 (C)에 있는 것 및 조정가능한 클립이 상부 위치로 설정된 것을 확인한다. 새로운 RNA 6000 나노 칩을 칩 프라임 스테이션 상에 놓는다. 겔-염료 믹스 9 μl 를 둘러싸인 G 웰의 바닥에 피펫팅한다. 타이머를 30초로 설정하고, 플런저가 1 ml에 위치하는 것을 확인한 후, 칩 프라임 스테이션을 닫는다. 프라임 스테이션이 정확하게 닫힌 경우, 래치의 락이 딸각거릴 것이다. 시린지의 플런저를 이것이 클립에 의해 유지될 때까지 누른다. 정확하게 30초 동안 기다린 후, 플런저를 클립 풀기 장치로 푼다. 5초 동안 기다린 후, 플런저를 1 ml 위치로 서서히 후퇴시킨다. 칩 프라임 스테이션을 서서히 연다. 겔-염료 믹스 9 μl 를 각각의 2개의 G 웰에서 피펫팅한다.
- [0308] **단계 4 - 아질런트 RNA 6000 나노 마커를 적하**: RNA 6000 나노 마커 5 μl 를 사다리 기호로 마킹된 웰 및 각각의 12 샘플 웰 내로 피펫팅한다.
- [0309] **단계 5 - 래더 및 샘플을 적하**: 사용 전에, 래더 분취액 및 RNA 샘플을 해동하고, 이를 얼음 상에서 유지한다. 2차 구조를 최소화하기 위해, 샘플을 열 변성시킨 후 (70°C, 2분), 칩 상에 적하한다. 제조된 래더 1 μl 를 사다리 기호로 마킹된 웰 내로 피펫팅한다. 각각의 샘플 1 μl 를 각각의 12 샘플 웰 내로 피펫팅한다. RNA 600 나노 마커 1 μl 를 각각의 비사용된 샘플 웰에서 피펫팅한다. 칩을 IKA 볼텍스 혼합기의 어댑터에 수평으로 정

치시키고, 2,400 rpm에서 1분 동안 볼텍싱한다. 칩을 아질런트 2100 생물분석기에서 5분 내에 구동한다.

단계 6 - 칩의 분석을 시작: 기기 콘텍스트에서, 검정 메뉴 (예를 들어: 진행생물 RNA 검정)로부터 적절한 검정을 선택하고, COM Port 1을 선택한다. 현재의 파일 프리픽스 (File Prefix)를 수용하거나, 이를 변형한다. 데이터는 이 프리픽스를 사용한 명칭을 갖는 파일로 자동으로 저장될 것이다. 이 때, 파일 저장 위치 및 분석될 샘플의 수는 맞춤화될 수 있다. 윈도우의 우측 상부의 시작 버튼을 클릭하여 칩 구동을 시작한다. 샘플 정보, 예컨대 샘플 명칭 및 코멘트에 들어가기 위해, 청색으로 강조된 데이터 파일 (Data File) 링크를 선택하거나, 검정 콘텍스트로 가고, 칩 요약 (Chip Summary) 탭을 선택한다. 샘플 명칭 표를 완성한다. 칩 구동이 종료된 후, 칩을 소켓으로부터 즉시 제거한다.

8.3.4. 역 전사

반응 튜브를 제조하기 전에, RT 반응 믹스를 cDNA 키트에 대한 고용량 RNA (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems) 카탈로그 번호 4387406)를 사용하여 제조한다. RT 반응 믹스를 얼음 상에서 제조하기 위해 (20-μL 반응 당): (1) 키트 성분을 얼음 상에서 해동하고, (2) 요구되는 수의 반응을 제조하는데 필요한 성분의 부피를 표 2에 나타난 바와 같이 계산한다:

<표 2>

| 표 2 | |
|----------------------|--------------|
| RT 반응 믹스 | 부피 / 반응 |
| 2X RT 완충제 | 10 μl |
| 20X RT 완충제 | 1 μl |
| 뉴클레아제-무함유 수 | Q.S.P. 20 μl |
| 샘플 (0.5 또는 1 μg RNA) | 9 μl 까지 |

RT 반응 믹스 20 μl를 튜브 내로 분포시킨다. 튜브를 밀봉하고, 이를 230 x g에서 1분 동안 원심분리한다. RT 반응을 수행하기 위해, 열 사이클러를 하기와 같이 프로그래밍화한다: 37°C → 60분; 95°C → 5분; 12°C → ∞.

8.3.5. 정량적 유전자 발현 검정 (실시간 PCR)

단계 1 - cDNA 샘플을 제조: 총 RNA를 리보퓨어 앰비온 (Ribopure Ambion)® RNA 단리 키트 (어플라이드 바이오시스템즈 AM 1924)를 사용하여 단리하고, RNA 농도를 나노드롭 분광광도계에 의해 샘플 1.5 μl로 측정한다 (섹션 8.3.2 참조). 역 전사 (RT)를 cDNA 키트에 대한 고용량 RNA (어플라이드 바이오시스템즈 PN 4387406)를 사용하여 수행한다 (섹션 8.3.4 참조). PCR로 즉시 진행하지 않는 경우, cDNA 샘플을 -20°C에서 저장한다.

단계 2 - PCR 반응 믹스를 제조: 모든 샘플에 대해 동일한 양의 cDNA (0.5 또는 1 μg RNA에 대해 20 μL RT 반응액의 4 μl)를 사용한다. 각각의 샘플 (3중으로 구동됨)에 대해, 하기를 뉴클레아제-무함유 1.5-mL 미세원심분리 튜브 내로 샘플링한다 (2 샘플에 대한 부피를 더 첨가하여 PCR 반응 믹스의 최종 부피를 계산함): 2X 택맨 (TaqMan)® 유전자 발현 마스터 믹스 (Gene Expression Master Mix): 10 μl; 20X 택맨® 유전자 발현 검정 (Gene Expression Assay): 1 μl; 뉴클레아제 무함유 H₂O: 5 μl. 튜브를 캡핑하고, 이를 수 회 뒤집어 반응 성분을 혼합한다. 튜브를 간단히 원심분리한다.

단계 3 - 플레이트를 적하: cDNA 4 μl를 96-웰 반응 플레이트의 각각의 웰 내로 놓고, 플레이트의 방향을 2가지 침착물에 대해 변화시킴으로써 웰 당 PCR 반응 믹스 16 μL를 옮긴다 (각각의 유전자에 대한 블랭크를 만들기 위해 하나의 웰은 H₂O 4 μl를 갖는 것으로 예상됨). 플레이트를 적절한 커버로 밀봉한다. 플레이트를 간단히 원심분리한다 (230 x g에서 1분 동안). 플레이트를 스탭원플러스 실시간 (StepOnePlus Real Time) PCR 시스템 내로 적하한다.

단계 4 - 플레이트를 구동: 구동을 위한 실험/플레이트 문서를 생성한다. 플레이트를 구동한다. 프로그램: (a) 95°C → 10분; (b) 95°C → 15초; (c) 60°C → 1분; (b) 및 (c)의 40 사이클로.

8.3.6. 방사성 콜레스테롤 유출 연구

제1일 - 세포 배양: ATCC로부터 얻어진 J774 대식세포 (N° TIB-67)를 10% FBS (소 태아 혈청, 인비트로젠 (Invitrogen)), 100 단위/ml 페니실린 G (인비트로젠), 및 100 단위/ml 스트렙토마이신 (인비트로젠)으로 보충

된 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (DMEM, 인비트로젠)에서 37℃에서 5% CO₂로 성장시켰다. 세포를 24-웰 플레이트 (팔콘 (Falcon)) 상에 40,000 세포/웰로 시딩하고, DMEM 10% FBS 2 ml에 서 32시간 동안 성장시켰다. LDL 산화: LDL 1 ml를 슬라이드-에이-라이저 (Slide-A-Lyzer)TM 미니 투석 유닛 (Mini Dialysis Units) 7000MWC0 (피어스 (Pierce))에서 4 L PBS에 대해 투석한다 (2회, 각각 12시간).

[0323] **제2일 - LDL 산화:** [1] 투석 후, 단백질-LDL을 표준물질로 알부민 (#23209, 써모사이언티픽 (ThermoScientific))을 사용한 쿠마시 (Coomassie) 단백질 검정 (#1856209, 써모사이언티픽)으로 정량화한다. 흡광도를 글로맥스 (Glomax) 다중 검출 시스템 (프로메가 (Promega))으로 600 nm에서 판독한다. PBS-투석된 LDL (2 mg/ml)을 CuSO₄ (5 μM 최종 농도) (C8027, 시그마 알드리치 (Sigma Aldrich))를 사용하여 37℃에서 4 시간 동안 산화시켰다. EDTA (100 μM 최종 농도) (#20302.236, 프로라블로 (Prolabo))를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 산화된 LDL을 2x1 L PBS에 대해 0.5시간 동안 투석하였다. 투석 후, 단백질-LDL을 [1]과 동일한 방법에 의해 정량화한다. 세포 배양: 산화된 LDL (50 μl, 12.5 μg)을 DMEM 2.5% FBS 중에서 [³H] 콜레스테롤 (1 μCi, 퍼킨 엘머 (Perkin Elmer))과 15분 동안 혼합한다. 방사성표지된 LDL을 DMEM 2.5% FBS 450 μl 중에서 J744 세포에 24시간 동안 첨가한다.

[0324] **제3일 - 세포 배양:** 방사성 배지를 제거하고, 세포를 DMEM (FBS 없음) 1 ml로 3회 세척하고, 효능제 LXR (1 μM)과 함께 또는 없이 밤새 인큐베이션한다.

[0325] **제4일 - 콜레스테롤 유출 검정:** 상이한 수용체를 6시간 (또는 1 내지 24시간의 상이한 시간) 동안 FBS가 없는 DMEM 250 μl 중에서 첨가함으로써 유출을 유도한다. 배지 (0.25 ml)를 24 웰 가요성 마이크로플레이트 (1450-402 퍼킨-엘머)에서 혼합된 슈퍼 믹스 (Super Mix) (0.75 ml) (1200-439 퍼킨-엘머)를 첨가함으로써 방사성활성을 측정하고, 방사성활성을 마이크로베타 (MicroBeta)[®] 트리룩스 (Trilux)로 측정하였다 (2분 카운팅 시간). 세포내 [³H] 콜레스테롤을 헥산-이소프로판올 (3:2) 0.2 ml에 의해 추출하고 (인큐베이션 0.5시간), 액체 섬광 카운팅에 의해 측정하였다.

[0326] 8.3.7. 막/시토졸 분리

[0327] **초원심분리가 없는 막/시토졸 분리:** 세포 펠릿 (6-웰 플레이트의 2 웰)을 용해 완충제 200 μl에 또는 조직 샘플 (50 내지 100 mg)을 용해 완충제 1 ml에 재현탁시킨다. 조직 샘플을 투락스 (Turrax)[®]로 또는 세포 펠릿을 디지털 소니파이어 (Digital Sonifier)[®] 브란슨 (BRANSON)을 사용한 30%의 진폭에서의 초음파처리 2 x 10초에 의해 균질화한다. 800 x g에서 5분 동안 4℃에서 원심분리한다. 상청액을 새로운 튜브에 옮기고, 13,000 x g에서 30분 동안 4℃에서 원심분리하고, 상청액 (시토졸 분획)을 보관한다. 펠릿을 용해 완충제 (1.2% 트리톤 (Triton) X100으로 보충됨) 100 내지 200 μl에 재현탁시킨다. 강한 교반 하에 15분 동안 둔다. 14,000 x g에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액 (가용화된 막 단백질 분획)을 보관한다.

[0328] **초원심분리가 있는 막/시토졸 분리:** 용해 완충제 1 ml에 세포 펠릿 (6-웰 플레이트의 2 웰) 또는 조직 샘플 (50 내지 100 mg)을 재현탁시킨다. 조직 샘플을 투락스 (Turrax)[®]로 또는 세포 펠릿을 디지털 소니파이어[®] 브란슨을 사용한 30%의 진폭에서의 초음파처리 2 x 10초로 균질화한다. 800 x g에서 5분 동안 4℃에서 원심분리한다. 상청액을 초원심분리용 튜브에 옮기고, 100,000 x g (38,500 rpm)에서 1시간 동안 8℃에서 원심분리하고 (회전자 Ti70), 상청액 (시토졸 분획)을 보관한다. 펠릿을 용해 완충제 (표 3) (1.2% 트리톤 X100으로 보충됨) 100 내지 200 μl에 재현탁시킨다. 강한 교반 하에 15분 동안 둔다. 14,000 x g에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액 (가용화된 막 단백질 분획)을 보관한다.

[0329] <표 3>

| 표 3 | |
|------------------------|----------------------------|
| 용해 완충제의 성분 | 10 ml 완충제에 대해 |
| 20 mM 트리스 (Tris) | 200 μl 트리스 1M pH 7.5 |
| 150 mM NaCl | 375 μl NaCl 4M |
| 1 mM EDTA | 20 μl EDTA 0.5M |
| 2 mM MgCl ₂ | 20 μl MgCl ₂ 1M |
| 1X 프로테아제 억제제 | 100 μl IP 100X |
| | 9285 μl H ₂ O |

[0330]

[0331] 8.4. 유전자 조절 연구 A 내지 P의 결과

[0332] 8.4.1. 연구 A: CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I에 의한 J774 ABCA1 유전자 조절 - 용량 반응 (25, 250 및 1000 μ g/mL)

[0333] 이 연구에서, 상이한 농도의 CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I에 대한 콜레스테롤 유출의 조건에서 마우스 대식세포 (J774)에서의 ABCA1 유전자 발현을 조사하였다. J774를 6 x 웰 플레이트 상에 시딩하고 (300,000 세포/웰), 산화된-LDL로 ³H-콜레스테롤을 사용하지 않고 적하하였다. CER-001, HDL₃ (동결된 원액 용액으로부터) 및 ApoA-I (25, 250 및 1000 μ g/mL)을 대식세포 상에 6시간 동안 첨가하고, RNA를 리보퓨어 (RiboPure)TM 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다 (조건 당 1 웰). 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. ABCA1 유전자 발현을 택맨 프로브 Mm00442646.m1로 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.

[0334] 6시간 인큐베이션 후, ApoA-I은 실험에 사용된 용량에 대해 ABCA1 발현을 변화시키지 않았다. CER-001은 모든 용량에서 ABCA1 mRNA를 감소시켰으며; HDL₃은 25 μ g/mL 용량에서 ABCA1 mRNA 농도에 영향을 미치지 않았다 (도 7).

[0335] 8.4.2. 연구 B: CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I에 의한 J774 ABCG1 유전자 조절 - 용량 반응 (25, 250 및 1000 μ g/mL)

[0336] 이 연구에서, 상이한 농도의 CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I에 대한 콜레스테롤 유출의 조건에서 마우스 대식세포 (J774)에서의 ABCG1 유전자 발현을 조사하였다. J774를 6 웰 플레이트 상에 시딩하고 (300,000 세포/웰), 산화된-LDL로 ³H-콜레스테롤을 사용하지 않고 적하하였다. CER-001, HDL₃ (동결된 원액 용액으로부터) 및 ApoA-I (25, 250 및 1000 μ g/mL)을 대식세포 상에 6시간 동안 첨가하고, RNA를 리보퓨어TM 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다 (조건 당 1 웰). 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. ABCG1 유전자 발현을 택맨 프로브 Mm00437390.m1로 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.

[0337] ApoA-I은 실험에 사용된 용량에 대해 ABCG1 발현을 변화시키지 않았다. CER-001은 모든 용량에서 ABCG1 mRNA를 감소시켰으며; HDL₃은 25 μ g/mL 용량에서 ABCG1 mRNA 농도에 영향을 미치지 않았다 (도 8).

[0338] 8.4.3. 연구 C: CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I에 의한 J774 SR-BI 유전자 조절 - 용량 반응 (25, 250 및 1000 μ g/mL)

[0339] 이 연구에서, 상이한 농도의 CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I에 대한 콜레스테롤 유출의 조건에서 마우스 대식세포 (J774)에서의 SR-BI 유전자 발현을 조사하였다. J774를 6 웰 플레이트 상에 시딩하고 (300,000 세포/웰), 산화된-LDL로 ³H-콜레스테롤을 사용하지 않고 적하하였다. CER-001, HDL₃ (동결된 원액 용액으로부터) 및 ApoA-I (25, 250 및 1000 μ g/mL)을 대식세포 상에 6시간 동안 첨가하고, RNA를 리보퓨어TM 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다 (조건 당 1 웰). 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. SR-BI 유전자 발현을 택맨 프로브 Mm00450234.m1로 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.

[0340] 모든 용량에서 상이한 처리에 대해 SR-BI 유전자 발현의 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (도 9).

[0341] 8.4.4. 연구 D: CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I에 의한 J774 다른 유전자 조절 - 용량 반응 (25, 250 및 1000 μ g/mL)

[0342] ABCA1, ABCG1 및 SR-BI을 발현하는 유전자의 mRNA 조절은 LXR, SREBP1 및 SREBP2와 같은 핵 단백질에 관련된다. 이 연구는 상이한 농도의 CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I에 대한 콜레스테롤 유출의 조건에서 마우스 대식세포 (J774)에서의 LXR, SREBP1 및 SREBP2의 mRNA 수준을 조사한다. J774를 6 웰 플레이트 상에 시딩하고 (300,000 세포/웰), 산화된-LDL로 ³H-콜레스테롤을 사용하지 않고 적하하였다. CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I (25,

250 및 1000 $\mu\text{g/mL}$ 을 대식세포 상에 6시간 동안 첨가하고, RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다 (조건 당 1 웰). 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. SREBP-1, SREBP-2 및 LXR 유전자 발현 수준을 택맨 프로브 (각각 Mm01138344.m1, Mm01306292.m1, Mm00443451.m1)로 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.

[0343] ApoA-I로의 상이한 처리에 대해 SREBP-1, SREBP-2 및 LXR 유전자 발현의 유의한 변화는 관찰되지 않았다. CER-001 및 HDL₃은 단지 상이한 용량에 대해 SREBP-1 mRNA 수준에만 영향을 미친 반면 (도 10), SREBP-2 및 LXR은 변화되지 않았다 (각각 도 11 및 도 12).

[0344] **8.4.5. 연구 E: J774 마우스 대식세포에서의 ABCA1, ABCG1 및 SR-BI 발현의 조절에 대한 CER-001 및 HDL₃ EC₅₀ 측정**

[0345] 이 연구는 ABCA1, ABCG1 및 SR-BI 유전자 발현의 조절에 필요한 ApoA-I, CER-001 또는 HDL₃의 최소 유효 농도를 조사하였다. J774를 6 웰 플레이트 상에 시딩하고 (300,000 세포/웰), 산화된-LDL로 적하하였다. CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I (0.25, 2.5, 7.5, 25 및 250 $\mu\text{g/mL}$)을 대식세포 상에 6시간 동안 첨가하고, RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다. 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. SR-BI 유전자 (택맨 프로브 Mm00450234.m1), ABCG1 (택맨 프로브 Mm00437390.m1), SREBP1 (택맨 프로브 Mm01138344.m1) 및 ABCA1 (택맨 프로브 Mm00442646.m1) 발현을 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.

[0346] ApoA-I은 시험된 유전자의 mRNA 수준을 변화시키지 않았다 (도 13). ABCA1 수준의 반을 감소시키기 위한 CER-001 용량은 대략 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 이고, HDL₃에 대해서는 25 $\mu\text{g/mL}$ 이다 (도 13). ABCG1에 대해, CER-001 및 HDL₃에 대해 75 $\mu\text{g/mL}$ 초과 용량이 mRNA 수준의 반을 감소시키는데 필요하다 (도 14). SREBP1에 대해, 본 발명자들은 CER-001에 대해 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 및 HDL₃에 대해 25 $\mu\text{g/mL}$ 초과 농도에 대한 감소 및 플라토를 관찰하였다 (도 15). SR-BI 수준은 상이한 처리에 의해 영향을 받지 않았다 (도 16).

[0347] **8.4.6. 연구 F: J774 마우스 대식세포에서의 CER-001 및 HDL₃에 의한 ABCA1 mRNA의 조절에 대한 동역학**

[0348] 이 연구는 J774 대식세포에서의 ABCA1의 mRNA 수준을 감소시키는 것의 동역학을 조사하였다. J774를 6 웰 플레이트 상에 시딩하고 (300,000 세포/웰), 산화된-LDL로 적하하였다. CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I (25 및 250 $\mu\text{g/mL}$)을 상이한 시점에 대해 대식세포 상에 첨가하고, RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다. 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. ABCA1 (택맨 프로브 Mm00442646.m1) 발현을 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.

[0349] CER-001 (25 또는 250 $\mu\text{g/mL}$)은 4시간에서 ABCA1 mRNA 수준의 반을 감소시킬 수 있었다. HDL₃ (250 $\mu\text{g/mL}$) (수 회 해동/동결되었음)의 거동은 25 $\mu\text{g/mL}$ HDL₃에서 하향-조절이 관찰되지 않은 것을 제외하고는 CER-001과 유사하다. 이전에 보고된 바와 같이, ApoA-I은 농도 25 $\mu\text{g/mL}$ 또는 250 $\mu\text{g/mL}$ 에 대해 mRNA ABCA1 수준을 감소시키지 않았다. ApoA-I 처리로 2시간 및 4시간에서 ABCA1 mRNA의 증가가 관찰되었다 (도 17).

[0350] **8.4.7. 연구 G: CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I의 존재 하에서의 ABCA1 및 ABCG1 mRNA 수준의 조절에 대한 Camp 효과**

[0351] 이 연구는 cAMP로의 처리 후 J774 대식세포에서의 ABCA1 및 ABCG1 mRNA 수준에 대한 CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 효과를 조사하였다. J774를 6 웰 플레이트 상에 시딩하고 (300,000 세포/웰), 산화된-LDL로 적하하였다. 다음날, 배지를 DMEM +/- cAMP (300 μM)로 대체하였다. cAMP의 존재/부재 하에서 밤새 인큐베이션한 후, 배지를 제거하고, CER-001, 또는 HDL₃ 또는 ApoA-I (250 $\mu\text{g/mL}$)로 6시간 동안 혼합된 DMEM으로 대체하고, RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다. 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. ABCG1 (택맨 프로브 Mm00437390.m1) 및 ABCA1 (택맨 프로브 Mm00442646.m1) 발현을 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.

- [0352] cAMP의 존재 하에서, ABCA1 mRNA 수준의 증가가 관찰되었다 (도 18). CER-001 또는 HDL₃ (250 μ g/mL)의 존재 하에서, ABCA1 및 ABCG1의 mRNA 수준은 감소된 반면, ApoA-I은 변경되지 않았다. cAMP의 존재 하에서, ABCA1 및 ABCG1의 농도는 세포를 CER-001 또는 HDL₃과 함께 인큐베이션한 경우 RQ = 1로 돌아왔지만, ABCA1의 자극 (RQ = 5 내지 6)은 도달되지 않았다 (도 18 및 도 19). ApoA-I 및 cAMP의 존재 하에서, ABCA1의 mRNA 수준 (RQ 약 3)은 ApoA-I 단독에 비해 증가되었지만, DMEM + cAMP에 대해서는 동일한 수준으로 증가되지 않았다 (RQ 약 6).
- [0353] **8.4.8.연구 H: CER-001 및 HDL₃의 존재 하에서의 J774 대식세포에서의 ABCA1 단백질 수준의 조절에 대한 효과**
- [0354] 이 연구는 J774 대식세포에서의 ABCA1의 단백질 수준에 대한 CER-001 및 HDL₃의 효과를 조사하였다. J774 대식 세포를 6 웰 플레이트 상에 시딩하고 (300,000 세포/웰), 산화된-LDL로 적하하였다. 다음날, 배지를 DMEM으로 대체하였다. 밤새 평형화한 후, 배지를 제거하고, CER-001 및 HDL₃ (250 μ g/mL)과 6시간 동안 혼합된 DMEM으로 대체하고, 세포를 용해시키고, 막을 섹션 8.3.7의 방법에 따라 분리하였다. 시토졸성 및 막 단백질을 SDS PAGE 10% 상에서 분해하고, ABCA1 (ab7360 - 희석 1/1000)에 대해 프로빙하였다. 단백질 수준을 이미지제이 (imageJ)® 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.
- [0355] CER-001 및 HDL₃으로 처리된 대식세포에 대해 ABCA1 단백질 수준의 유의한 감소가 관찰되었다 (도 20 및 도 21). ApoA-I은 ABCA1의 수준에 영향을 미치지 않았으며, cAMP의 첨가는 이 수준을 강하게 증가시켰다. 250 μ g/mL로 6시간 동안 J774 대식세포 상의 CER-001 및 HDL₃의 첨가는 ABCA1의 mRNA 및 단백질 수준을 감소시켰다.
- [0356] **8.4.9.연구 I: 증가하는 농도의 CER-001의 존재 하에서의 ABCA1 및 ABCG1 mRNA 수준의 조절에 대한 cAMP 효과**
- [0357] 이 연구는 cAMP로의 처리 후 ABCA1 및 ABCG1의 mRNA 수준에 대한 증가하는 농도의 CER-001의 효과를 조사한다. J774를 6 웰 플레이트 상에 시딩하고 (300,000 세포/웰), 산화된-LDL로 적하하였다. 다음날, 배지를 DMEM +/- cAMP (300 μ M)로 대체하였다. cAMP의 존재/부재 하에서 밤새 인큐베이션한 후, 배지를 제거하고, 상이한 농도 (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 및 30 μ g/mL)의 CER-001과 6시간 동안 혼합된 DMEM으로 대체하고, RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. ABCG1 (택맨 프로브 Mm00437390.m1) 및 ABCA1 (택맨 프로브 Mm00442646.m1) 발현을 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.
- [0358] cAMP의 존재 하에서, ABCA1 및 ABCG1 mRNA 수준에 대한 증가가 관찰되었다 (도 22, 도 23, 도 24, 도 25, 및 도 26). 4 내지 6 μ g/mL 용량에서 ABCA1 및 ABCG1 mRNA 수준의 감소가 관찰되었으며, 15 μ g/mL 주위에서 최대였다. cAMP 활성화는 ABCA1의 수준의 감소를 위해 충분한 용량의 CER-001을 변화시키지 않았는데, 이는 cAMP의 존재 또는 부재 하에서의 프로파일의 유사하였기 때문이다 (도 26).
- [0359] **8.4.10.연구 J: CER-001 및 HDL₃으로의 처리 후 ABCA1 및 ABCG1 mRNA의 정상적인 양으로의 복귀**
- [0360] 이 연구는 CER-001 및 HDL₃으로의 처리 후 ABCA1 및 ABCG1 mRNA의 정상적인 양으로 복귀하는데 필요한 시간을 조사하였다. J774를 DMEM 10% FCS 중에서 6 웰 플레이트 상에 시딩하였다 (600,000 세포/웰). 다음날, 배지를 혈청이 없는 DMEM으로 대체하고, CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I (250 μ g/mL)로 24시간 동안 처리하였다. 배지를 제거하고, 대식세포를 DMEM으로 세척하였다. CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I 제거 후 상이한 시점 (0, 1, 2, 4, 8 및 24시간)에서, 세포 RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. ABCG1 (택맨 프로브 Mm00437390.m1), ABCA1 (택맨 프로브 Mm00442646.m1) 및 SR-BI (택맨 프로브 Mm00450234.m1) 발현을 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.
- [0361] CER-001 및 HDL₃ 처리 후 ABCA1 및 ABCG1 mRNA 수준에 대한 감소가 관찰되었다. ApoA-I은 이들 mRNA의 수준에 영향을 미치지 않았으며, CER-001 및 HDL₃은 SR-BI의 mRNA 수준을 변화시키지 않는다 (도 27, 도 28, 및 도 29). CER-001 처리 후, ABCA1의 mRNA 수준은 8시간 초과에서 기준선으로 복귀하였으며, ABCG1에 대해, 기준선이 8시간에서 도달되었기 때문에 복귀는 보다 빨랐다. HDL₃ 처리 후, ABCA1의 mRNA 수준은 대략 8시간에서 기

준선으로 복귀하였으며, ABCG1에 대해, 2 내지 4시간이 필요하였다. CER-001 및 HDL₃ 처리 사이에 관찰된 차이는 아마도 CER-001의 존재 하에서의 mRNA의 보다 낮은 수준으로 인한 것이다. ApoA-I의 제거는 상이한 시점(ABCA1에 대해 1시간 및 ABCG1에 대해 4시간)에서 ABCA1 및 ABCG1 mRNA 수준의 증가를 유도하였다. CT는 대조군, 즉, CER-001, HDL₃ 또는 ApoA-I의 첨가 없이 성장된 J774 대식세포를 나타낸다.

[0362] **8.4.11. 연구 K: CER-001 및 HDL₃에 의한 ABCA1 및 SR-BI mRNA의 조절에 대한 대식세포 특이성 - 간세포 (마우스 및 인간)에 대한 효과**

[0363] 이 연구는 마우스 및 인간 간세포에서의 ABCA1 및 SR-BI mRNA 수준에 대한 CER-001 및 HDL₃ (25 µg/mL로의)의 효과를 조사하였다. HepG2 (인간 간세포) 및 Hepa1-6 (마우스 간세포)를 DMEM 10% FCS 중에서 6 웰 플레이트 (300,000 세포/웰) 상에 시딩하였다. 3일 후, CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I (DMEM 중 0.25, 25 및 250 µg/mL)을 간세포 상에 6시간 동안 첨가하고, RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다. 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. ABCA1 (HepG2 및 Hepa1-6에 대해 각각 택맨 프로브 Hs01059118.m1 및 Mm00442646.m1) 및 SR-BI (HepG2 및 Hepa1-6에 대해 각각 택맨 프로브 Hs00969821.m1 및 Mm00450234.m1) 발현을 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 Hepa1-6에 대해 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1) 및 HepG2 세포에 대해 GAPDH (택맨 프로브: Hs03929097.g1)이다.

[0364] CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I 처리에 대해 인간 간세포에서 ABCA1 및 SR-BI mRNA 수준의 유의한 감소는 관찰되지 않았다 (도 30 및 도 31). 250 µg/mL로의 CER-001 및 HDL₃ 처리에 대해 마우스 간세포에서 ABCA1 mRNA 수준의 2배 감소가 관찰되었다 (도 32 및 도 33). 250 µg/mL의 ApoA-I로의 처리는 마우스 간세포에서 ABCA1 mRNA 수준을 25% 감소시켰다.

[0365] **8.4.12. 연구 L: CER-001 및 HDL₃에 의한 ABCA1 하향-조절 후의 ApoA-I 첨가의 결과**

[0366] 이 연구는 CER-001 및 HDL₃에 의한 ABCA1 및 ABCG1의 하향-조절 후의 유전자 발현에 대한 ApoA-I 첨가의 효과를 조사하였다. J774를 DMEM 2.5% FCS 중에서 6 웰 플레이트 상에 시딩하였다 (300,000 세포/웰). 평형화 (DMEM) 후, CER-001, HDL₃ 및 ApoA-I를 250 µg/mL로 밤새 첨가하였다. 다음날, 배지를 ApoA-I (25 또는 250 µg/mL)이 있거나 없이 보충된 신선한 DMEM으로 대체하여 ApoA-I 콜레스테롤 유출을 2시간 동안 개시하였다. 실험을 상이한 시점에서 중지하였다: 1) J774는 ApoA-I의 첨가 전에 중지하고, 2) J774 + DMEM (2시간 동안 수동 유출), 3) J774 + ApoA-I (25 µg/mL)은 2시간 동안, 및 4) J774 + ApoA-I (250 µg/mL)은 2시간 동안. RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다. 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. ABCA1 (택맨 프로브 Mm00442646.m1), ABCG1 (택맨 프로브 Mm00437390.m1), 및 SR-BI (택맨 프로브 Mm00450234.m1) 발현을 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.

[0367] 250 µg/mL의 ApoA-I의 첨가는 2시간 후에 ABCA1 mRNA 수준을 증가시켰다 (DMEM 조건 - 4번째 막대) (도 34). 6시간에서 수준이 기준선으로 돌아왔기 때문에 이 증가는 일시적이었다 (실험 F 참조). CER-001 또는 HDL₃의 첨가는 ABCA1 mRNA 수준을 강하게 감소시켰다 (흑색 막대). 지단백질의 제거 2시간 후, ABCA1 mRNA 수준은 이전의 결과에 따라 증가하며 (실험 I 참조), 이 증가는 250 µg/mL의 ApoA-I의 첨가에 의해 신장되었다. ApoA-I 250 µg/mL로의 대식세포의 예비-인큐베이션은 ABCA1 mRNA 수준을 변화시키지 않았다. 250 µg/mL의 DMEM + ApoA-I로 주목된 자극이 또한 250 µg/mL의 ApoA-I 예비-인큐베이션을 갖는 조건에서 관찰되었다. 상이한 조건에 대한 ABCG1 mRNA 조절에 대해 유사한 프로파일이 관찰되었다 (도 35). SR-BI mRNA는 HDL₃의 존재 하에서 증가하였지만, 다른 조건에 대해서는 그렇지 않았다 (도 36). ApoA-I의 첨가는 시험된 상이한 조건에 대해 SR-BI mRNA 수준을 변화시키지 않았다.

[0368] **8.4.13. 연구 M: J774 대식세포에서의 HDL₂에 의한 ABCA1, ABCG1 및 SR-BI mRNA 세포 수준의 조절**

[0369] 이 연구는 마우스 대식세포에서의 ABCA1, ABCG1 및 SR-BI mRNA 수준에 대한 HDL₂의 효과를 조사하였다. HDL₂는 HDL₃에 비해 보다 크고 보다 성숙한 지단백질이며, HDL₂는 ABCG1과 상호작용하고, HDL₃은 ABCA1과 상호작용한다.

J774를 6 웰 플레이트 상에 시딩하고 (300,000 세포/웰), 산화된-LDL로 적하하였다. HDL₂ (2.5 내지 1000 μ g/mL)를 대식세포 상에 6시간 동안 첨가하고, RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다. 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. ABCA1 (택맨 프로브 Mm00442646.m1), ABCG1 (택맨 프로브 Mm00437390.m1) 및 SR-BI (택맨 프로브 Mm00450234.m1) 유전자 발현을 제조자 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다. 실험에 사용된 HDL₂는 PBS 용액에 대해 신선하게 투석하였다.

[0370] 75 μ g/mL 초과인 HDL₂ 처리에 대해 마우스 대식세포에서 ABCA1 및 ABCG1 mRNA 수준의 유의한 감소가 관찰되었다 (도 37 및 도 38). SR-BI mRNA 수준은 75 μ g/mL 초과인 HDL₂ 농도에 대해 증가하기 시작한다 (도 39).

[0371] **8.4.14. 연구 N: J774 대식세포에서의 시클로텍스트린에 의한 ABCA1, ABCG1 및 SR-BI mRNA 세포 수준의 조절 - 시클로텍스트린의 존재 하에서의 콜레스테롤 유출의 측정**

[0372] 이 연구는 β -시클로텍스트린을 사용하여 세포내 콜레스테롤 농도가 CER-001 및 HDL₃으로 관찰된 J774 마우스 대식세포에서의 ABCA1 및 ABCG1의 하향-조절의 원인이 될 수 있는지 여부를 조사하였다. β -시클로텍스트린은 스테롤에 대해 높은 특이성을 가지며, 세포로부터 콜레스테롤을 유출시킬 수 있는 수용체성인 시클릭 올리고당류이다. J774를 24 웰 플레이트 상에 시딩하고 (60,000 세포/웰), DMEM 2.5% FCS 중에서 ³H-콜레스테롤 산화된-LDL로 적하하였다. 24시간 평형화 (DMEM) 후, β -시클로텍스트린 (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 및 30 mM)을 6시간 동안 첨가하였다. 섹션 8.3.6의 프로토콜을 사용하여 검정된 유출의 퍼센트를 배지 DPM/(배지 DPM + 세포 DPM)*100으로서 측정한다. 30 mM 용량은 최종 그래프에서 나타내지 않는데, 이는 용량이 세포독성이어서, 세포 집단의 반을 치사시키기 때문이다.

[0373] β -시클로텍스트린으로 콜레스테롤 유출에 대한 용량-의존성 증가가 관찰되었다 (도 40).

[0374] **8.4.15. 연구 O: J774 대식세포에서의 시클로텍스트린에 의한 ABCA1, ABCG1 및 SR-BI mRNA 세포 수준의 조절 - 유전자 발현의 측정**

[0375] 이 연구는 β -시클로텍스트린을 사용하여 세포내 콜레스테롤 농도가 CER-001 및 HDL₃으로 관찰된 J774 마우스 대식세포에서의 ABCA1 및 ABCG1의 하향-조절의 원인이 될 수 있는지 여부를 조사하였다. J774를 6 웰 플레이트 상에 시딩하였다 (300,000 세포/웰). β -시클로텍스트린 (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 및 30 mM)을 대식세포 상에 6시간 동안 첨가하고, RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다. 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. ABCA1 (택맨 프로브 Mm00442646.m1), ABCG1 (택맨 프로브 Mm00437390.m1) 및 SR-BI (택맨 프로브 Mm00450234.m1) 유전자 발현을 제조자 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.

[0376] β -시클로텍스트린의 존재 하에서 J774에서의 ABCA1 및 ABCG1 mRNA 수준에 대한 용량-의존성 감소가 관찰되었다 (도 41 및 도 42). 대조적으로, SR-BI은 β -시클로텍스트린으로 용량-의존성 증가를 나타내었다 (도 44).

[0377] **8.4.16. 연구 P: J774 대식세포에서의 시클로텍스트린에 의한 SREBP1, SREBP2 및 LXR mRNA 세포 수준의 조절 - 유전자 발현의 측정**

[0378] 이 연구는 β -시클로텍스트린을 사용하여 J774 대식세포에서의 LXR, SREBP1 및 SREBP2 mRNA 발현에 대한 β -시클로텍스트린의 효과를 조사하였다. J774를 6 웰 플레이트 상에 시딩하였다 (300,000 세포/웰). β -시클로텍스트린 (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 및 30 mM)을 대식세포 상에 6시간 동안 첨가하고, RNA를 리보퓨어™ 키트로 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다. 유전자 발현을 섹션 8.3.2 (RNA 추출); 8.3.4 (역 전사), 및 8.3.5 (qPCR)에 기재된 프로토콜을 사용하여 검정하였다. SREBP-1, SREBP-2 및 LXR 유전자 발현을 택맨 프로브 (각각 Mm01138344.m1, Mm01306292.m1, Mm00443451.m1)로 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 사용된 참조 유전자는 HPRT1 (택맨 프로브: Mm00446968.m1)이다.

[0379] 증가하는 농도의 β -시클로텍스트린으로 LXR mRNA에 대해 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (도 44). SREBP-2 mRNA는 최저 용량의 β -시클로텍스트린에 대해 증가하였으며, 플라토에 도달하였다 (도 46). CER-001 및 HDL₃ 처리로 관찰된 것과 유사한 SREBP-1 mRNA에 대한 용량-의존성 감소 (도 45)가 관찰되었다.

- [0380] 9.실시에 3: CER-001로 처리된 APO^{-/-} 마우스 유동 정지 모델에서의 플라크 퇴행의 측정
- [0381] 9.1.도입
- [0382] 연구 A 내지 F의 목적은 고 지방 식이로 공급된 apoE^{-/-} 마우스로부터의 걸찰된 좌측 목동맥에서의 플라크 진행에 대한 상이한 CER-001 농도의 효능을 측정하는 것이었다.
- [0383] 9.2.물질 및 방법
- [0384] 9.2.1.개관
- [0385] 이들 연구에 사용된 물질은 CER-001 (막 비바플로우 (Vivaflow) 30 KDa 카세트에 의해 농축된 1109HDL03-2X240913 배치) 및 정제된 인간 HDL₃을 포함한다. 실험 이전에, CER-001 및 HDL₃ 제제를 적어도 8 분취액/지단백질 농도 (1 분취액을 군 주사 당 사용함)로 분취하였다. 주사 이전에, 제제의 1 분취액을 약 37℃ 수조에서 5분 동안 인큐베이션함으로써 해동하고, 부드럽게 선회시켰다. 제제는 발포를 회피하기 위해 진탕하거나 격렬하게 교반하지 않아야 한다. 용액이 탁한 경우 또는 가시적인 입자가 관찰된 경우, 용액을 약 37℃의 수준에서 추가의 반시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0386] 인산염 완충 수크로스 희석제 (10 mM 인산염, 4% 수크로스 및 2% 만니톨, pH=7.4)를 제조하고, 분취하고, 약 -20℃에서 저장하였다. 위약 용액을 상이한 농도의 CER-001 및 HDL₃의 제조를 위해 사용하였다.
- [0387] 9.2.2.동물
- [0388] 이들 연구에 사용된 동물은 군주 C57B1/6 - B6.129P2-Apoetm1Unc/J의 마우스였다. 군주는 잭슨 래버러토리 (Jackson laboratory)로부터 얻으며, 찰스 리버 (Charles River)에 의해 유통된다. 이 종 및 군주는 콜레스테롤 대사의 연구에 대한 특징화가 잘 된 모델이다. 포함 기준은 중량: 21 그램 (8주령), 23 그램 (9주령) 및 25 그램 (12주령); 연령: 식이의 시작에서 8, 9 및 12주, 및 성별 및 수: 수컷, n=125 (군 당 12마리의 마우스)를 포함하였다.
- [0389] 동물을 프롤로그 바이오테크 (Prolog Biotech)의 동물 설비에 최대 12마리의 동물/우리의 군으로 수용하였다. 프롤로그 바이오테크는 프랑스 수의 당국 (French Veterinary Authorities)으로부터 얻어진 계약 번호 A-31-254-01을 갖는다. 각각의 우리에서, 2개의 이글루를 동물의 안녕에 첨가하였다. 동물을 연구의 시작 5일 전에 순응시켰다 (09/18 내지 09/23). 동물은 물 및 고 콜레스테롤 식이 (0.2% 콜레스테롤, 39.9% 지방, 14.4% 단백질, 45.7% 당)에 대한 접근을 가졌다. 모든 동물을 유사하게 및 그의 안녕에 대한 적절한 관심으로 프롤로그 바이오테크의 동물 설비의 일반적인 관행에 따라 관리하였다. 연구 계획은 프롤로그 바이오테크 윤리 위원회 (Prologue Biotech Ethical Committee)에 의해 승낙되었다 (N° CEF-2011-CER-09).
- [0390] 동물 실 조건은 하기와 같았다: 온도: 21 ± 1℃, 상대 습도: 50 ± 10% 및 명/암 사이클: 12시간/12시간 (07H/19H). 매월 동물 실 조건에 대한 보고를 편집한다. 각각의 동물을 매주 칭량하였다. 동물을 실험의 시작에 삽입된 귀고리에 의해 확인하였다.
- [0391] 9.2.3.처리
- [0392] 동물을 군 당 12 동물로 10 군으로 나누고, 표 4에 지시된 바와 같이 처리하였다.

<표 4>

| 표 4 | | | | |
|-----|------------------|---------------|---------------|-------|
| 군 | 제제 Id. | 용량 수준 (mg/kg) | HFD 에 대한 일의 수 | 주입의 수 |
| 1 | 위약 | 0 | 22 | 8 |
| 2 | CER-001 | 2 | 22 | 8 |
| 3 | CER-001 | 5 | 22 | 8 |
| 4 | CER-001 | 10 | 22 | 8 |
| 5 | CER-001 | 20 | 22 | 8 |
| 6 | CER-001 | 50 | 22 | 8 |
| 7 | HDL ₃ | 5 | 22 | 8 |
| 8 | HDL ₃ | 10 | 22 | 8 |
| 9 | HDL ₃ | 20 | 22 | 8 |
| 10 | HDL ₃ | 50 | 22 | 8 |

제제를 이소플루란으로 마취된 마우스의 안구-뒤 정맥에, 8회의 주사 동안 2일마다 1회 주사하였다 (50 μ l/마우스). 투여되는 용량은 각각의 우리 중의 마우스 체중의 평균에 기초하였다. 화합물을 매일 오전 10시에 주사하였다. 혈액 샘플링을 위해, 밤새 절식시킨 마우스를 지시된 용량으로 1회 샘플링하였다: (1) 투여전에 (오전 9시에) 안구-뒤 제거에 의해: 제1 주사 24시간 전/수술의 날; (2) 투여후에 (오전 9시에) 안구-뒤 제거에 의해: 마지막 주사 24시간 후; 및 (3) t=0 (오전 9시) 및 5번째 주사 후 지시된 시점에 꼬리 제거에 의해. 수집 직후, 혈액 샘플을 약 +4℃에서 유지하여 혈액 샘플의 변질을 회피하였다. 혈액 시편을 원심분리하고 (800 x g에서 10분 동안 +4℃에서), 혈장을 장래의 분석을 위해 보관하였다.

9.2.4. 수술

기관 수집을 위해, 마지막 주사 24시간 후, 마우스를 복강내로 주사된 케타민 (100 mg/kg) 및 크실라진 (10 mg/kg)의 믹스로 마취시켰으며, 동물은 2 또는 3분 후 잠이 들었다. 혈액을 모세관현상에 의해 제거하고 (안구-뒤 정맥 - 대략 200 μ l의 혈액), EDTA를 함유하는 튜브에 옮겼다. 그 후, 복부-흉부 절개를 수행하였다. 심장을 PBS로 우심실에 의해 관류하여 제1 세척을 수행하고, 필요할 경우 좌심실에 의해 하였다. 액체는 흉대동맥에 의해 유동했어야 한다.

좌측 및 우측 목동맥, 간, 비장 및 심장에 연결된 대동맥을 제거하고, -80℃에서 저장하였다. 간을 4개의 상이한 분취액으로 수집하였다. 기관 수집 후 잔류의 생물학적 시편을 버렸다. 대변 수집을 위해, 각각의 군에 대한 마지막 주사 일에, 우리를 새로운 리터로 바꾸고, 대변을 24시간 동안 수집하였다 (회생 일).

9.2.5. 총 혈장 콜레스테롤의 측정

실험 절차: 각각의 튜브에 콜레스테롤 표준물 (2 g/L): 0/0.625/1.25/1.875/2.5/3.75/5 μ l를 첨가한다. 혈장 샘플을 12,000 x g에서 1분 동안 원심분리한다. 종에 따라, 샘플을 표 5에 나타난 바와 같이 각각의 튜브 내로 첨가한다. 재구성된 완충제 0.5 ml를 각각의 튜브 (표준물 및 샘플)에 첨가하고, 볼텍싱하고, 37℃에서 5분 동안 인큐베이션한다. 각각의 튜브로부터 150 μ l를 96 웰 플레이트 중의 2개의 상이한 웰로 옮긴다. 500 nM에서의 흡광도를 판독한다.

<표 5>

| 표 5 | | | |
|----------------------------|---|---|---|
| 종 | 부피(μ l) 혈장 제 0 일 | 부피(μ l) 혈장 제 7 일 | 부피(μ l) 혈장 제 14 일 |
| 마우스 C57BL/6J | 5 μ l | 5 μ l | 5 μ l |
| 마우스 ApoE ^{-/-} KO | H ₂ O 중 1/10 희석된 샘플 20 μ l | H ₂ O 중 1/10 희석된 샘플 10 μ l | H ₂ O 중 1/10 희석된 샘플 10 μ l |
| 토끼 | 7.5 μ l | 7.5 μ l | 7.5 μ l |

9.2.6. 혈장 중의 비에스테르화된 콜레스테롤의 측정

실험 절차: 각각의 튜브에 콜레스테롤 표준물 (2 g/L): 0/0.625/1.25/1.875/2.5/3.75/5 μ l를 첨가한다. 혈장 샘플을 12,000 x g에서 1분 동안 원심분리한다. 종에 따라, 샘플을 표 6에 나타난 바와 같이 각각의 튜브 내로 첨가한다. 재구성된 완충제 0.5 ml를 각각의 튜브 (표준물 및 샘플)에 첨가하고, 볼텍싱하고, 37℃에서 5분 동

안 인큐베이션한다. 각각의 튜브로부터 150 μ l를 96 웰 플레이트 중의 2개의 상이한 웰로 옮긴다. 500 nM에서의 흡광도를 판독한다.

<표 6>

| 표 6 | | | |
|----------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 종 | 부피 μ l 제 0 일 | 부피 μ l 제 7 일 | 부피 μ l 제 14 일 |
| 마우스 C57BL/6J | 10 μ l | | |
| 마우스 ApoE ^{-/-} KO | 5 μ l | 2.5 μ l | 2.5 μ l |
| 토끼 | 20 μ l | | |

9.2.7.RP C18 HPLC에 의한 콜레스테롤의 측정

장비: HPLC (와터스 바이너리 (Waters Binary) HPLC 펌프 1525, 와터스 UV/가시광선 검출기 2489, 와터스 샘플 매니저 2767, 매스링크스 (Masslynx) 소프트웨어 (4.1), 컬럼: RP C18 조르박스 (Zorbax) 4.6 mm x 25 cm, 입도 10 μ m (또는 등가물), 아세토니트릴 HPLC 등급, 무수 에탄올, 물 (밀리큐 (milliQ)), 무수 에탄올 중 표준 콜레스테롤 0.1 g/l.

크로마토그래피 파라미터: 용리액 A: 86% 아세토니트릴, 10% 에탄올, 4% 물; 용리액 B: 86% 아세토니트릴, 14% 에탄올. 용리액을 사용 전에 초음파처리기 조에서 5분 동안 초음파처리한다. 유량: 1.5 mL/분; 압력: 1400 PSI; 검출: UV 214 nm; 구동 시간: 20분; 주입: 25 내지 100 μ l; 표 7에 나타난 구배 프로그램:

<표 7>

| 표 7 | | | |
|------|---------|-----|-----|
| 시간 분 | 유량 mL/분 | %A | %B |
| 0 | 1.5 | 100 | 0 |
| 10 | 1.5 | 100 | 0 |
| 11 | 1.5 | 0 | 100 |
| 12 | 1.5 | 0 | 100 |
| 13 | 1.5 | 100 | 0 |
| 35 | 1.5 | 100 | 0 |
| 36 | 0 | 100 | 0 |

샘플: 샘플을 섹션 9.2.8의 방법에 따라 제조한다. 에탄올성 추출물 50 μ l를 마이크로 바이알 내로 첨가하고, 40 μ l를 HPLC 내로 주입한다. 214 nm에서의 피크 면적을 측정하고, 추출물 중의 농도를 계산한다: [콜레스테롤 샘플] (μ g/ μ l) = 피크 면적/기울기/주입된 부피.

9.2.8.간으로부터의 콜레스테롤 추출

단계 1: 약 50 mg의 간을 칭량하고, 조직을 유리 튜브에 도입한다. 조직을 3 ml MeOH 중에서 균질화한다 (투락스®).

EDTA 5 mM (2:1). 클로로포름 3 ml 및 H₂O 3 ml를 첨가하고, 5분 동안 볼텍싱한다. 1,500 xg에서 10분 동안 원심분리하고, 하부 상을 수집한다. 용액을 2개의 유리 튜브 (작음)에 동등한 부피 (2 x 1.3 ml)로 분할한다.

단계 2: 용액을 하기와 같이 처리한다:

비에스테르화된 콜레스테롤: 용액을 건조시킨다. EtOH 400 μ l를 첨가하여 샘플을 가용화한다.

총 콜레스테롤: 용액을 건조시킨다. 메탄올성 KOH 용액 0.5 M 1 ml를 첨가한다. 60°C에서 적어도 1시간 동안 인큐베이션한다. 클로로포름 1 ml 및 H₂O 1 ml를 샘플에 첨가하고, 볼텍싱하고, 1,500 xg에서 10분 동안 원심분리하고, 하부 상을 수집함으로써 블라이 및 다이어 (Bligh and Dyer) 지질 추출을 수행한다. 유기 상을 건조시킨다. EtOH 400 μ l를 첨가하여 샘플을 가용화한다.

9.2.9.목동맥 또는 대동맥으로부터의 콜레스테롤 추출

단계 1: 수술용 스트랩을 제거하고 (목동맥에 대해서만), 조직을 유리 튜브에 도입한다. 목동맥에 대해 CHCl₃/MeOH (2:1) 1.8 ml 또는 대동맥에 대해 3 ml를 첨가한다. 4°C에서 밤새 혼합한다.

- [0421] **단계 2:** 목동맥 또는 대동맥을 제거하고, 건조시키고, 칭량한다. 유기 용액 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$)을 2개의 유리 튜브 (작음)에 동등한 부피로 분할한다. 용액을 하기와 같이 처리한다:
- [0422] 비에스테르화된 콜레스테롤: 용액을 건조시킨다. EtOH 200 μL 를 첨가하여 샘플을 가용화한다.
- [0423] 총 콜레스테롤: 용액을 건조시킨다. 에탄올성 KOH 용액 0.1 M 1 mL를 첨가한다. 60°C에서 적어도 1시간 동안 인큐베이션한다. 클로로포름 1 mL 및 H_2O 1 mL를 샘플에 첨가하고, 볼텍싱하고, 1,500 xg에서 10분 동안 원심 분리하고, 하부 상을 수집함으로써 블라이 및 다이어 지질 추출을 수행한다. 유기 상을 건조시킨다. EtOH 200 μL 를 첨가하여 샘플을 가용화한다.
- [0424] **9.3.생체내 플라크 진행 연구 A 내지 F의 결과**
- [0425] **9.3.1.연구 A: 결찰된 좌측 목동맥에서의 아테롬성동맥경화 플라크의 측정**
- [0426] 이 연구는 고 지방 식이로 공급된 apoE^{-/-} 마우스로부터의 결찰된 목동맥에서의 플라크 진행에 대한 CER-001 투여의 효과를 조사하였다. 마우스의 각각의 군에 대해, 목동맥의 콜레스테롤 함량을 지질 추출 및 HPLC 분석 후에 시험하였다. 결찰된 목동맥을 희생 일에 수집하고, -80°C에서 저장하였다. 지질을 유기 용액으로 추출하고, 콜레스테롤 농도를 HPLC에 의해 측정하였다.
- [0427] 결찰된 목동맥을 섹션 9.2.9의 방법에 따라 지질 추출하였다. 수술용 스트랩을 목동맥 (신선 중량)으로부터 제거하고, 조직을 유리 튜브에 도입하였다. 여기에 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1) 1.8 mL를 첨가하고, 4°C에서 밤새 혼합하였다. 그 후, 목동맥을 제거하고, 건조시키고, 칭량하고, 유기 용액 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$)을 2개의 유리 튜브에 동등한 부피로 분할하였다. 비에스테르화된 콜레스테롤 (UC)에 대해, β -시토스테롤 (내부 표준물) 100 μL 를 첨가하고, 용액을 건조시켰다. 여기에 EtOH 200 μL 를 첨가하여 샘플을 가용화하고, 샘플을 HPLC에 의해 UC 분석하였다. 총 콜레스테롤 (TC)에 대해, β -시토스테롤 (내부 표준물) 100 μL 를 첨가하고, 용액을 건조시켰다. 여기에 메탄올성 KOH 용액 0.1 M 1 mL를 첨가하고, 용액을 60°C에서 적어도 30분 동안 인큐베이션하였다. 콜레스테롤 추출을 위해, 클로로포름 1 mL를 첨가한 후, H_2O 1 mL를 첨가하고, 볼텍싱에 의해 혼합하는 블라이 및 다이어 절차를 수행하였다. 상이 분리된 경우, 하부 상을 수집하고, 건조시켰다. 여기에 EtOH 200 μL 를 첨가하여 샘플을 가용화하고, HPLC에 의해 TC 분석하였다. 콜레스테롤 농도를 HPLC에 의해 섹션 9.2.7의 방법에 따라 측정하였다. 간략하게, 50 μL 를 C18 조르박스:SB-C18 4,6X250 mm (아질런트 참조번호 880975-902) 컬럼 상에 주입하였다. 유량은 60%의 용리액 A (ACN/ETOH/ H_2O 85/10/5) 및 40%의 용리액 B (ACN/ETOH 86/14)에서 1.5 mL/분이었다. 구동 시간은 55분이었으며, 콜레스테롤에 대한 체류 시간은 22.85분이고, β -시토스테롤에 대한 체류 시간은 32.2분이었다. 시스템: 바이너리 펌프 와터스 1525 - 214 nm에서 설정된 UV 검출기- 소프트웨어: 매스링크스 4.1.
- [0428] CER-001 또는 HDL₃으로 처리된 마우스에 대한 결찰된 목동맥 중의 콜레스테롤 함량에 대해 유사한 프로파일이 관찰되었다 (도 47 및 도 48). 2, 5 및 10 mg/kg의 농도에 대해, 비에스테르화된 콜레스테롤의 25% 감소가 관찰되었으며, 결찰된 목동맥에서 총 콜레스테롤 함량의 50% 감소가 관찰되었다. 20 및 50 mg/kg의 용량에 대한 플라크 진행의 억제는 CER-001 및 HDL₃으로의 처리에 대해 대략 10%이다.
- [0429] **9.3.2.연구 B: CER-001 주입 후의 혈장 콜레스테롤 동원의 측정**
- [0430] 이 연구는 고 지방 식이로 공급된 apoE^{-/-} 마우스에서의 지단백질 프로파일에 대한 CER-001 투여의 결과를 조사하였다. 혈액을 수집하고, 5번째 주입 후 상이한 시점에서 분석하였다. 혈장 투여-전 (제1 주사 전) 및 혈장 투여-후 (마지막 주사 24시간 후)를 또한 비교하였다. 혈장을 총 및 비에스테르화된 콜레스테롤 및 인간 ApoA-I 함량에 대해 분석하였다.
- [0431] 총 및 비에스테르화된 콜레스테롤 농도를 각각 섹션 9.2.5 및 9.2.6의 프로토콜에 따라 측정하였다. 총 콜레스테롤로부터 비에스테르화된 콜레스테롤을 뺀 후 콜레스테롤 에스테르 농도를 측정하였다. 콜레스테롤의 동원을 군 당 12마리의 마우스에 대해 5번째 투여 후 (주사 1시간 전; 주사 1시간, 2시간, 4시간 및 24시간 후) 측정하였다. 동물을 밤새 절식시켰다.
- [0432] CER-001 또는 HDL₃의 주입 후 총 혈장 콜레스테롤 동원의 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (도 49 및 도 50). CER-001 및 HDL₃ 주입 후 비에스테르화된 콜레스테롤의 동원의 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (도 51 및 도

52). 50 mg/kg의 CER-001은 주입 2시간 및 4시간 후 혈장 비에스테르화된 콜레스테롤 농도를 증가시키는 것으로 나타났다.

[0433] CER-001 및 HDL₃에 대한 투여-후 프로파일은 총 및 비에스테르화된 콜레스테롤 농도가 HDL₃ 처리된 마우스에 비해 CER-001 처리된 동물에서 2배 더 높은 것을 제외하고는 유사하였다 (도 53 및 도 54). CER-001에 대해 10 mg/kg 초과 용량은 위약에 비해 8회의 주사 후 마우스 혈장 중의 콜레스테롤 농도를 증가시켰다. HDL₃ 주입은 위약 초과로 콜레스테롤 농도를 증가시키지 않았다.

[0434] 9.3.3. 연구 C: 혈장 인간 ApoA-I의 측정

[0435] 이 연구는 CER-001의 주입 후 혈장 중의 인간 ApoA-I의 농도를 측정함으로써 CER-001 주입의 동역학을 조사하였다. 혈장 중의 ApoA-I 농도를 ELISA (어세이 프로 (Assay Pro) EA5201-1)에 의해 제조자 지시서에 따라 측정하였다. ApoA-I 측정 이전에, 혈장을 마우스에게 주사되는 CER-001 및 HDL₃ 농도에 따라 1/100, 1/50 또는 1/10 희석하였다.

[0436] CER-001로 인간 ApoA-I 혈장 농도의 용량-의존성 증가가 관찰되었다. 혈장 중의 ApoA-I의 예상된 용량은 시험된 모든 농도에 대해 회복되었다 (도 55). HDL₃에 대해, 인간 ApoA-I 혈장 농도의 용량-의존성 증가가 관찰되었다 (도 56). 그러나, 인간 혈장 ApoA-I은 예상된 용량보다 3배 적게 농축되었다.

[0437] 9.3.4. 연구 D: 결찰된 목동맥에서의 ABCA1 발현의 웨스턴 블롯 측정

[0438] 이 연구는 ABCA1의 발현이 콜레스테롤 함량의 차이에 관련될 수 있는지를 조사하였으며, 마우스 결찰된 목동맥에서의 콜레스테롤 함량에서 감소 (5 mg/kg CER-001) 및 효과 없음 (50 mg/kg CER-001)이 관찰되었다. 클로로포름:메탄올로 미리 추출된 결찰된 목동맥을 NaOH 0.1 N에 가용화하였다 (100 µL/목동맥). 용액을 간단하게 초음파처리하고, 15,000 x g에서 10분 동안 원심분리하였다. 단백질 농도를 브래드포드 (Bradford) 검정으로 측정하고, 샘플 40 µg을 SDS-PAGE 상에 적하하였다. ABCA1 발현 (ab7360 - 희석 1/1000)을 이미지제이® 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0439] 50 mg/kg 용량의 CER-001 및 HDL₃에 대해 목동맥 ABCA1 함량에 대한 감소가 관찰되었다 (도 57). 5 mg/kg 용량은 CER-001 및 HDL₃ 둘 다에 대해 ABCA1 발현에 영향을 미치지 않았다. 결찰된 목동맥에서의 ABCA1 발현은 50 mg/kg CER-001 및 HDL₃ 용량에 대해 하향-조절되었다. 이들 대식세포에 대한 콜레스테롤 유출은 손상되었을 수 있으며, 이는 50 mg/kg의 농도에 대한 플라크 콜레스테롤 함량에 대한 효과의 부재를 설명할 수 있다.

[0440] 9.3.5. 연구 E: 마우스 간에서의 SR-BI 및 ABCA1의 측정

[0441] 이 연구는 CER-001의 마지막 주사 24시간 후의 간에서의 SR-BI 및 ABCA1 단백질 함량을 조사하였다. 한 조각의 간 (50 mg)을 PBS (500 µL)에서 간단한 초음파처리에 의해 용해시켰다. 샘플을 원심분리하고 (800 x g에서 10분 동안), 펠릿을 버렸다. 상청액을 30분 동안 16,000 x g에서 4°C에서 원심분리하고, PBS 1% 트리톤 X100 (200 µL)으로 가용화하였다. 가용화된 펠릿 10 µg을 SDS PAGE 10% 상에 적하하고, ABCA1 발현 (ab7360 - 희석 1/1000) 또는 SR-BI 발현 (ab24603 - 희석 1/1000)을 이미지제이® 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0442] ABCA1 목동맥 함량과 대조적으로, 증가하는 농도의 CER-001로 마우스 간에서 ABCA1 단백질 수준의 증가가 관찰되었다 (도 58). 이 차이는 i) 세포 집단이 상이하였음; 목동맥에서 세포 집단은 대식세포 및 내피 세포로 구성되고; 간에서 세포 집단은 대부분 간세포임, ii) CER-001의 형태 및 그의 기능이 둘 다의 경우에 상이함; 목동맥에 대해 CER-001은 콜레스테롤에서 부족하게 하전되며, 그의 기능은 세포로부터 콜레스테롤을 유출하는 것이고; 간에 대해, CER-001은 적하된 콜레스테롤이며, 그의 기능은 간에 의해 제거되어야 함에 의해 설명될 수 있다. ABCA1 발현은 콜레스테롤 함량에 의해 엄격하게 조절되기 때문에, 본 발명자들은 콜레스테롤 부족 환경 (예를 들어 높은 콜레스테롤 유출)에서, ABCA1 발현은 감소되고, 콜레스테롤 풍부 환경 (콜레스테롤 흡수)에서, ABCA1 발현은 증가된다고 가설화하였다. SR-BI에 대해, 증가하는 농도의 CER-001로 단백질 수준에 대해 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (도 59).

[0443] 9.3.6. 연구 F: 마우스 대변에서의 콜레스테롤 함량의 측정

[0444] 이 연구는 상이한 농도의 CER-001 및 HDL₃에 대한 마우스 대변 중의 콜레스테롤 함량을 분석하였다. 대변을 지질 추출하고, HPLC에 의해 그의 콜레스테롤 함량에 대해 분석하였다. 대변 (200 mg)을 메탄올:물 (50:50) 용액에 가용화하고, 투락스®로 1분 동안 혼합하였다. 용액을 동결시키고, 밤새 동결건조시켰다. 다음날, 클로로

포름/메탄올 (2:1) 4 mL를 첨가하고, 용액을 4℃에서 24시간 동안 혼합하였다. 여기에 물 (1.33 mL)을 첨가한 후, 용액을 혼합하고, 3700 x g에서 3분 동안 원심분리하였다. 유기 상을 보관하고, 건조시켰다. 펠릿을 무수 에탄올 (2 mL)에 가용화하고, 카트리지 AC 0.2 μm 상에서 여과하였다. 샘플 중의 콜레스테롤 농도를 섹션 9.2.7의 방법에 따라 분석하였다.

CER-001 및 HDL₃으로 주사된 마우스에 대해 대변 콜레스테롤 함량의 용량-의존성 증가가 관찰되었다 (도 60). 최대 콜레스테롤 배설은 10 mg/kg의 농도에 대해 관찰되었다.

10. 실시예 4: 저알파지질단백혈증을 갖는 환자에서의 CER-001의 임상 시험

10.1. 배경

세레니스 (Cerenis)는 유전적 결함으로 인해 저알파지질단백혈증을 갖는 대상체 (탄지에르병 환자 및 2명의 ABCA1 이형접합체를 포함함)에서 일부 초기 임상 시험 작업을 완료하였다.

RLT 경로의 평생 결핍 때문에 신체 전반에 걸쳐 혈관벽에 포획된 콜레스테롤의 부하는 "유도 단계" 동안 각각의 반복되는 용량으로 점증적으로 감소되어야 하며, 아테롬성동맥경화 플라크는 LDL 수준이 적당하게 제어된 환자에서 퇴행해야 한다. 요법은 적절한 콜레스테롤 항상성 - 즉, 내인성 LDL-C에 의한 조직으로의 전달 및 주입된 CER-001 프리-β-유사 HDL 입자에 의한 제거 사이의 균형을 유지하기 위해, 감소된 투약 간격으로 만성적으로 계속될 것이다 ("유지 단계"). CER-001 요법은 HDL 생성 및 RLT의 선천적 결함이 유전적 인과관계에 의해 영구적이기 때문에 평생 동안일 수 있다.

하기 표 8은 시험 (SAMBA 시험으로 지칭됨)에 포함된 환자의 프로파일을 나타낸다.

<표 8>

| 표 8 | | | | | |
|----------|-------------------------|-------------------|--------------------|---------------|-------------------------------------|
| 대상체 | 유전자형 | 기준선 HDL-c (mg/dL) | 기준선 ApoA-I (mg/dL) | CV 병력 | 지질 제어 의약 |
| 001 M/46 | ApoA-I -/- | 1.8 | 1.8 | CABG | 아토르바스타틴 80 mg 에제티미브 10 mg 니아신 |
| 002 M/55 | ABCA1 +/- | 19.7 | 28.7 | MI x 3 PCI | 로수바스타틴 15 mg |
| 003 M/49 | ABCA1 +/- ApoA-I +/- | 6.2 | 16.5 | MI PCI | 로수바스타틴 10 mg |
| 004 M/51 | LCAT +/- | 29.0 | 59.1 | MI x 2 | 심바스타틴 40 mg 에제티미브 10 mg |
| 005 M/68 | ABCA1 +/- | 13.8 | 51.6 | 고혈압 | 없음 |
| 006 F/51 | ApoA-I +/- | 37.4 | 70.2 | 없음 | 없음 |
| 007 F/47 | ABCA1 -/- | 0.6 | 7.9 | PCI | 아스피린 로수바스타틴 10 mg 에제티미브 10 mg |

환자를 초기에 4주에 걸쳐 8 mg/kg의 용량으로 CER-001의 9 용량을 받는 강한 "유도 단계"에서 치료하였다. 이 유도 단계 후, 연구 대상체를 지단백질 프로파일 및 MRI 스캔으로 재-평가하였다. 이어서, 연구 대상체는 6개월의 총 요법 동안 "유지 단계"에서 2주마다 1회 치료받기를 계속하였다. 그 시점에서, 지단백질 프로파일 및 MRI 스캔을 반복하였다.

10.2. 결과

콜레스테롤 동원 및 LCAT에 의한 콜레스테롤 에스테르화에 대한 CER-001의 효과를 도 68a 내지 68g 및 도 69a 내지 69g에서 대상체별 (subject-by-subject) 기초로 나타낸다.

ApoA-I 유전자가 결여된 대상체 1 (동형접합체, ApoA-I-/-)은 8 mg/Kg의 CER-001의 하나의 용량 후 콜레스테롤 동원, LCAT 활성화, 및 대변 콜레스테롤 제거를 나타내었다.

ABCA1 유전자를 갖지 않으며 (동형접합체 ABCA1-/-), 탄지에르병을 앓고 있는 대상체 7은 8 mg/Kg의 CER-001의 하나의 용량 후 콜레스테롤 동원 및 LCAT 활성화를 나타내었다. 이 환자에서 대변 콜레스테롤 제거는 시험하지

않았다.

[0458] 도 70 및 도 71은 1개월의 치료 후 환자별 (patient-by-patient) 기초로, 각각 평균 목동맥 및 대동맥 혈관벽 두께를 나타낸다. 목동맥의 평균 혈관벽 두께는 1개월의 유도 요법 후 평균으로 -6.4% 감소하였으며, 대동맥의 평균 혈관벽 두께는 1개월의 유도 요법 후 평균으로 -4.6% 감소하였다. 동형접합성 ApoA-I 결핍 환자는 목동맥 평균 혈관벽 두께의 -17% 퇴행을 경험하였다. 도 72는 6개월 후의 평균 혈관벽 두께를 나타낸다. 평균 혈관벽 두께는 3테슬라 (3Tesla) MRI에 의해 측정하였다.

[0459] 이 시험은 메커니즘 (즉, CER-001이 RLT 경로의 모든 단계를 수행하는)의 증거 뿐만 아니라 이들 대상체에서 양성 치료 효과, 구체적으로 가장 현저한 결함 (동형접합성 ABCA1 결핍)을 갖는 대상체에서, 스타틴-미복용 고콜레스테롤혈증 대상체에서의 2년의 치료 후 나타난 감소에 상응한, 1개월의 집중 치료 후 목동맥 내막-중막 두께의 감소의 증거를 입증하였다. 중요하게, 관찰된 감소는 치료 표준 (집중 개별화 지질 관리)의 상부에서 나타났다. 중요하게, 추가의 5개월의 유지 요법 후 지속적이고 누적되는 유익이 나타났으며, 이는 가족성 저알파지질단백혈증을 갖는 환자가 평생 동안 만성 ApoA-I 대체 요법을 요구하는 치료 원리를 뒷받침한다. ABCA1 결핍에서, ABCA1의 부재 하에서 또는 ABCA1 기능의 부재 하에서, 콜레스테롤은 여전히 CER-001에 대해 유출되었는데, 이는 아마도 다른 수용체, 예컨대 ABCG1 (그러나 이에 제한되지 않음)에 의한 유출 경로의 중복이 있기 때문이다.

[0460] 11.구체적인 실시양태

[0461] 본 개시내용의 다양한 측면은 하기 넘버링된 단락에 설명된 실시양태에 기재된다.

[0462] 1. (a) HDL 치료제의 제1 용량을 대상체에게 투여하고, (b) 상기 제1 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고; (c) (i) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 제1 용량보다 낮은 상기 HDL 치료제의 제2 용량을 투여하거나; 또는 (ii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되지 않는 경우, 대상체를 상기 HDL 치료제의 제1 용량으로 치료하는 것을 포함하는 대상체에서 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법.

[0463] 2. (a) 대상체를 제1 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 치료하고, (b) 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 투약 스케줄의 효과를 평가하고; (c) (i) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 상한 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 보다 낮은 용량의 HDL 치료제를 투여하는 것, 보다 긴 기간에 걸쳐 HDL 치료제를 대상체 내로 주입하는 것, 및 보다 적은 빈도 기준으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하는 것 중 하나 이상을 포함하는 제2 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 대상체를 치료하거나; (ii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 하한 컷오프량 초과만큼 감소되지 않는 경우, 보다 높은 용량의 HDL 치료제를 투여하는 것, 보다 짧은 기간에 걸쳐 HDL 치료제를 대상체 내로 주입하는 것, 및 보다 많은 빈도 기준으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하는 것 중 하나 이상을 포함하는 제2 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 대상체를 치료하거나; 또는 (iii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 상한 및 하한 컷오프량 사이의 양만큼 감소되는 경우, 대상체를 제1 투약 스케줄에 따라 치료하기를 계속하는 것을 포함하는 대상체에서의 HDL 치료제의 효능의 모니터링 방법.

[0464] 3. 실시양태 1 또는 실시양태 2에 있어서, 컷오프량이 상기 투여 이전의 대상체 자신의 기준선에 상대적인 것인 방법.

[0465] 4. 실시양태 1 또는 실시양태 2에 있어서, 컷오프량이 대조량에 상대적인 것인 방법.

[0466] 5. 실시양태 4에 있어서, 대조량이 집단 평균인 방법.

[0467] 6. 실시양태 5에 있어서, 집단 평균이 건강한 대상체로부터의 것인 방법.

[0468] 7. 실시양태 5에 있어서, 집단 평균이 대상체와 동일한 질환 상태를 갖는 집단으로부터의 것인 방법.

[0469] 8. (a) HDL 치료제의 제1 용량을 대상체의 집단에게 투여하고, (b) 상기 제1 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고; (c) 제1 용량보다 높거나 낮은 상기 HDL 치료제의 제2 용량을 투여하고, (d) 상기 제2 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 및/또는 제2 용량의 효과를 평가하고; (e) 임의로 단계 (c) 및 (d)를 상기 HDL 치료제의 하나 이상의 추가의 용량으로 반복하고; (f) 하나

이상의 HDL 마커의 발현 수준을 컷오프량 초과만큼 감소시키지 않는 최고 용량을 확인함으로써, 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 상기 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법.

- [0470] 9. 실시양태 8에 있어서, 단계 (d)가 상기 제2 용량을 투여한 후 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0471] 10. 실시양태 1 내지 9 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 제2 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제2 용량의 효과를 평가하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0472] 11. 실시양태 10에 있어서, 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 상기 HDL 치료제의 제3 용량이 투여되며, 여기서 상기 HDL 치료제의 제3 용량은 제2 용량보다 낮은 것인 방법.
- [0473] 12. (a) HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 대상체의 기준선량에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량으로의, 임의로 지단백질 복합체인 HDL 치료제; 및 (b) 담즙-산 수치, 니아신, 스타틴, 피브레이트, PCSK9 억제제, 에제티미브, 및 CETP 억제제로부터 임의로 선택되는 콜레스테롤 감소 요법의 조합을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 치료 방법.
- [0474] 13. 실시양태 12에 있어서, HDL 치료제가 지단백질 복합체인 방법.
- [0475] 14. (a) HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 대조량에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량으로의, 임의로 지단백질 복합체인 HDL 치료제; 및 (b) 담즙-산 수치, 니아신, 스타틴, 피브레이트, PCSK9 억제제, 에제티미브, 및 CETP 억제제로부터 임의로 선택되는 콜레스테롤 감소 요법의 조합을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 치료 방법.
- [0476] 15. 실시양태 14에 있어서, HDL 치료제가 지단백질 복합체인 방법.
- [0477] 16. 실시양태 14 또는 15에 있어서, 대조량이 집단 평균인 방법.
- [0478] 17. 실시양태 16에 있어서, 집단 평균이 건강한 대상체로부터의 것인 방법.
- [0479] 18. 실시양태 16에 있어서, 집단 평균이 대상체와 동일한 질환 상태를 갖는 집단으로부터의 것인 방법.
- [0480] 19. 실시양태 1 내지 18 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 인간이거나, 대상체의 집단이 인간 대상체의 집단인 방법.
- [0481] 20. 실시양태 1 내지 18 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 비-인간 동물이거나, 대상체의 집단이 비-인간 동물의 집단인 방법.
- [0482] 21. 실시양태 20에 있어서, 비-인간 동물이 마우스인 방법.
- [0483] 22. 실시양태 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 HDL 마커가 ABCA1인 방법.
- [0484] 23. 실시양태 22에 있어서, ABCA1 mRNA 발현 수준이 측정되는 것인 방법.
- [0485] 24. 실시양태 22에 있어서, ABCA1 단백질 발현 수준이 측정되는 것인 방법.
- [0486] 25. 실시양태 22 내지 24 중 어느 한 실시양태에 있어서, ABCA1 컷오프량이 20% 내지 80%인 방법.
- [0487] 26. 실시양태 25에 있어서, ABCA1 컷오프량이 30% 내지 70%인 방법.
- [0488] 27. 실시양태 26에 있어서, ABCA1 컷오프량이 40% 내지 60%인 방법.
- [0489] 28. 실시양태 27에 있어서, ABCA1 컷오프량이 50%인 방법.
- [0490] 29. 실시양태 22 내지 28 중 어느 한 실시양태에 있어서, ABCA1 발현 수준이 상기 제1 용량 또는 상기 제2 용량의 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정되는 것인 방법.

- [0491] 30. 실시양태 1 내지 29 중 어느 한 실시양태에 있어서, 적어도 하나의 HDL 마커가 ABCG1인 방법.
- [0492] 31. 실시양태 30에 있어서, ABCG1 mRNA 발현 수준이 측정되는 것인 방법.
- [0493] 32. 실시양태 30에 있어서, ABCG1 단백질 발현 수준이 측정되는 것인 방법.
- [0494] 33. 실시양태 30 내지 32 중 어느 한 실시양태에 있어서, ABCG1 컷오프량이 20% 내지 80%인 방법.
- [0495] 34. 실시양태 33에 있어서, ABCG1 컷오프량이 30% 내지 70%인 방법.
- [0496] 35. 실시양태 34에 있어서, ABCG1 컷오프량이 40% 내지 60%인 방법.
- [0497] 36. 실시양태 35에 있어서, ABCA1 컷오프량이 50%인 방법.
- [0498] 37. 실시양태 30 내지 36 중 어느 한 실시양태에 있어서, ABCG1 발현 수준이 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정되는 것인 방법.
- [0499] 38. 실시양태 1 내지 37 중 어느 한 실시양태에 있어서, 적어도 하나의 HDL 마커가 SREBP-1인 방법.
- [0500] 39. 실시양태 38에 있어서, SREBP-1 mRNA 발현 수준이 측정되는 것인 방법.
- [0501] 40. 실시양태 38에 있어서, SREBP-1 단백질 발현 수준이 측정되는 것인 방법.
- [0502] 41. 실시양태 38 내지 40 중 어느 한 실시양태에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 20% 내지 80%인 방법.
- [0503] 42. 실시양태 41에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 30% 내지 70%인 방법.
- [0504] 43. 실시양태 42에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 40% 내지 60%인 방법.
- [0505] 44. 실시양태 43에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 50%인 방법.
- [0506] 45. 실시양태 38 내지 44 중 어느 한 실시양태에 있어서, SREBP-1 발현 수준이 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정되는 것인 방법.
- [0507] 46. 실시양태 1 내지 45 중 어느 한 실시양태에 있어서, HDL 치료제가 지단백질 복합체인 방법.
- [0508] 47. 실시양태 46에 있어서, 지단백질 복합체가 아포지단백질을 포함하는 것인 방법.
- [0509] 48. 실시양태 47에 있어서, 아포지단백질이 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoE 또는 그의 조합인 방법.
- [0510] 49. 실시양태 46에 있어서, 지단백질 복합체가 아포지단백질 펩티드 모방체를 포함하는 것인 방법.
- [0511] 50. 실시양태 49에 있어서, 펩티드 모방체가 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, 또는 ApoE 펩티드 모방체 또는 그의 조합인 방법.
- [0512] 51. 실시양태 46에 있어서, 지단백질 복합체가 CER-001, CSL-111, CSL-112, 또는 ETC-216인 방법.
- [0513] 52. 실시양태 1 내지 45 중 어느 한 실시양태에 있어서, HDL 치료제가 소분자인 방법.
- [0514] 53. 실시양태 52에 있어서, 소분자가 CETP 억제제인 방법.
- [0515] 54. 실시양태 52에 있어서, 소분자가 판토텐산 유도체인 방법.
- [0516] 55. 실시양태 1 내지 46 중 어느 한 실시양태에 있어서, 컷오프량을 측정하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0517] 56. 실시양태 55에 있어서, 컷오프량이 HDL 치료제에 대한 용량 반응 곡선을 생성함으로써 측정되는 것인 방법.
- [0518] 57. 실시양태 56에 있어서, 컷오프량이 용량 반응 곡선에서 변곡점을 발생시키는 용량의 25% 내지 75%인 방법.
- [0519] 58. 실시양태 57에 있어서, 컷오프량이 용량 반응 곡선에서 변곡점을 발생시키는 용량의 40% 내지 60%인 방법.
- [0520] 59. 실시양태 1 내지 58 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체 또는 대상체의 집단이 ABCA1 결핍을 갖는 것인 방법.
- [0521] 60. 실시양태 59에 있어서, 대상체 또는 대상체의 집단이 ABCA1 돌연변이에 대해 동형접합성인 방법.

- [0522] 61. 실시양태 59에 있어서, 대상체 또는 대상체의 집단이 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성인 방법.
- [0523] 62. (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체에게 투여하고, (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고; (c) 상기 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 상승시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법.
- [0524] 63. (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체의 집단에 투여하고, (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 상기 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 상승시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법.
- [0525] 64. 세포 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 HDL 치료제의 최고 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법.
- [0526] 65. 실시양태 64에 있어서, (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체 또는 대상체의 집단에 투여하고; (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 방법.
- [0527] 66. 세포 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 HDL 치료제의 가장 빈번한 투약 처방의 최고 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 투약 간격의 확인 방법.
- [0528] 67. 실시양태 66에 있어서, (a) HDL 치료제를 하나 이상의 투약 빈도에 따라 대상체 또는 대상체의 집단에 투여하고; (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 투약 빈도를 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 방법.
- [0529] 68. 실시양태 67에 있어서, 하나 이상의 투약 빈도가 (a) 2일마다 1 내지 4시간 주입으로서의 투여; (b) 3일마다 1 내지 4시간 주입으로서의 투여; (c) 1주마다 24시간 주입으로서의 투여; 및 (d) 2주마다 24시간 주입으로서의 투여로부터 선택되는 하나 이상의 투약 빈도를 포함하는 것인 방법.
- [0530] 69. 실시양태 65 내지 68 중 어느 한 실시양태에 있어서, 콜레스테롤 유출이 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서 측정되는 것인 방법.
- [0531] 70. 대상체에게 치료 유효량의 HDL 치료제를 투여하는 것을 포함하는 ABCA1 결핍을 갖는 대상체의 치료 방법.
- [0532] 71. 실시양태 70에 있어서, HDL 치료제가 CER-001인 방법.
- [0533] 72. 실시양태 70 또는 71에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성인 방법.
- [0534] 73. 실시양태 70 또는 71에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 동형접합성인 방법.
- [0535] 74. (a) 가족성 원발성 저알파지질단백혈증을 앓고 있는 대상체에게 HDL 치료제를 유도 처방에 따라 투여하고; 이어서 (b) 대상체에게 HDL 치료제를 유지 처방에 따라 투여하는 것을 포함하는 가족성 원발성 저알파지질단백혈증을 앓고 있는 대상체의 치료 방법.
- [0536] 75. 실시양태 74에 있어서, 유지 처방이 HDL 치료제를 보다 낮은 용량, 보다 낮은 빈도, 또는 둘 다로 투여하는 것을 수반하는 것인 방법.
- [0537] 76. 실시양태 74 또는 실시양태 75에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성인 방법.
- [0538] 77. 실시양태 74 또는 실시양태 75에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 동형접합성인 방법.
- [0539] 78. 실시양태 74 내지 77 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 LCAT 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성인 방법.
- [0540] 79. 실시양태 74 내지 78 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 ApoA-I 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성인 방법.
- [0541] 80. 실시양태 74 내지 79 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 ABCG1 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이

형접합성인 방법.

- [0542] 81. 실시양태 74 내지 80 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 또한 지질 제어 의약으로 치료되는 것인 방법.
- [0543] 82. 실시양태 81에 있어서, 지질 제어 의약이 아토르바스타틴, 에제티미브, 니아신, 로수바스타틴, 심바스타틴, 아스피린, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴 또는 그의 조합인 방법.
- [0544] 83. 실시양태 74 내지 82 중 어느 한 실시양태에 있어서, HDL 치료제가 CER-001인 방법.
- [0545] 84. 실시양태 83에 있어서, 유도 처방이 4주의 기간의 것인 방법.
- [0546] 85. 실시양태 83 또는 실시양태 84에 있어서, 유도 처방이 CER-001을 1주 3회 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0547] 86. 실시양태 83 내지 85 중 어느 한 실시양태에 있어서, 유도 처방에서 투여되는 용량이 8 내지 15 mg/kg (단백질 중량 기준으로)인 방법.
- [0548] 87. 실시양태 86에 있어서, 유도 처방에서 투여되는 용량이 8 mg/kg, 12 mg/kg 또는 15 mg/kg인 방법.
- [0549] 88. 실시양태 83 내지 87 중 어느 한 실시양태에 있어서, 유지 처방이 CER-001을 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 1년, 적어도 18개월, 적어도 2년 동안, 또는 무기한으로 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0550] 89. 실시양태 83 내지 88 중 어느 한 실시양태에 있어서, 유지 처방이 CER-001을 1주 2회 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0551] 90. 실시양태 83 내지 89 중 어느 한 실시양태에 있어서, 유지 처방에서 투여되는 용량이 1 내지 6 mg/kg (단백질 중량 기준으로)인 방법.
- [0552] 91. 실시양태 90에 있어서, 유지 처방에서 투여되는 용량이 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 6 mg/kg인 방법.
- [0553] 92. 실시양태 74 내지 91 중 어느 한 실시양태에 있어서, (a) 유도 처방이 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 및/또는 집단 평균에 비해 20% 내지 80% 또는 40% 내지 60%만큼 감소시키는 용량을 이용하고/거나; (b) 유지 처방이 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 및/또는 집단 평균에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량을 이용하는 것인 방법.
- [0554] 93. 실시양태 92에 있어서, 유지 처방이 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 감소시키지 않는 용량을 이용하는 것인 방법.
- [0555] 94. (a) HDL 치료제의 제1 용량을 대상체에게 투여하고, (b) 상기 제1 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단백질, 대식세포 또는 단백질 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고; (c) (i) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 제1 용량보다 낮은 상기 HDL 치료제의 제2 용량을 투여하거나; 또는 (ii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되지 않는 경우, 대상체를 상기 HDL 치료제의 제1 용량으로 치료하는 것을 포함하는 대상체에서 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.
- [0556] 95. (a) 대상체를 제1 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 치료하고, (b) 상기 대상체의 순환 단백질, 대식세포 또는 단백질 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 투약 스케줄의 효과를 평가하고; (c) (i) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 상한 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 보다 낮은 용량의 HDL 치료제를 투여하는 것, 보다 긴 기간에 걸쳐 HDL 치료제를 대상체 내로 주입하는 것, 및 보다 적은 빈도 기준으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하는 것 중 하나 이상을 포함하는 제2 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 대상체를 치료하거나; (ii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 하한 컷오프량 초과만큼 감소되지 않는 경우, 보다 높은 용량의 HDL 치료제를 투여하는 것, 보다 짧은 기간에 걸쳐 HDL 치료제를 대상체 내로 주입하는 것, 및 보다 많은 빈도 기준으로 HDL 치료제를 대상체에게 투여하는 것 중 하나 이상을 포함하는 제2 투약 스케줄에 따라 HDL 치료제로 대상체를 치료하거나; 또는 (iii) 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 상한 및 하한 컷오프량 사이의 양만큼 감소되는 경우, 대상체를 제1 투약 스케줄에 따라 치료하기를 계속하는 것을 포함하는 대상체에서의 HDL 치료제의 효능의 모니터링 방법에 사용하기 위한 HDL

치료제.

- [0557] 96. 실시양태 94 또는 실시양태 95에 있어서, 컷오프량이 상기 투여 이전의 대상체 자신의 기준선에 상대적인 것인 HDL 치료제.
- [0558] 97. 실시양태 94 또는 실시양태 95에 있어서, 컷오프량이 대조량에 상대적인 것인 HDL 치료제.
- [0559] 98. 실시양태 97에 있어서, 대조량이 집단 평균인 HDL 치료제.
- [0560] 99. 실시양태 98에 있어서, 집단 평균이 건강한 대상체로부터의 것인 HDL 치료제.
- [0561] 100. 실시양태 98에 있어서, 집단 평균이 대상체와 동일한 질환 상태를 갖는 집단으로부터의 것인 HDL 치료제.
- [0562] 101. (a) HDL 치료제의 제1 용량을 대상체의 집단에게 투여하고, (b) 상기 제1 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하고; (c) 제1 용량보다 높거나 낮은 상기 HDL 치료제의 제2 용량을 투여하고, (d) 상기 제2 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 및/또는 제2 용량의 효과를 평가하고; (e) 임의로 단계 (c) 및 (d)를 상기 HDL 치료제의 하나 이상의 추가의 용량으로 반복하고; (f) 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 컷오프량 초과만큼 감소시키지 않는 최고 용량을 확인함으로써, 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 상기 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 콜레스테롤을 동원하는데 유효한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.
- [0563] 102. 실시양태 101에 있어서, 단계 (d)가 상기 제2 용량을 투여한 후 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제1 용량의 효과를 평가하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0564] 103. 실시양태 94 내지 101 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 제2 용량을 투여한 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하여 상기 발현 수준에 대한 상기 제2 용량의 효과를 평가하는 것을 추가로 포함하는 HDL 치료제.
- [0565] 104. 실시양태 102에 있어서, 대상체의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준이 컷오프량 초과만큼 감소되는 경우, 상기 HDL 치료제의 제3 용량이 투여되며, 여기서 상기 HDL 치료제의 제3 용량은 제2 용량보다 낮은 것인 HDL 치료제.
- [0566] 105. (a) 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현을 대상체의 기준선량 또는 대조량에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량으로의 HDL 치료제; 및 (b) 담즙산 수지, 니아신, 스타틴, 피브레이트, PCSK9 억제제, 에세티미브, 및 CETP 억제제로부터 임의로 선택되는 콜레스테롤 감소 요법의 조합을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 HDL 치료제를 필요로 하는 대상체의 치료 방법에 사용하기 위한, 임의로 지단백질 복합체인 HDL 치료제.
- [0567] 106. 실시양태 105에 있어서, 지단백질 복합체인 HDL 치료제.
- [0568] 107. 실시양태 105 또는 106에 있어서, 비교되는 양이 대상체의 기준선량인 HDL 치료제.
- [0569] 108. 실시양태 105 또는 106에 있어서, 비교되는 양이 대조량이고 집단 평균인 HDL 치료제.
- [0570] 109. 실시양태 108에 있어서, 집단 평균이 건강한 대상체로부터의 것인 HDL 치료제.
- [0571] 110. 실시양태 108에 있어서, 집단 평균이 대상체와 동일한 질환 상태를 갖는 집단으로부터의 것인 HDL 치료제.
- [0572] 111. 실시양태 94 내지 110 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 인간이거나, 대상체의 집단이 인간 대상체의 집단인 HDL 치료제.
- [0573] 112. 실시양태 94 내지 110 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 비-인간 동물이거나, 대상체의 집단이 비-인간 동물의 집단인 HDL 치료제.
- [0574] 113. 실시양태 112에 있어서, 비-인간 동물이 마우스인 HDL 치료제.
- [0575] 114. 실시양태 94 내지 113 중 어느 한 실시양태에 있어서, 적어도 하나의 HDL 마커가 ABCA1인 HDL 치료제.
- [0576] 115. 실시양태 114에 있어서, ABCA1 mRNA 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.

- [0577] 116. 실시양태 114에 있어서, ABCA1 단백질 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.
- [0578] 117. 실시양태 114 내지 116 중 어느 한 실시양태에 있어서, ABCA1 컷오프량이 20% 내지 80%인 HDL 치료제.
- [0579] 118. 실시양태 117에 있어서, ABCA1 컷오프량이 30% 내지 70%인 HDL 치료제.
- [0580] 119. 실시양태 118에 있어서, ABCA1 컷오프량이 40% 내지 60%인 HDL 치료제.
- [0581] 120. 실시양태 119에 있어서, ABCA1 컷오프량이 50%인 HDL 치료제.
- [0582] 121. 실시양태 114 내지 120 중 어느 한 실시양태에 있어서, ABCA1 발현 수준이 상기 제1 용량 또는 상기 제2 용량의 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정되는 것인 HDL 치료제.
- [0583] 122. 실시양태 94 내지 121 중 어느 한 실시양태에 있어서, 적어도 하나의 HDL 마커가 ABCG1인 HDL 치료제.
- [0584] 123. 실시양태 122에 있어서, ABCG1 mRNA 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.
- [0585] 124. 실시양태 122에 있어서, ABCG1 단백질 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.
- [0586] 125. 실시양태 122 내지 124 중 어느 한 실시양태에 있어서, ABCG1 컷오프량이 20% 내지 80%인 HDL 치료제.
- [0587] 126. 실시양태 125에 있어서, ABCG1 컷오프량이 30% 내지 70%인 HDL 치료제.
- [0588] 127. 실시양태 126에 있어서, ABCG1 컷오프량이 40% 내지 60%인 HDL 치료제.
- [0589] 128. 실시양태 127에 있어서, ABCA1 컷오프량이 50%인 HDL 치료제.
- [0590] 129. 실시양태 122 내지 128 중 어느 한 실시양태에 있어서, ABCG1 발현 수준이 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정되는 것인 HDL 치료제.
- [0591] 130. 실시양태 94 내지 129 중 어느 한 실시양태에 있어서, 적어도 하나의 HDL 마커가 SREBP-1인 HDL 치료제.
- [0592] 131. 실시양태 130에 있어서, SREBP-1 mRNA 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.
- [0593] 132. 실시양태 130에 있어서, SREBP-1 단백질 발현 수준이 측정되는 것인 HDL 치료제.
- [0594] 133. 실시양태 130 내지 132 중 어느 한 실시양태에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 20% 내지 80%인 HDL 치료제.
- [0595] 134. 실시양태 133에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 30% 내지 70%인 HDL 치료제.
- [0596] 135. 실시양태 134에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 40% 내지 60%인 HDL 치료제.
- [0597] 136. 실시양태 135에 있어서, SREBP-1 컷오프량이 50%인 HDL 치료제.
- [0598] 137. 실시양태 130 내지 136 중 어느 한 실시양태에 있어서, SREBP-1 발현 수준이 투여 2 내지 12시간, 4 내지 10시간, 2 내지 8시간, 2 내지 6시간, 4 내지 6시간 또는 4 내지 8시간 후에 측정되는 것인 HDL 치료제.
- [0599] 138. 실시양태 94 내지 137 중 어느 한 실시양태에 있어서, HDL 치료제가 지단백질 복합체인 HDL 치료제.
- [0600] 139. 실시양태 138에 있어서, 지단백질 복합체가 아포지단백질을 포함하는 것인 HDL 치료제.
- [0601] 140. 실시양태 139에 있어서, 아포지단백질이 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoE 또는 그의 조합인 HDL 치료제.
- [0602] 141. 실시양태 138에 있어서, 지단백질 복합체가 아포지단백질 펩티드 모방체를 포함하는 것인 HDL 치료제.
- [0603] 142. 실시양태 141에 있어서, 펩티드 모방체가 ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, 또는 ApoE 펩티드 모방체 또는 그의 조합인 HDL 치료제.
- [0604] 143. 실시양태 138에 있어서, 지단백질 복합체가 CER-001, CSL-111, CSL-112, 또는 ETC-216인 HDL 치료제.
- [0605] 144. 실시양태 94 내지 137 중 어느 한 실시양태에 있어서, HDL 치료제가 소분자인 HDL 치료제.
- [0606] 145. 실시양태 144에 있어서, 소분자가 CETP 억제제인 HDL 치료제.
- [0607] 146. 실시양태 144에 있어서, 소분자가 판토텐산 유도체인 HDL 치료제.
- [0608] 147. 실시양태 94 내지 138 중 어느 한 실시양태에 있어서, 컷오프량을 측정하는 것을 추가로 포함하는 HDL 치

료제.

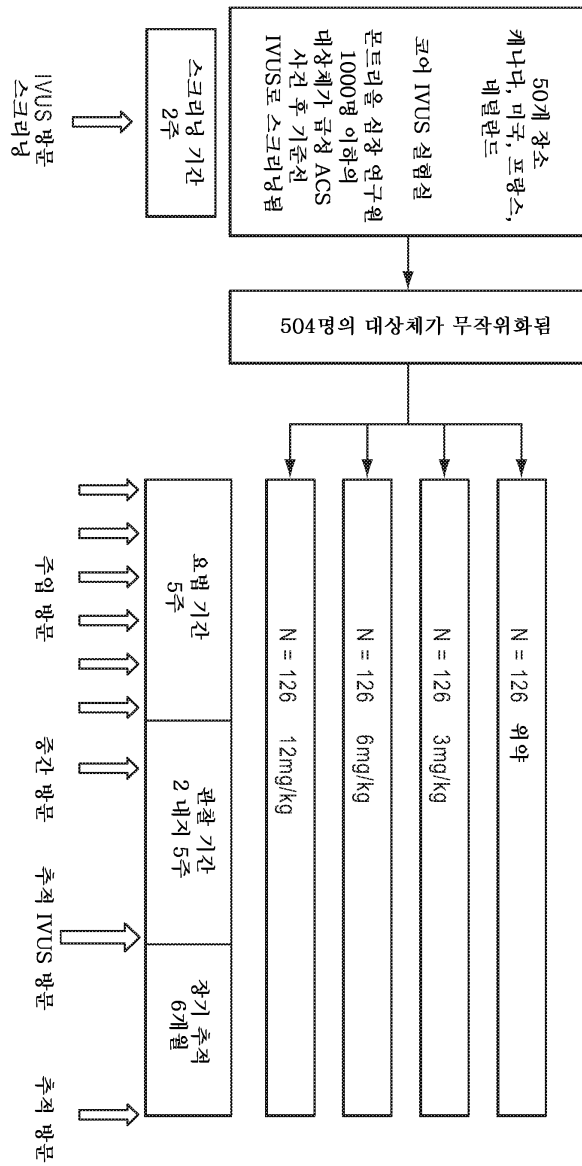
- [0609] 148. 실시양태 147에 있어서, 컷오프량이 HDL 치료제에 대한 용량 반응 곡선을 생성함으로써 측정되는 것인 HDL 치료제.
- [0610] 149. 실시양태 148에 있어서, 컷오프량이 용량 반응 곡선에서 변곡점을 발생시키는 용량의 25% 내지 75%인 HDL 치료제.
- [0611] 150. 실시양태 149에 있어서, 컷오프량이 용량 반응 곡선에서 변곡점을 발생시키는 용량의 40% 내지 60%인 HDL 치료제.
- [0612] 151. 실시양태 94 내지 150 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체 또는 대상체의 집단이 ABCA1 결핍을 갖는 것인 HDL 치료제.
- [0613] 152. 실시양태 151에 있어서, 대상체 또는 대상체의 집단이 ABCA1 돌연변이에 대해 동형접합성인 HDL 치료제.
- [0614] 153. 실시양태 151에 있어서, 대상체 또는 대상체의 집단이 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성인 HDL 치료제.
- [0615] 154. (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체에게 투여하고, (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고; (c) 상기 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 상승시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.
- [0616] 155. (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체의 집단에게 투여하고, (b) 각각의 용량 후, 상기 대상체의 순환 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서의 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 상기 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 상승시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.
- [0617] 156. 세포 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 HDL 치료제의 최고 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.
- [0618] 157. 실시양태 156에 있어서, (a) HDL 치료제를 하나 이상의 투약 빈도에 따라 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 50% 내지 100% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 투약 빈도를 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 HDL 치료제.
- [0619] 158. 세포 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 HDL 치료제의 가장 빈번한 투약 처방의 최고 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 투약 간격의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.
- [0620] 159. 실시양태 158에 있어서, (a) HDL 치료제를 하나 이상의 투약 빈도에 따라 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 50% 내지 100% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 투약 빈도를 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 HDL 치료제.
- [0621] 160. (a) HDL 치료제의 하나 이상의 용량을 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하고; (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하고; (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 용량을 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.
- [0622] 161. (a) HDL 치료제를 하나 이상의 투약 빈도에 따라 대상체 또는 대상체의 집단에게 투여하는 단계; (b) 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 세포에서의 콜레스테롤 유출을 측정하는 단계; (c) 상기 대상체에서 콜레스테롤 유출을 0% 초과, 10% 초과 또는 20% 초과만큼 감소시키지 않는 최대 투약 빈도를 확인함으로써, 요법에 적합한 HDL 치료제의 용량을 확인하는 단계
- [0623] 에 의해 HDL 치료제의 가장 빈번한 투약 처방의 최고 용량을 확인하는 것을 포함하는 요법에 적합한 HDL 치료제의 투약 간격의 확인 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.

- [0624] 162. 실시양태 161에 있어서, 하나 이상의 투약 빈도가 (a) 2일마다 1 내지 4시간 주입으로서의 투여; (b) 3일마다 1 내지 4시간 주입으로서의 투여; (c) 1주마다 24시간 주입으로서의 투여; 및 (d) 2주마다 24시간 주입으로서의 투여로부터 선택되는 하나 이상의 투약 빈도를 포함하는 것인 HDL 치료제.
- [0625] 163. 실시양태 156 내지 162 중 어느 한 실시양태에 있어서, 콜레스테롤 유출이 상기 대상체 또는 대상체의 집단으로부터의 단핵구, 대식세포 또는 단핵 세포에서 측정되는 것인 HDL 치료제.
- [0626] 164. 대상체에게 치료 유효량의 HDL 치료제를 투여하는 것을 포함하는 ABCA1 결핍을 갖는 대상체의 치료 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.
- [0627] 165. 실시양태 164에 있어서, HDL 치료제가 CER-001인 HDL 치료제.
- [0628] 166. 실시양태 164 또는 165에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성인 HDL 치료제.
- [0629] 167. 실시양태 164 또는 165에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 동형접합성인 HDL 치료제.
- [0630] 168. (a) 가족성 원발성 저알파지질단백혈증을 앓고 있는 대상체에게 HDL 치료제를 유도 처방에 따라 투여하고; 이어서 (b) 대상체에게 HDL 치료제를 유지 처방에 따라 투여하는 것을 포함하는 가족성 원발성 저알파지질단백혈증을 앓고 있는 대상체의 치료 방법에 사용하기 위한 HDL 치료제.
- [0631] 169. 실시양태 168에 있어서, 유지 처방이 HDL 치료제를 보다 낮은 용량, 보다 낮은 빈도, 또는 둘 다로 투여하는 것을 수반하는 것인 HDL 치료제.
- [0632] 170. 실시양태 168 또는 실시양태 169에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 이형접합성인 HDL 치료제.
- [0633] 171. 실시양태 168 또는 실시양태 169에 있어서, 대상체가 ABCA1 돌연변이에 대해 동형접합성인 HDL 치료제.
- [0634] 172. 실시양태 168 내지 171 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 LCAT 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성인 HDL 치료제.
- [0635] 173. 실시양태 168 내지 172 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 ApoA-I 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성인 HDL 치료제.
- [0636] 174. 실시양태 168 내지 173 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 ABCG1 돌연변이에 대해 동형접합성 또는 이형접합성인 HDL 치료제.
- [0637] 175. 실시양태 168 내지 174 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 또한 지질 제어 의약으로 치료되는 것인 HDL 치료제.
- [0638] 176. 실시양태 175에 있어서, 지질 제어 의약이 아토르바스타틴, 에제티미브, 니아신, 로수바스타틴, 심바스타틴, 아스피린, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴 또는 그의 조합인 HDL 치료제.
- [0639] 177. 실시양태 168 내지 176 중 어느 한 실시양태에 있어서, HDL 치료제가 CER-001인 HDL 치료제.
- [0640] 178. 실시양태 177에 있어서, 유도 처방이 4주의 기간의 것인 HDL 치료제.
- [0641] 179. 실시양태 177 또는 실시양태 178에 있어서, 유도 처방이 CER-001을 1주 3회 투여하는 것을 포함하는 것인 HDL 치료제.
- [0642] 180. 실시양태 177 내지 179 중 어느 한 실시양태에 있어서, 유도 처방에서 투여되는 용량이 8 내지 15 mg/kg (단백질 중량 기준으로)인 HDL 치료제.
- [0643] 181. 실시양태 180에 있어서, 유도 처방에서 투여되는 용량이 8 mg/kg, 12 mg/kg 또는 15 mg/kg인 HDL 치료제.
- [0644] 182. 실시양태 177 내지 181 중 어느 한 실시양태에 있어서, 유지 처방이 CER-001을 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 1년, 적어도 18개월, 적어도 2년 동안, 또는 무기한으로 투여하는 것을 포함하는 것인 HDL 치료제.
- [0645] 183. 실시양태 177 내지 182 중 어느 한 실시양태에 있어서, 유지 처방이 CER-001을 1주 2회 투여하는 것을 포함하는 것인 HDL 치료제.
- [0646] 184. 실시양태 177 내지 183 중 어느 한 실시양태에 있어서, 유지 처방에서 투여되는 용량이 1 내지 6 mg/kg (단백질 중량 기준으로)인 HDL 치료제.

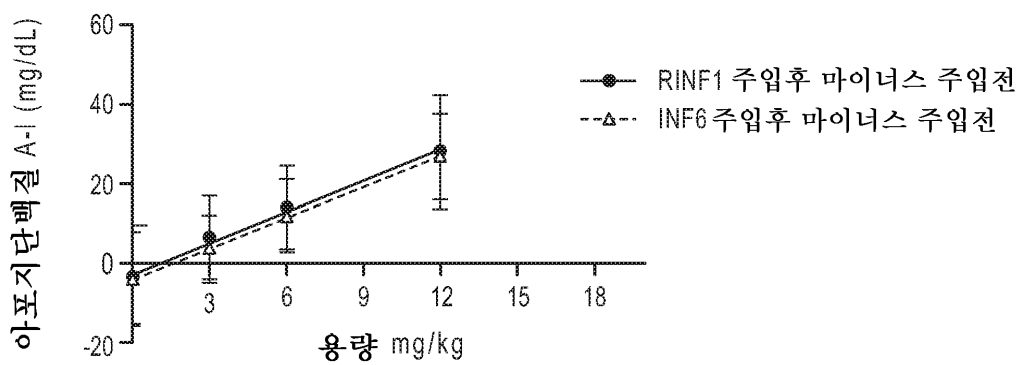
- [0647] 185. 실시양태 184에 있어서, 유지 처방에서 투여되는 용량이 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 6 mg/kg인 HDL 치료제.
- [0648] 186. 실시양태 168 내지 185 중 어느 한 실시양태에 있어서, (a) 유도 처방이 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 및/또는 집단 평균에 비해 20% 내지 80% 또는 40% 내지 60%만큼 감소시키는 용량을 이용하고/거나; (b) 유지 처방이 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 대상체의 기준선량 및/또는 집단 평균에 비해 20% 초과 또는 10% 초과만큼 감소시키지 않는 용량을 이용하는 것인 HDL 치료제.
- [0649] 187. 실시양태 186에 있어서, 유지 처방이 하나 이상의 HDL 마커의 발현 수준을 감소시키지 않는 용량을 이용하는 것인 HDL 치료제.
- [0650] 다양한 구체적인 실시양태를 예시 및 기재하였지만, 본 개시내용(들)의 정신 및 범위로부터 벗어나지 않고 다양한 변화가 이루어질 수 있음이 이해될 것이다.
- [0651] **12. 참조로 포함**
- [0652] 이 출원에 인용된 모든 공보, 특허, 특허 출원 및 다른 문헌은 각각의 개별적 공보, 특허, 특허 출원 또는 다른 문헌이 개별적으로 모든 목적을 위해 참조로 포함되는 것으로 지시된 것처럼 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0653] 이 명세서에 포함된 문헌, 작용, 물질, 장치, 물품 등의 임의의 논의는 단지 본 개시내용에 대한 맥락을 제공하는 목적을 위한 것이다. 임의의 또는 모든 이들 사항은, 그것이 이 출원의 우선일 전에 어디든지 존재하였기 때문에, 종래 기술 기초의 일부를 형성하거나 본 개시내용에 관련된 분야의 통상적인 일반적 지식이었음을 인정하는 것으로 간주되지 않아야 한다.

도면

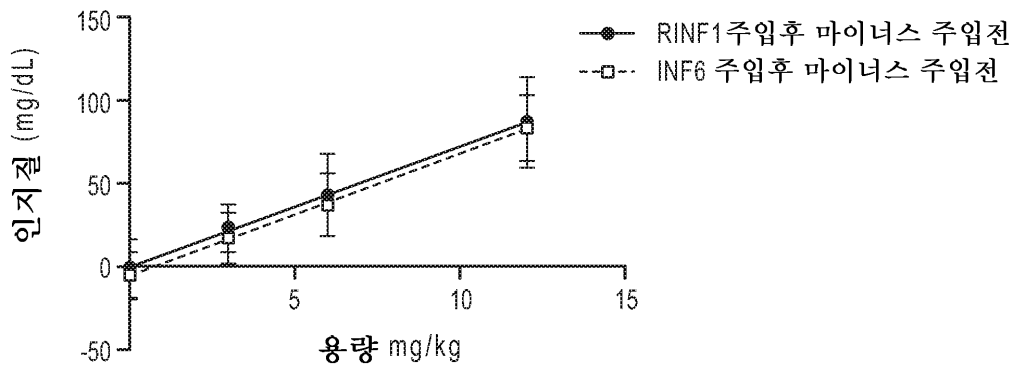
도면1



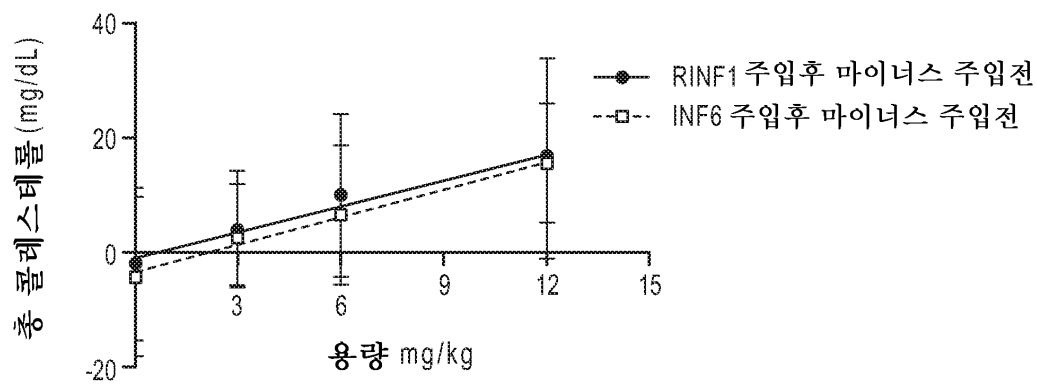
도면2a



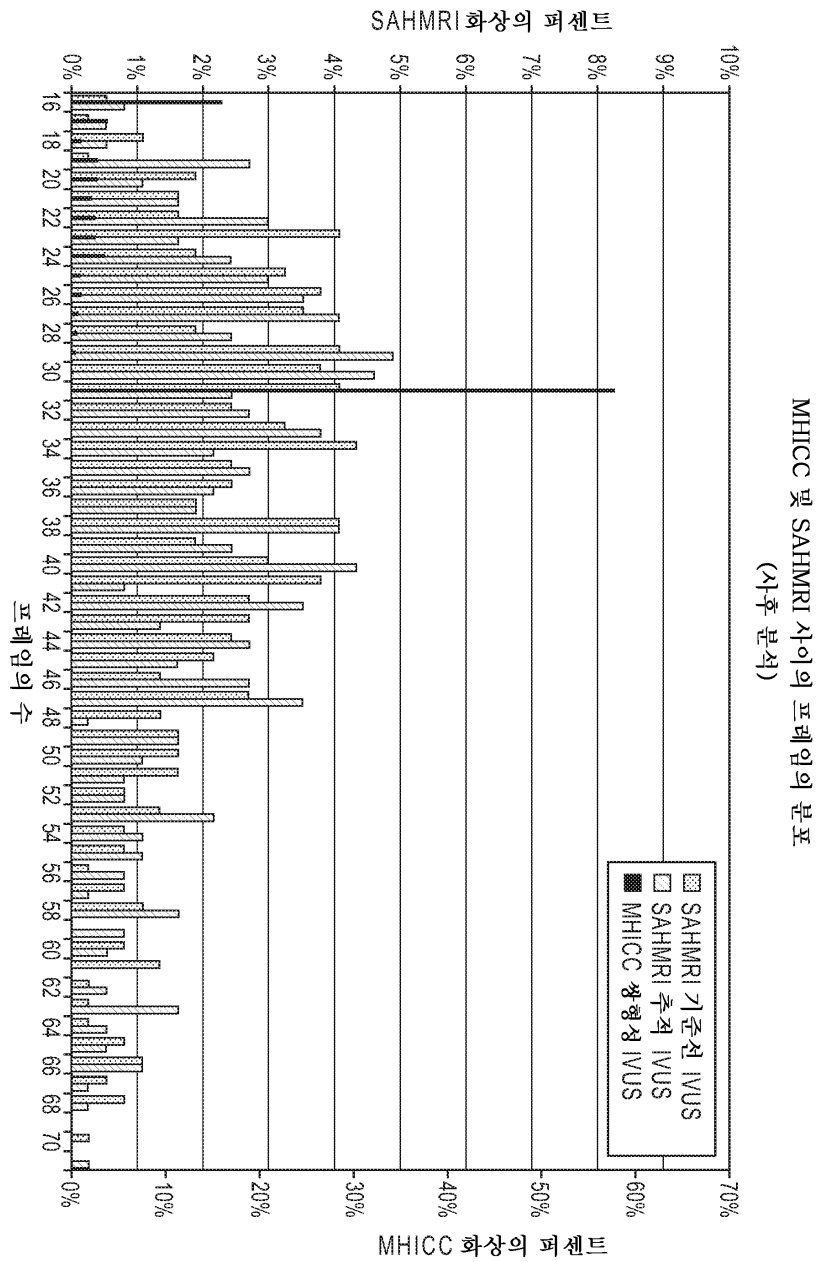
도면2b



도면2c



도면3



도면4

TAV 및 PAV mITT 집단에서의 LS 평균 변화

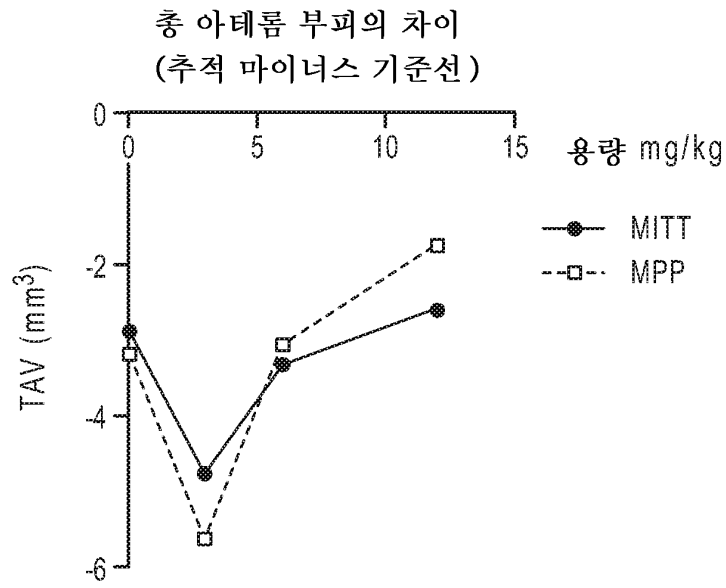
| 파라미터 | 위약 N=93 | 3 mg/kg N=88 | 6 mg/kg N=100 | 12 mg/kg N=88 |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 기준선 TAV (mm ³) (중앙값) | 143.8 (102, 185) | 122.7 (96, 161) | 137.1 (107, 178) | 146.0 (97, 176) |
| 변화 TAV (mm ³) | -2.85 | -4.76 | -3.33 | -2.61 |
| 기준선과 비교한 p-값 | 0.02 | <0.001 | 0.005 | 0.04 |
| 위약과 비교한 p-값 (RNK) | | 0.09 | 0.40 | 0.99 |
| 파라미터 | 위약 N=93 | 3 mg/kg N=88 | 6 mg/kg N=100 | 12 mg/kg N=88 |
| 기준선 PAV (%) (중앙값) | 36.1 (29.8, 42.1) | 33.5 (28.7, 39.6) | 37.6 (30.5, 42.1) | 36.2 (29.7, 42.9) |
| 변화 PAV | -0.17 | -0.56 | -0.41 | +0.22 |
| 기준선과 비교한 p-값 | 0.51 | 0.03 | 0.09 | 0.39 |
| 위약과 비교한 p-값 (RNK) | | 0.12 | 0.31 | 0.52 |

TAV 및 PAV mPP 집단에서의 LS 평균 변화

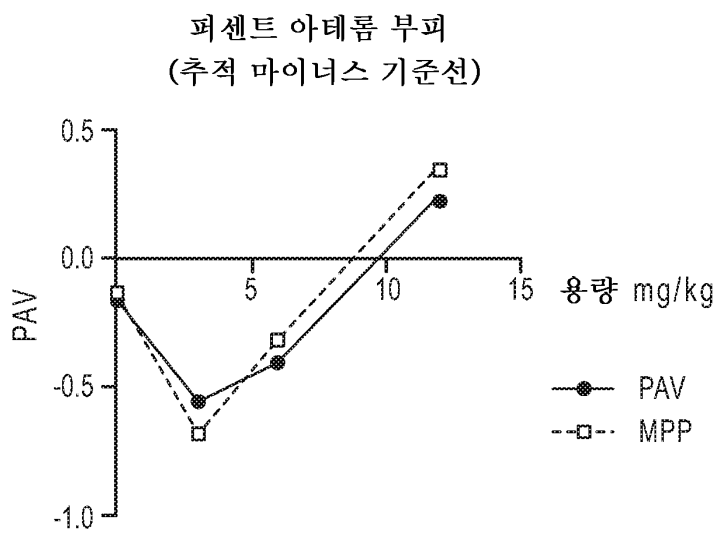
| 파라미터 | 위약 N=75 | 3 mg/kg N=73 | 6 mg/kg N=77 | 12 mg/kg N=70 |
|-------------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 기준선 TAV (mm ³) (중앙값) | 151.9 (106.9, 189.8) | 122.4 (96.7, 160.3) | 136.7 (105.7, 170.2) | 146.0 (99.3, 167.4) |
| 변화 TAV (mm ³) | -3.21 | -5.64 | -3.03 | -1.75 |
| 기준선과 비교한 p-값 | 0.02 | <0.001 | 0.02 | 0.20 |
| 위약과 비교한 p-값 (RNK) | | 0.04 | 0.45 | 0.70 |
| 파라미터 | 위약 N=75 | 3 mg/kg N=73 | 6 mg/kg N=77 | 12 mg/kg N=70 |
| 기준선 PAV (%) (중앙값) | 37.2 (30.4, 42.4) | 34.2 (28.9, 39.6) | 37.6 (30.1, 43) | 36.8 (29.4, 42.9) |
| 변화 PAV | -0.13 | -0.69 | -0.32 | +0.34 |
| 기준선과 비교한 p-값 | 0.65 | 0.02 | 0.24 | 0.25 |
| 위약과 비교한 p-값 (RNK) | | 0.05 | 0.27 | 0.47 |

도면5

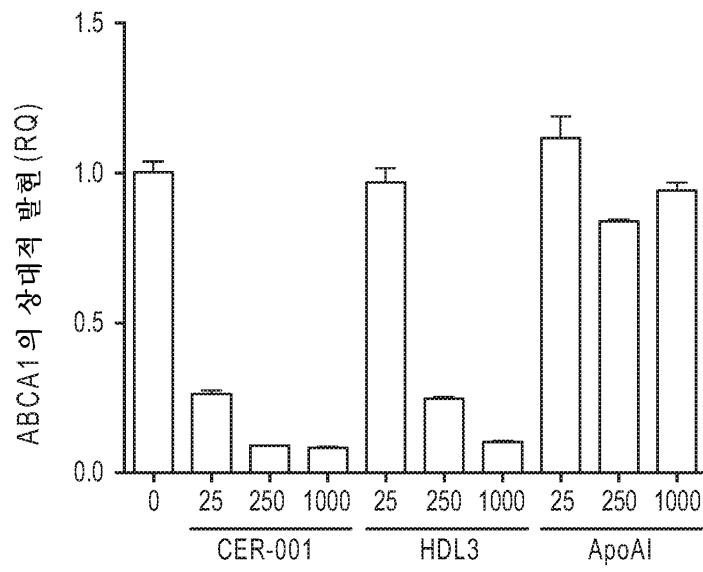
도면6a



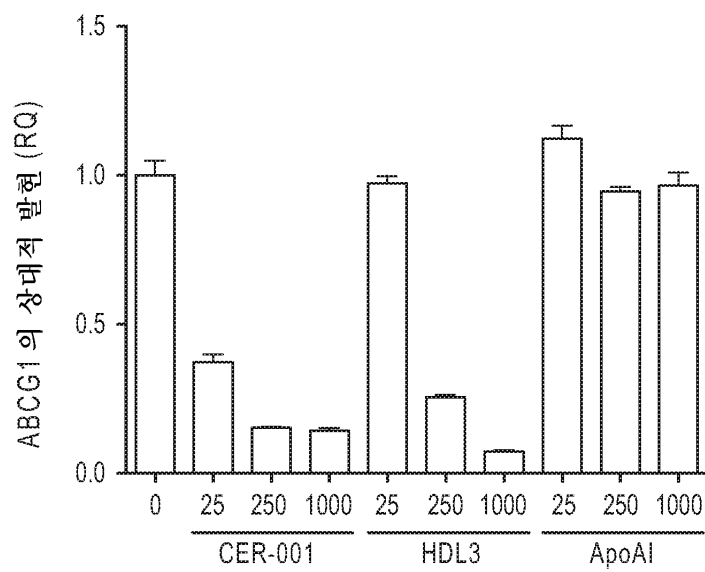
도면6b



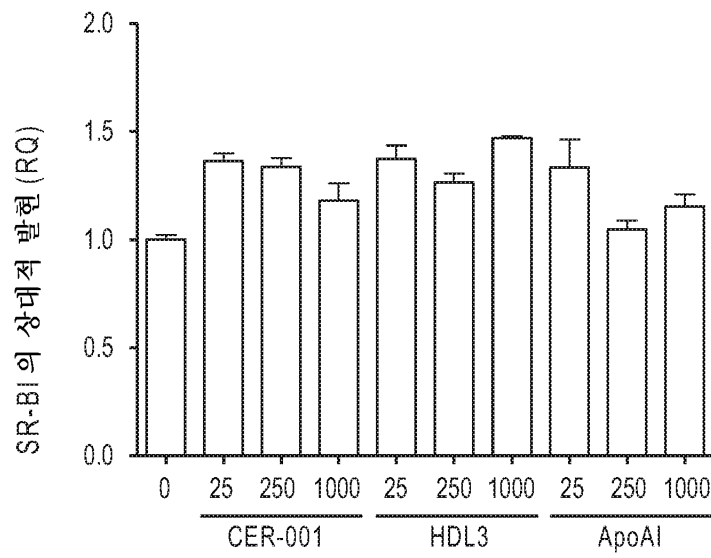
도면7



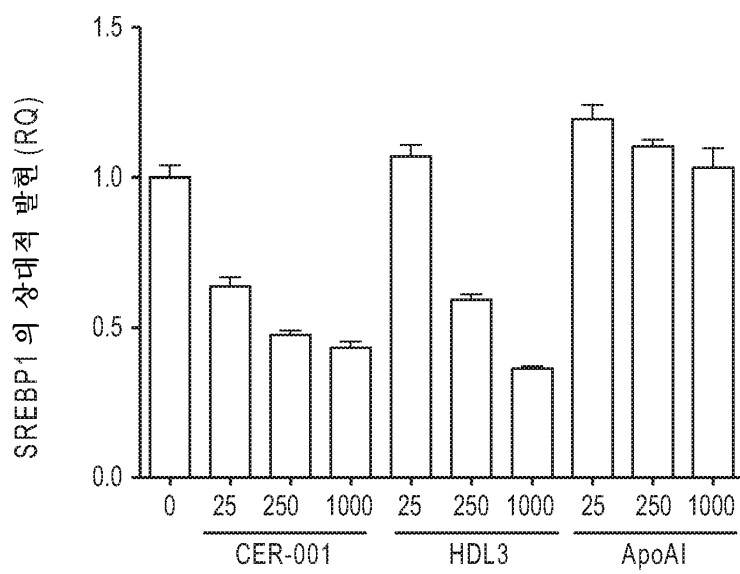
도면8



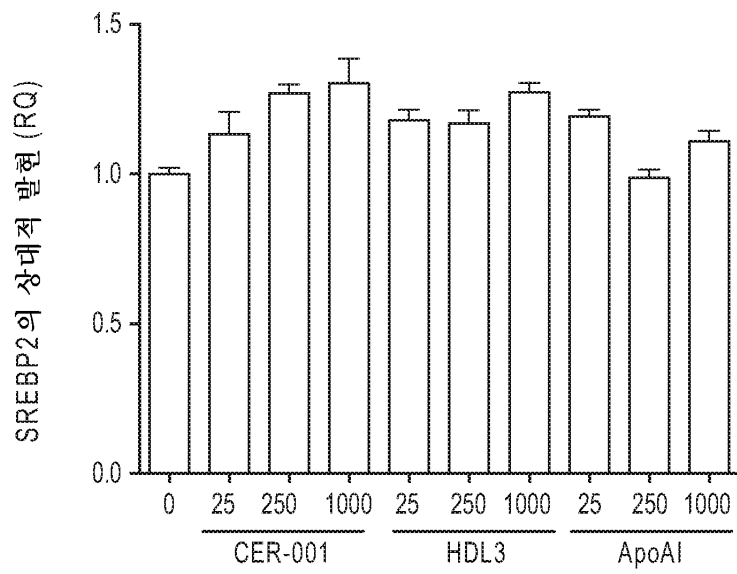
도면9



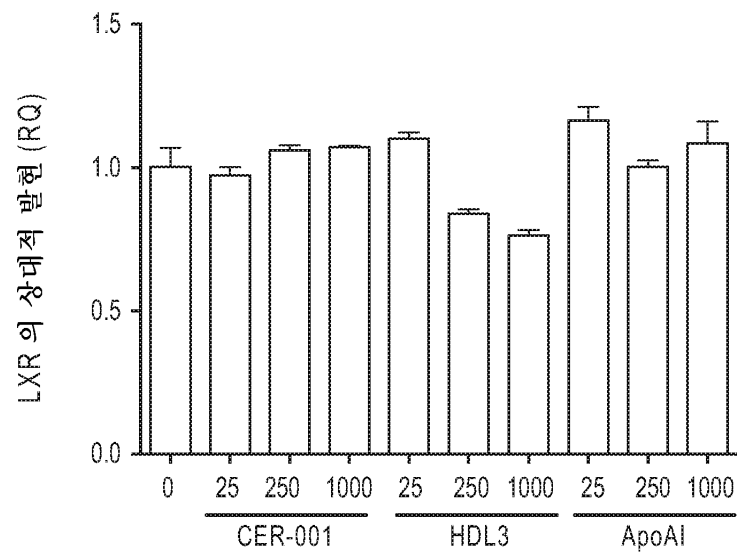
도면10



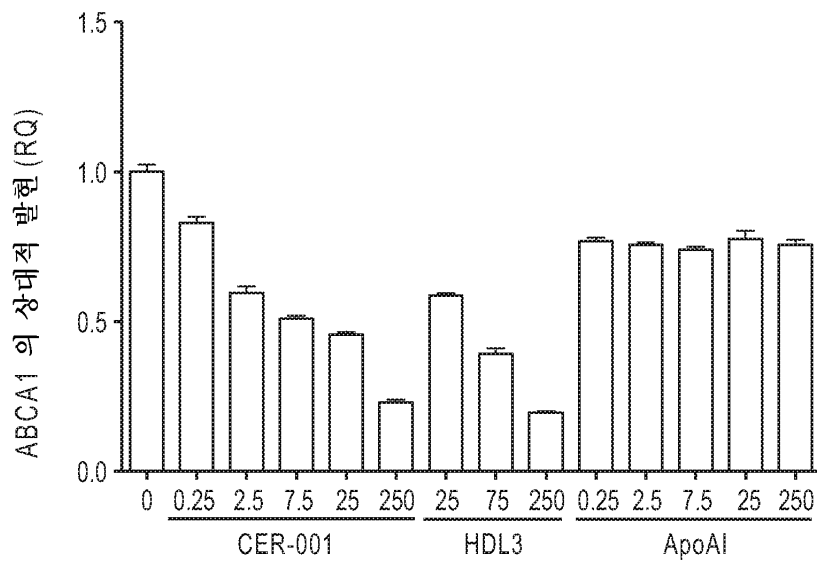
도면11



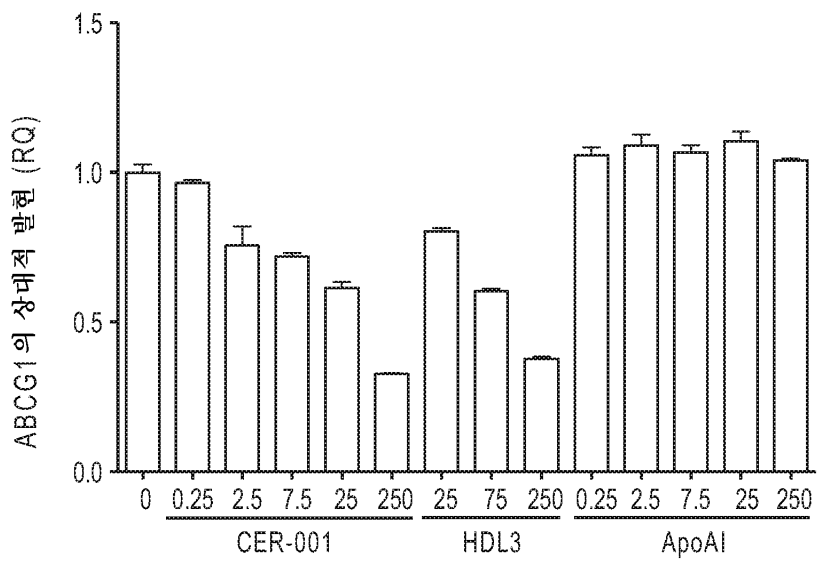
도면12



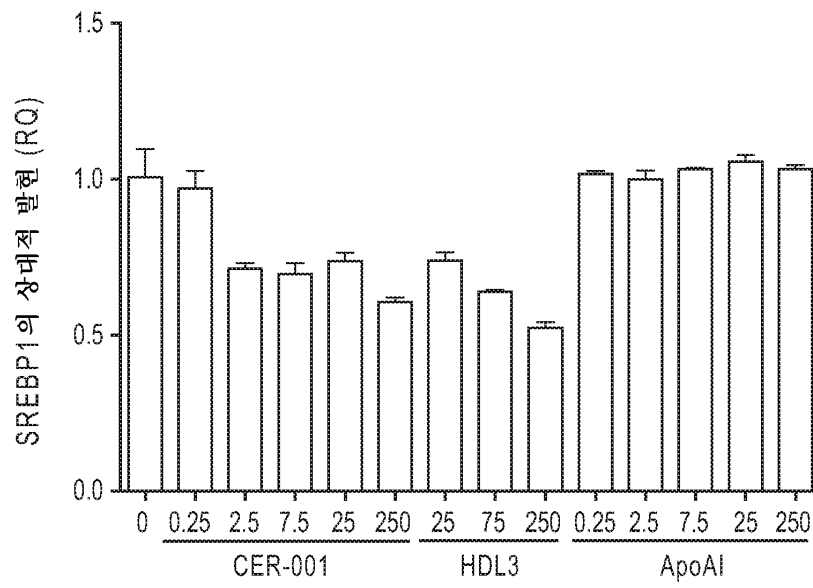
도면13



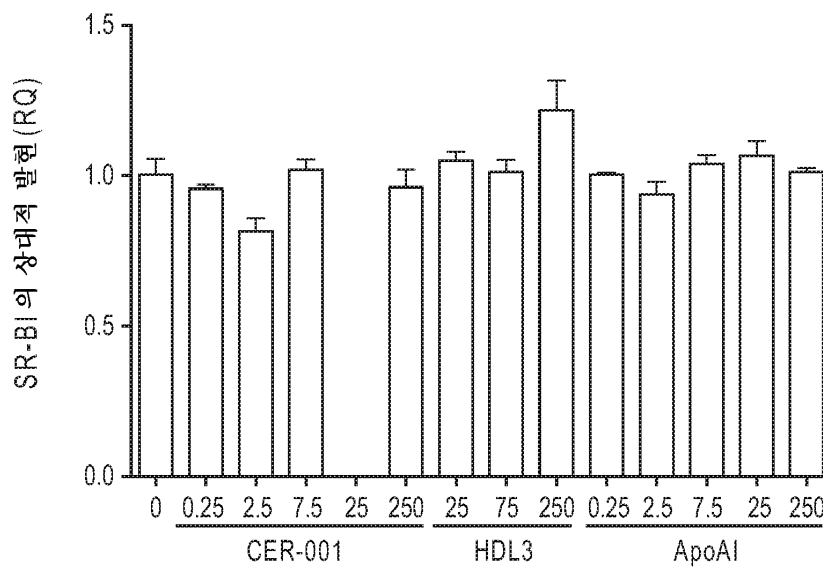
도면14



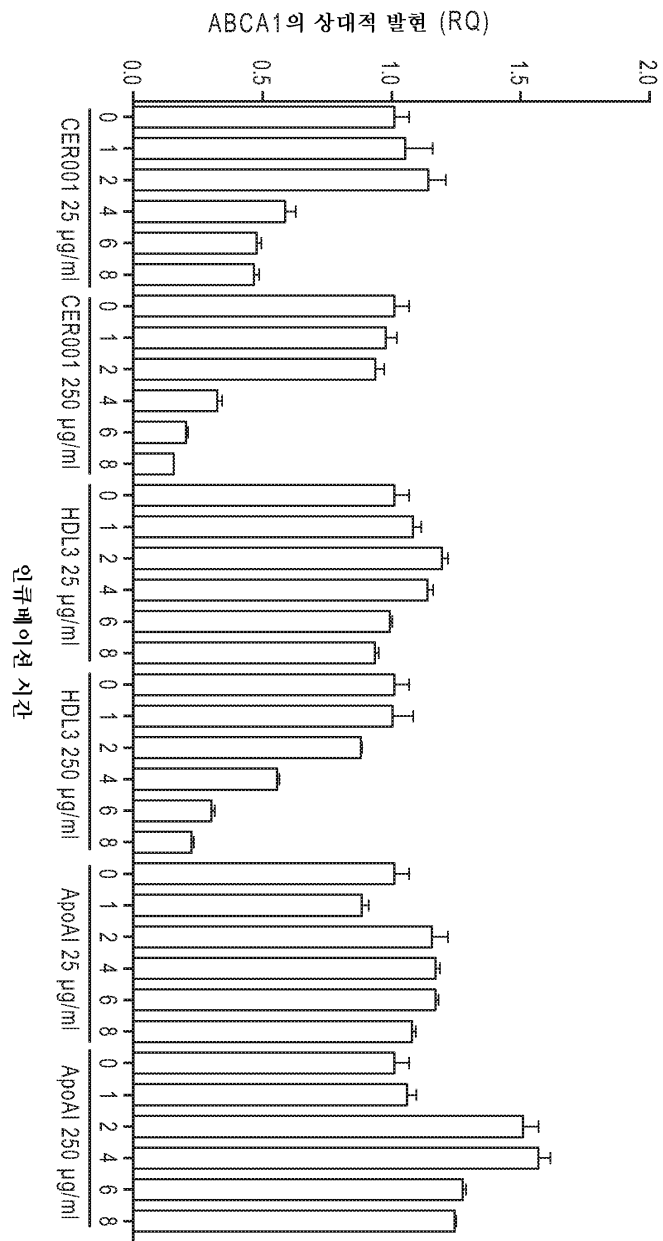
도면15



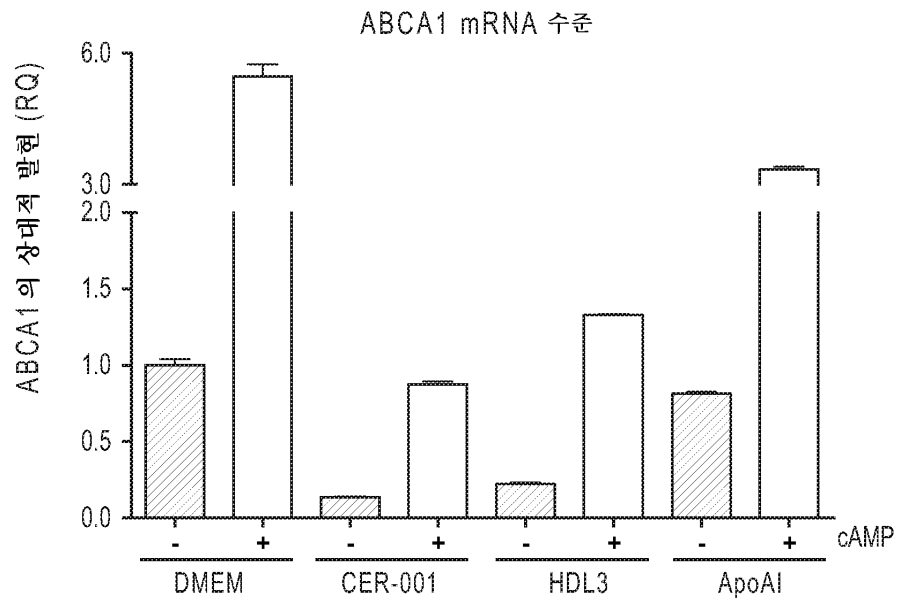
도면16



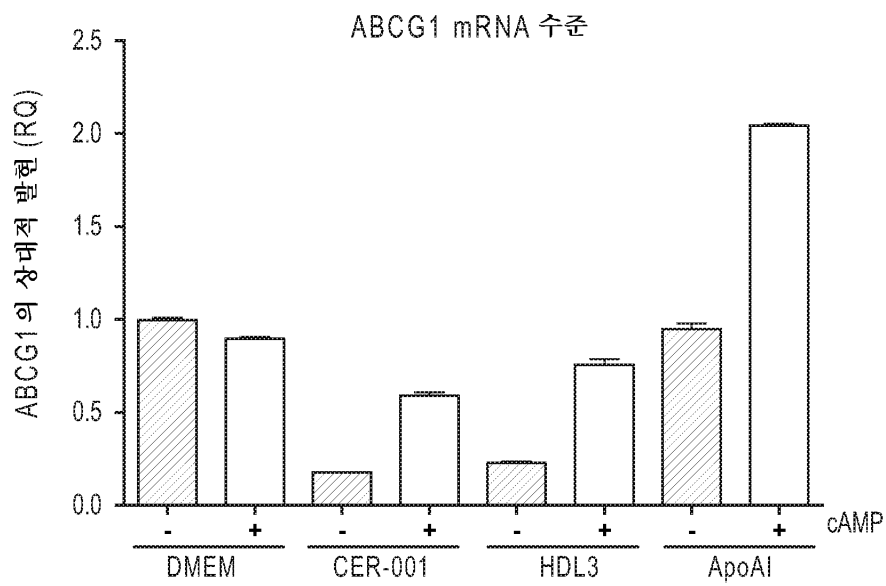
도면17



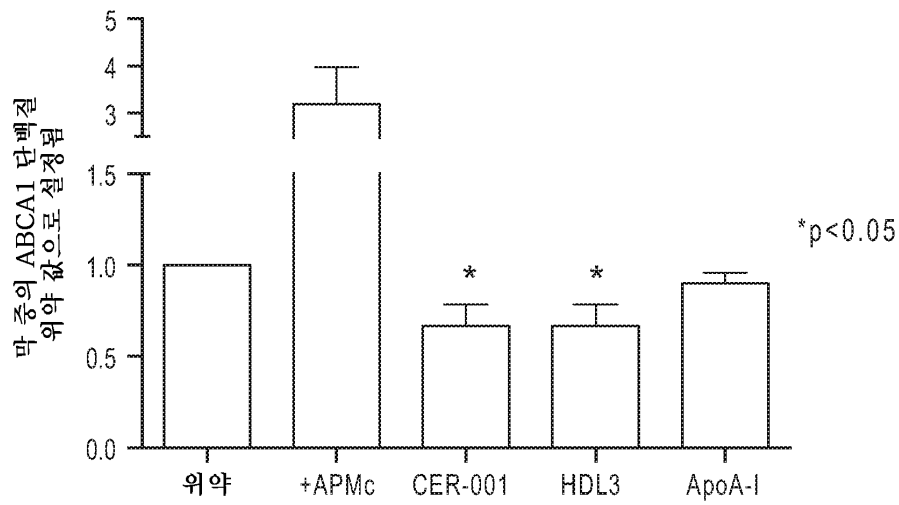
도면18



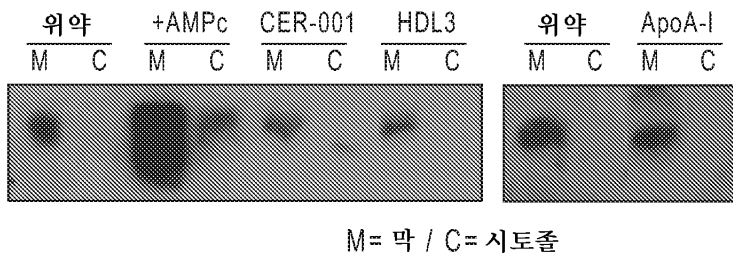
도면19



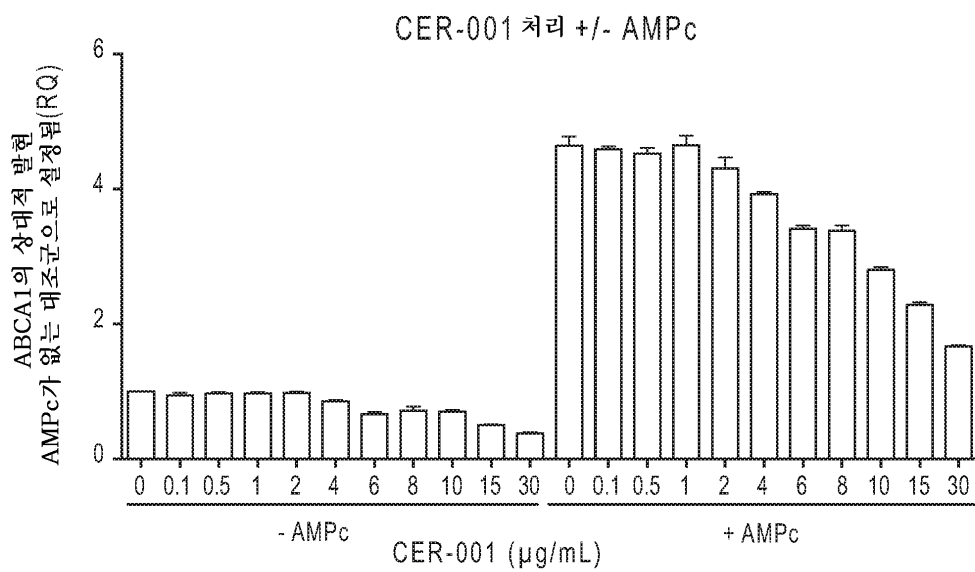
도면20



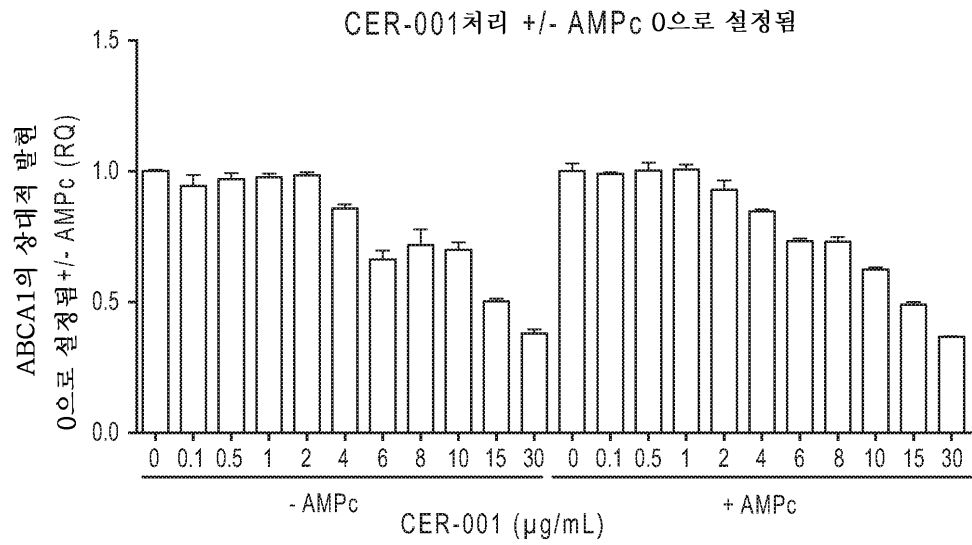
도면21



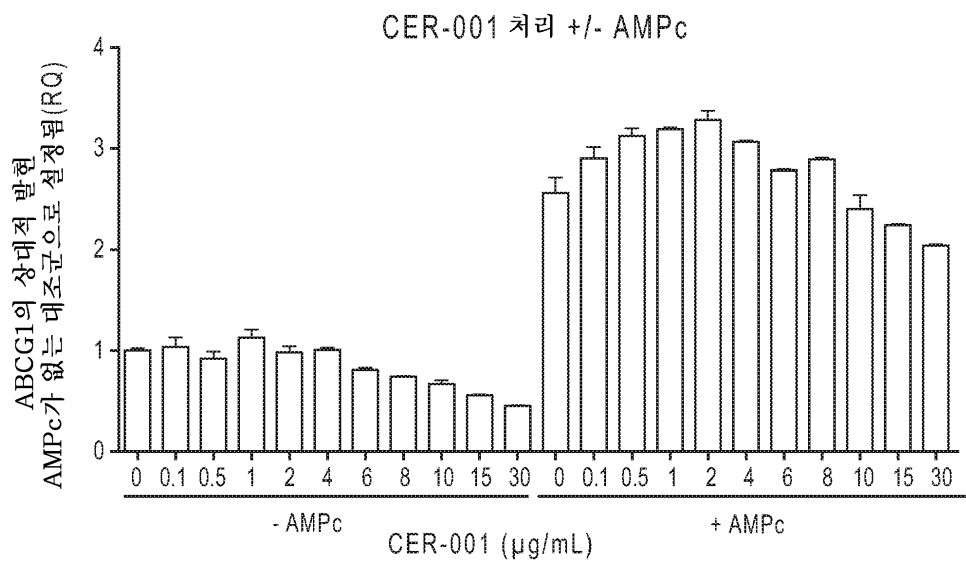
도면22



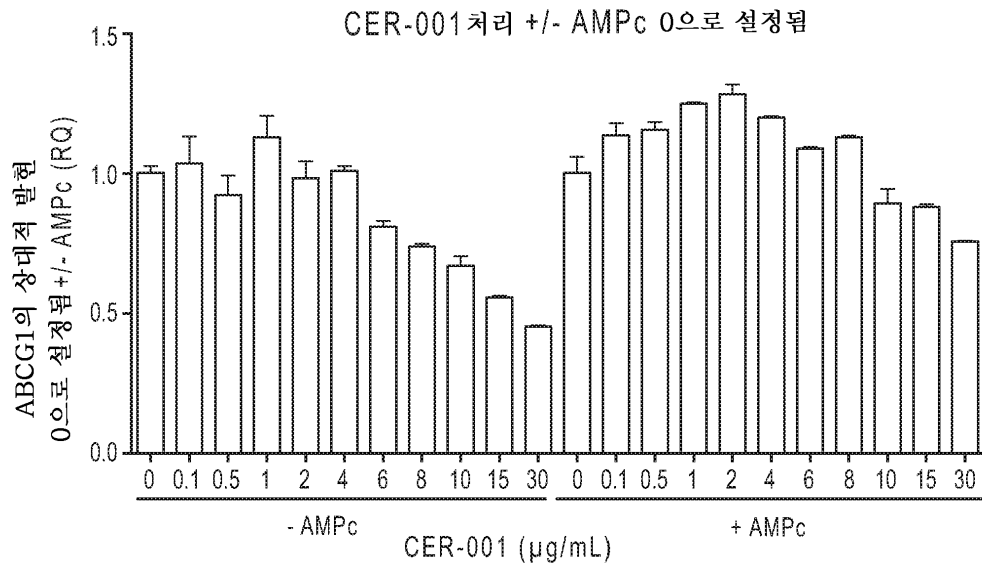
도면23



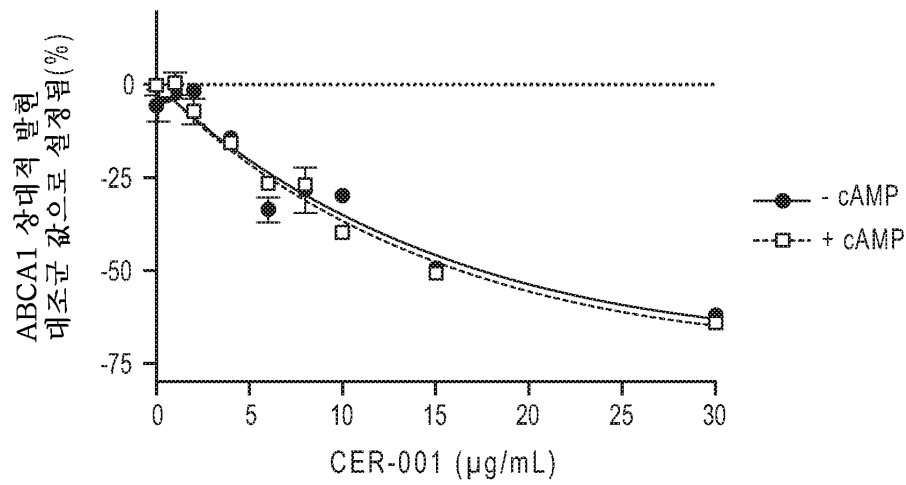
도면24



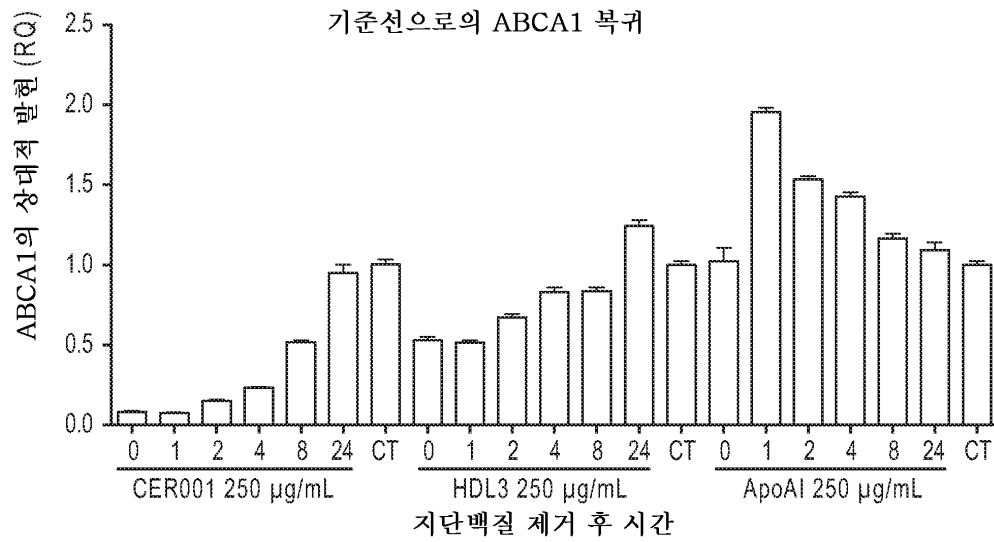
도면25



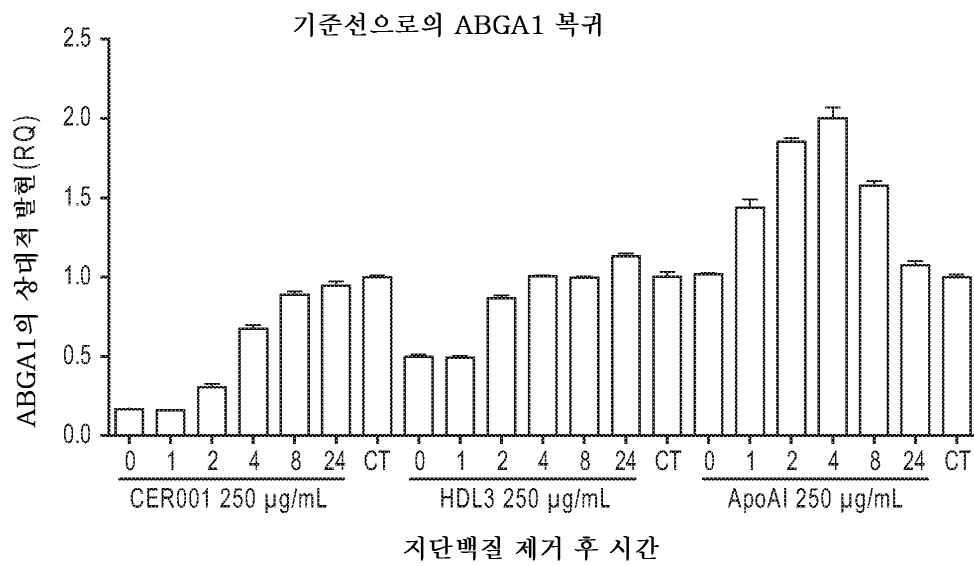
도면26



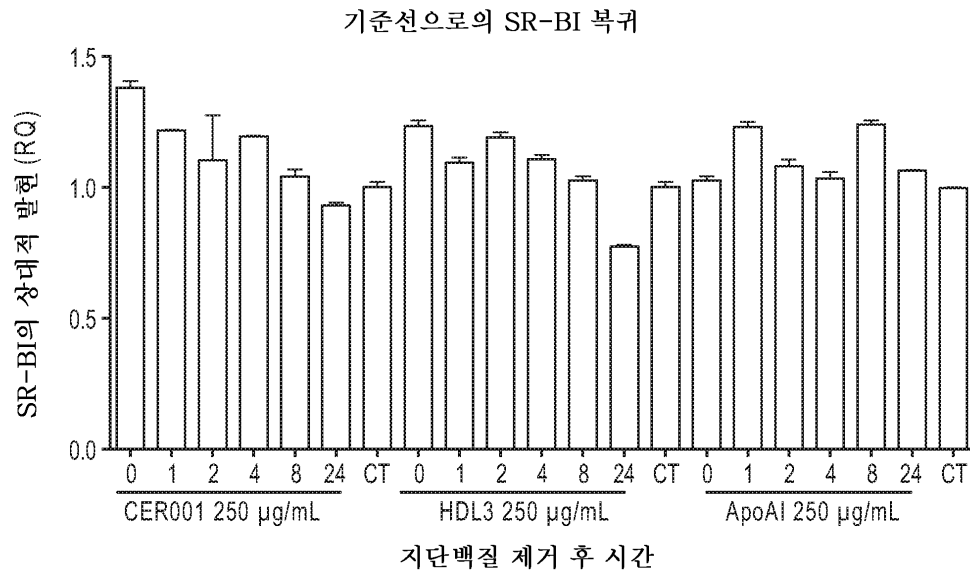
도면27



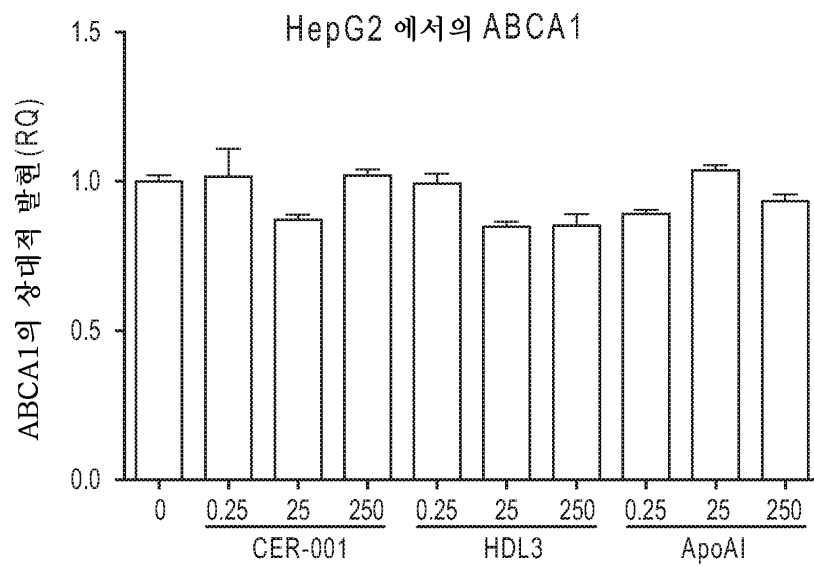
도면28



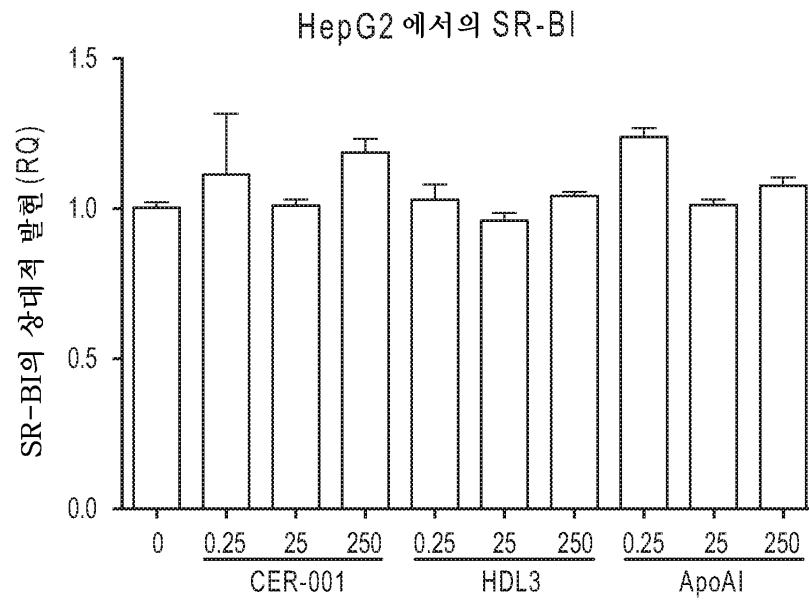
도면29



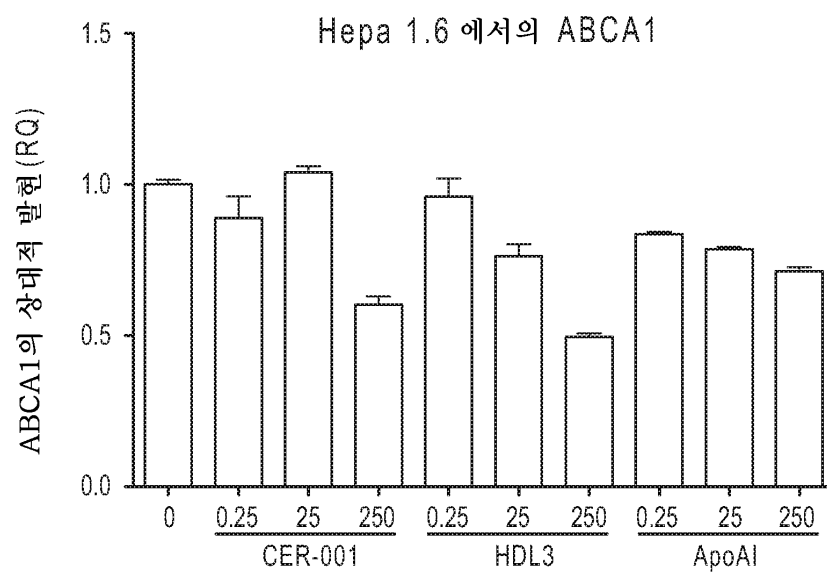
도면30



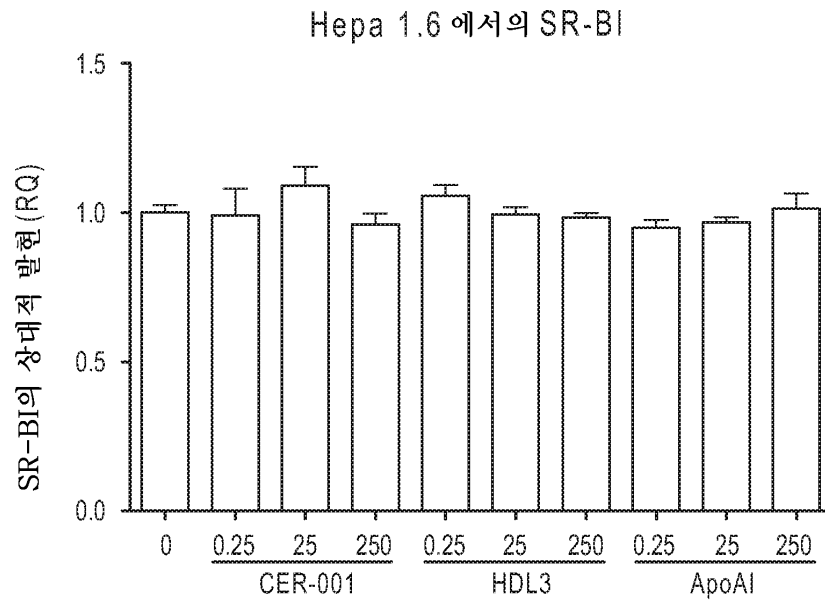
도면31



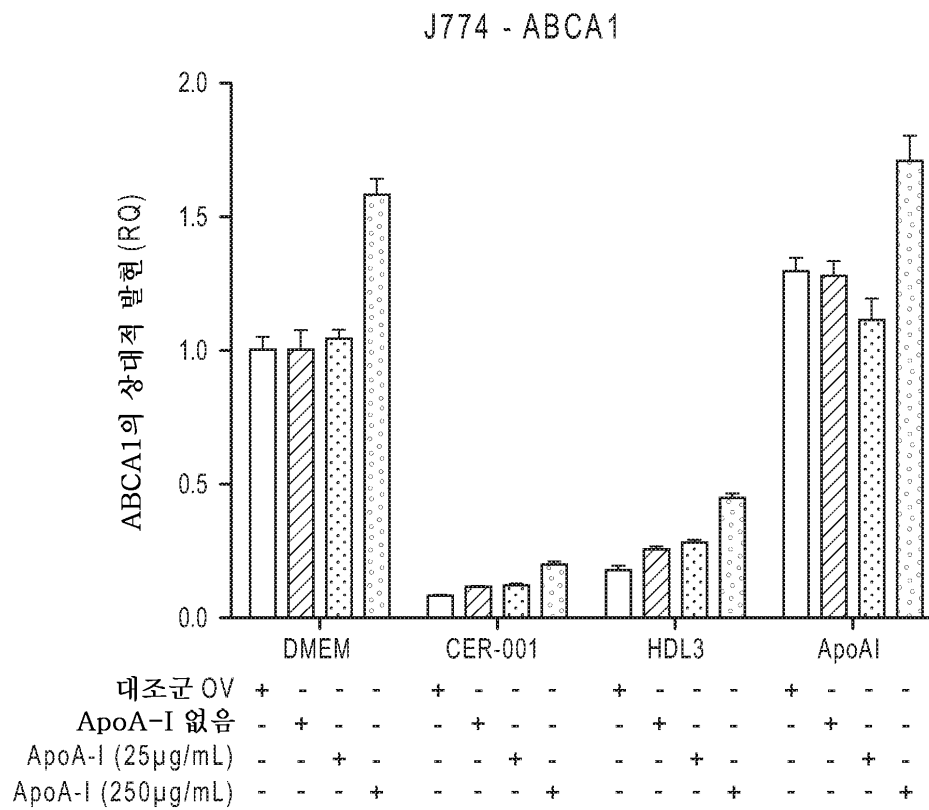
도면32



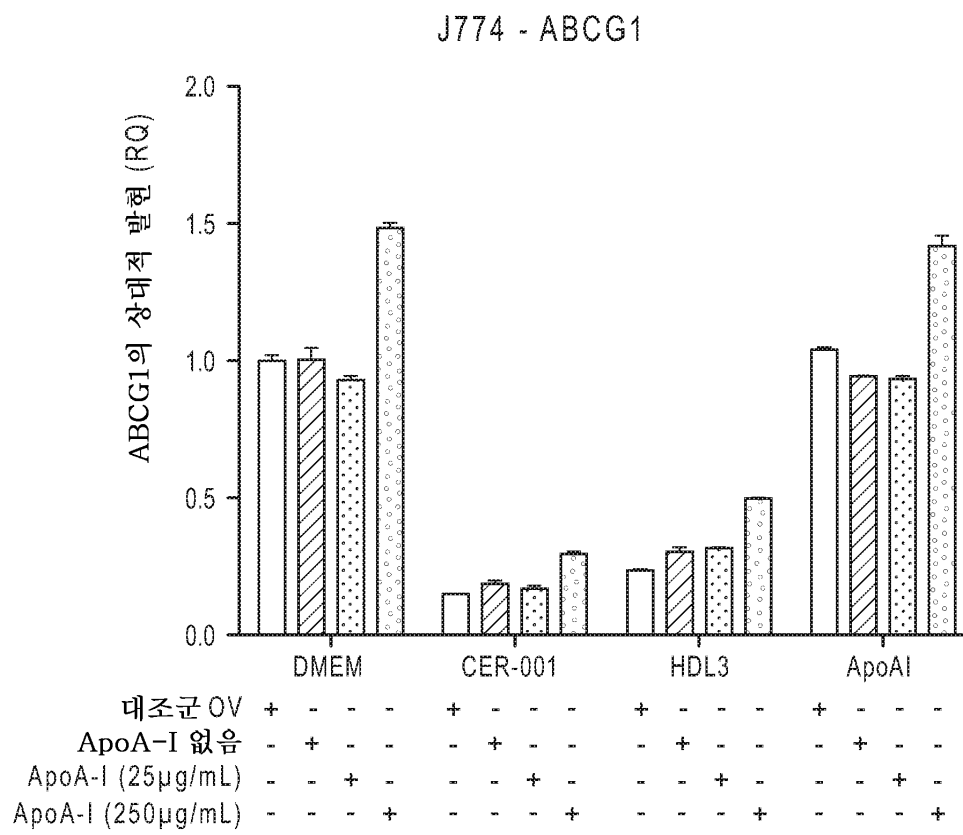
도면33



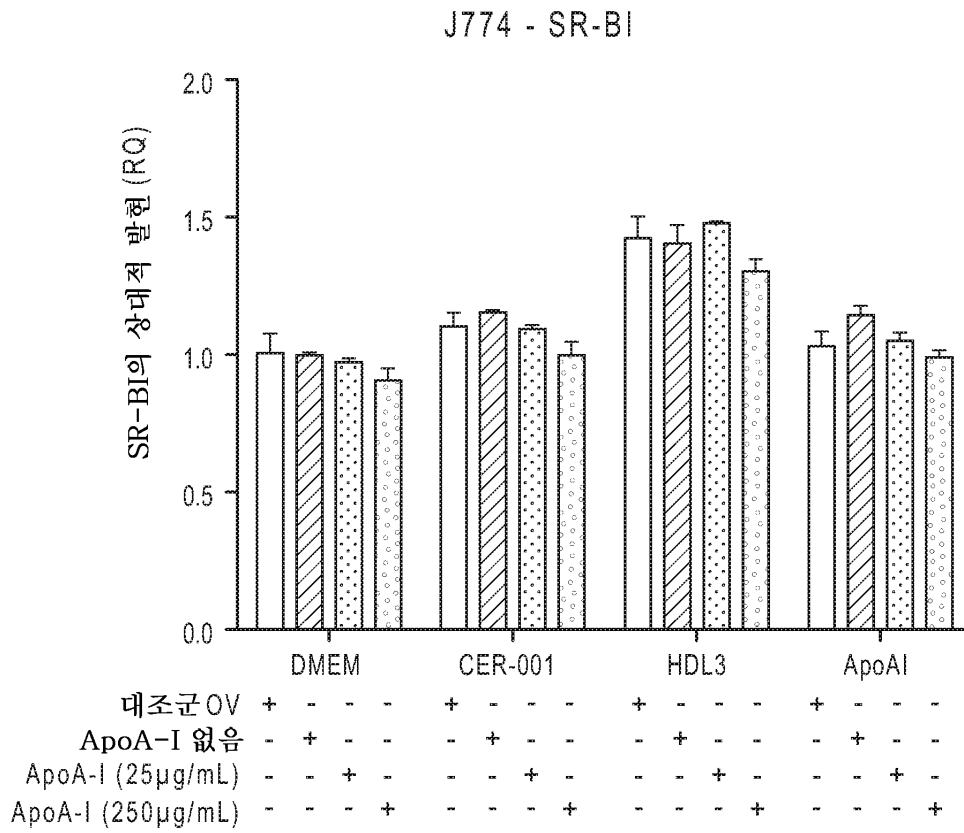
도면34



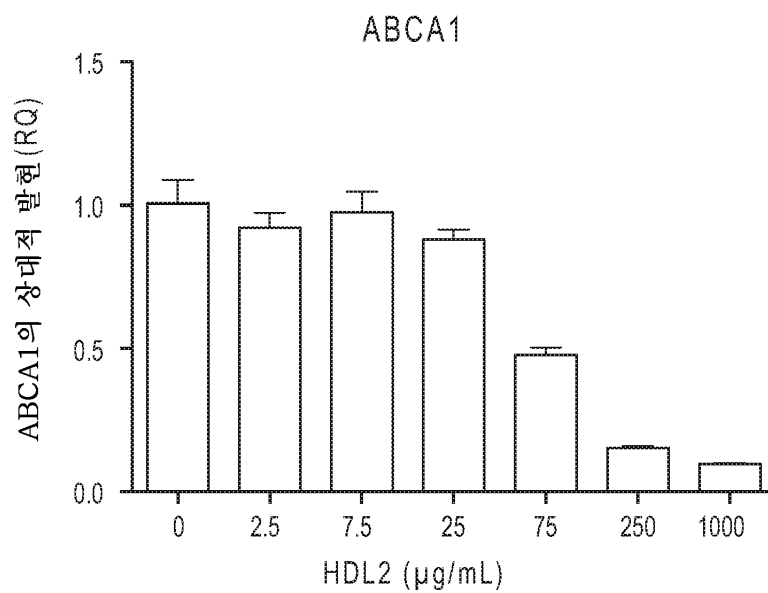
도면35



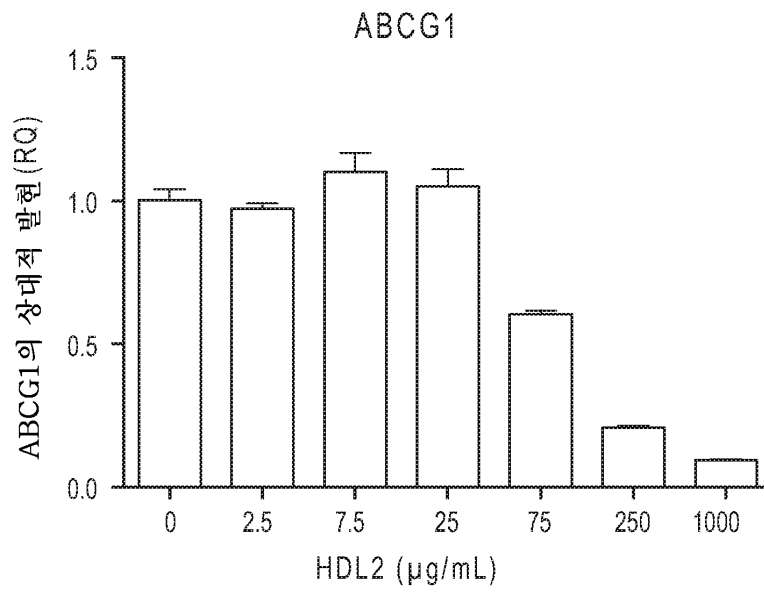
도면36



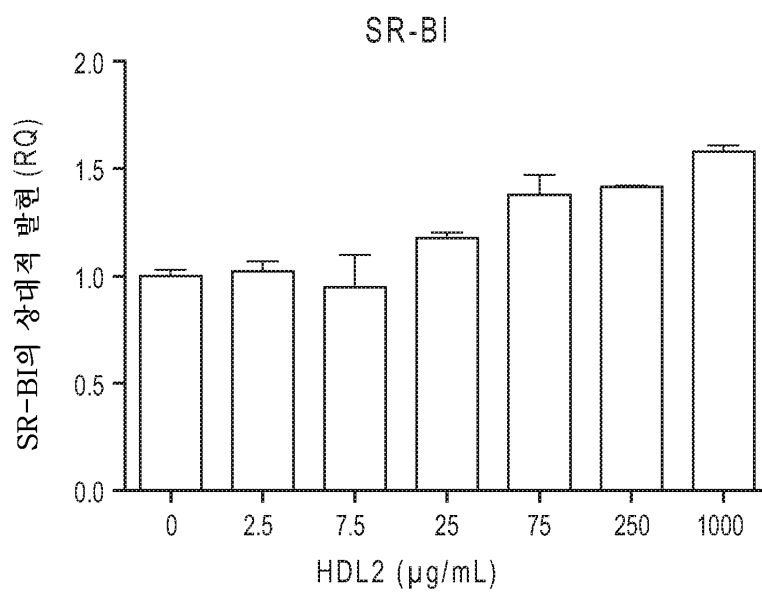
도면37



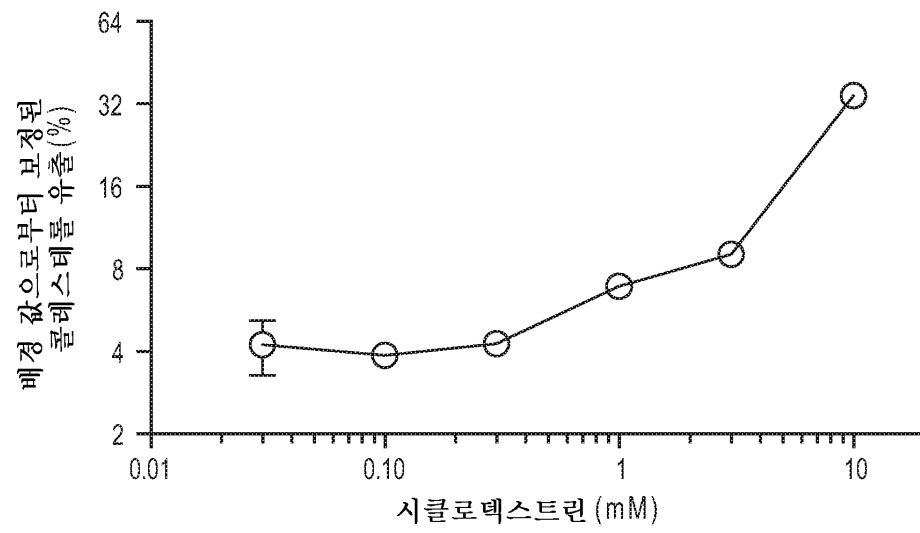
도면38



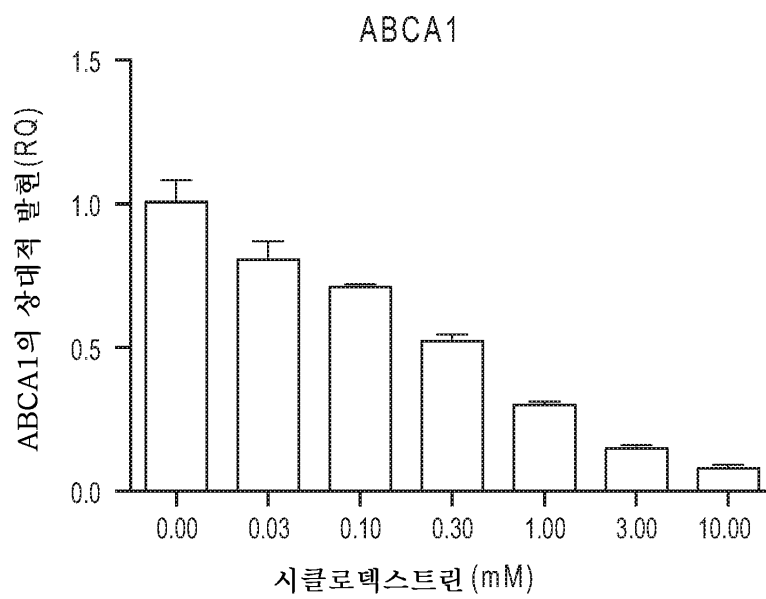
도면39



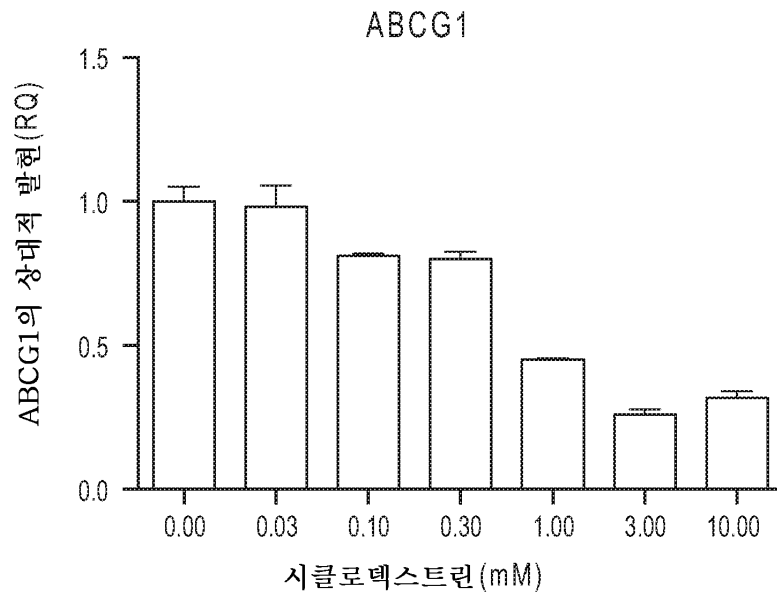
도면40



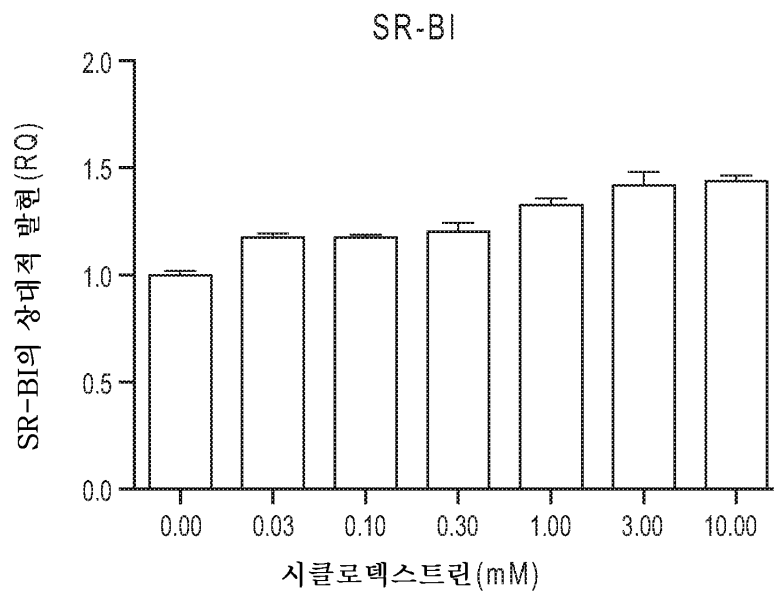
도면41



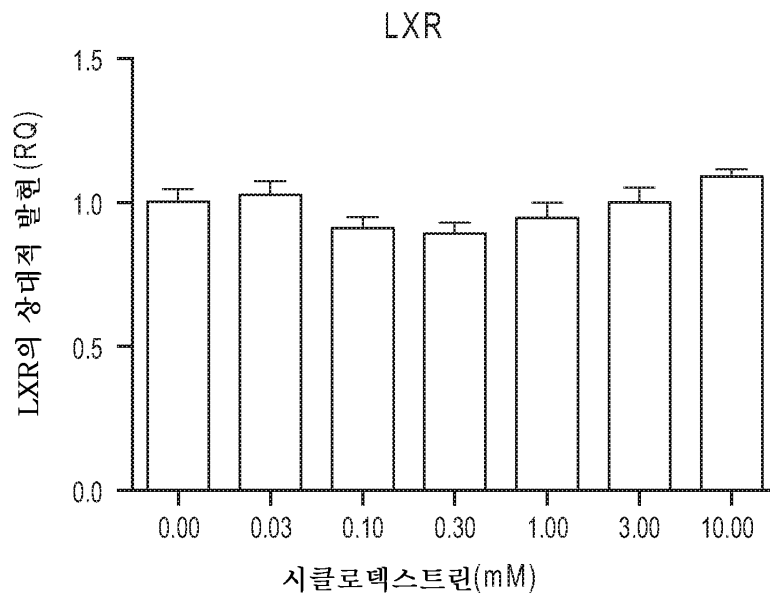
도면42



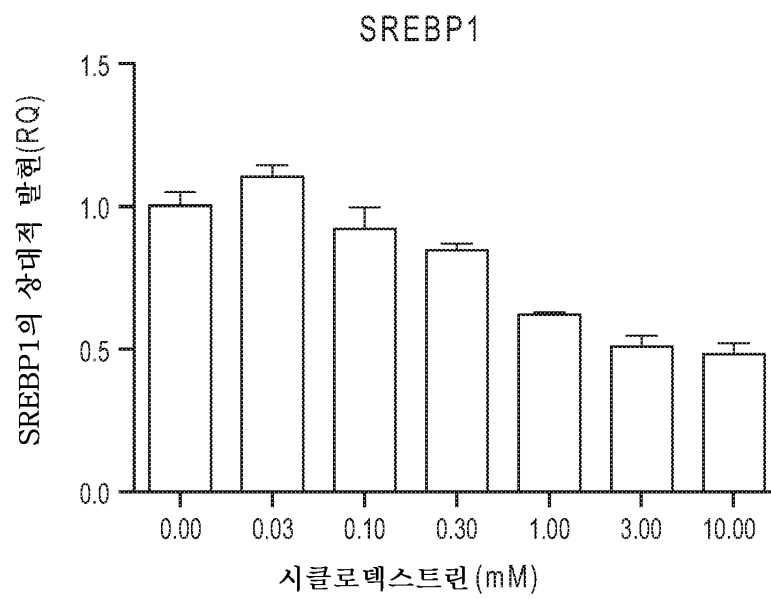
도면43



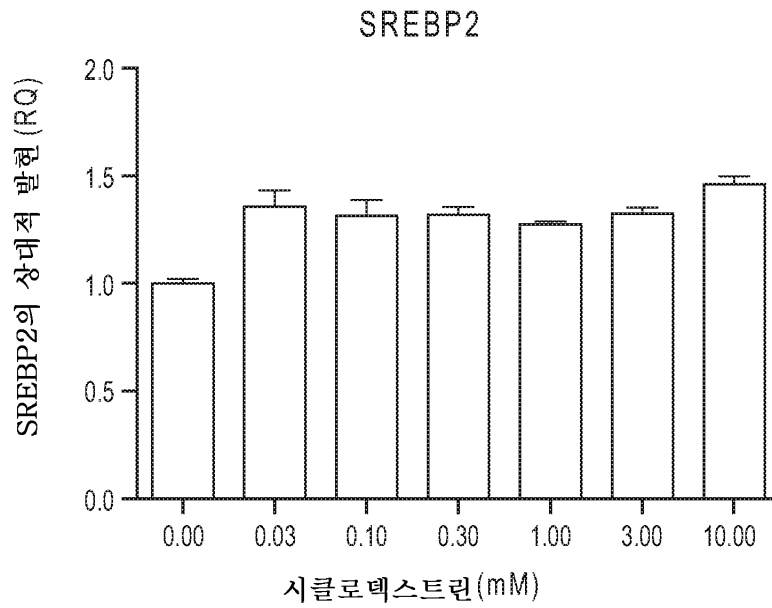
도면44



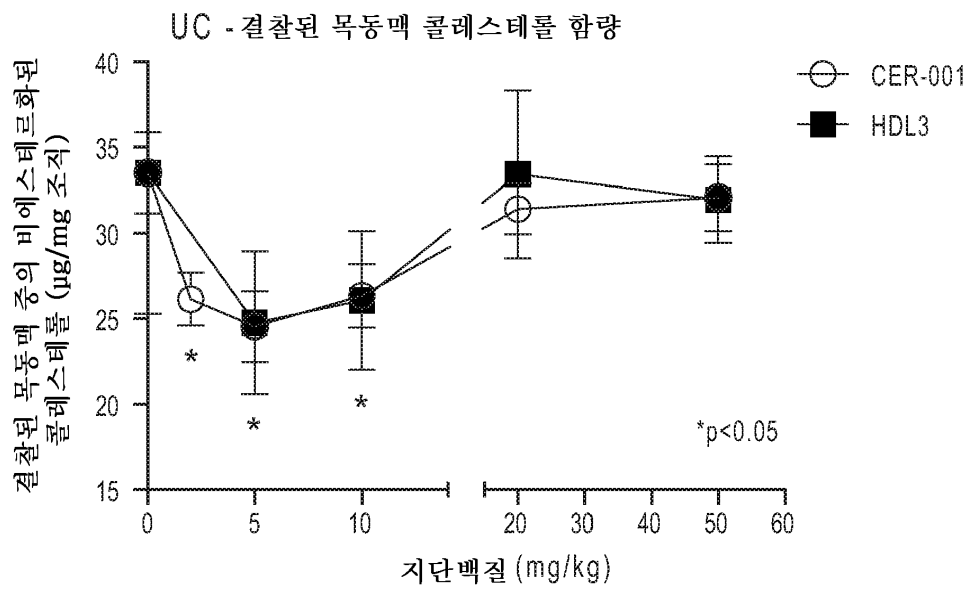
도면45



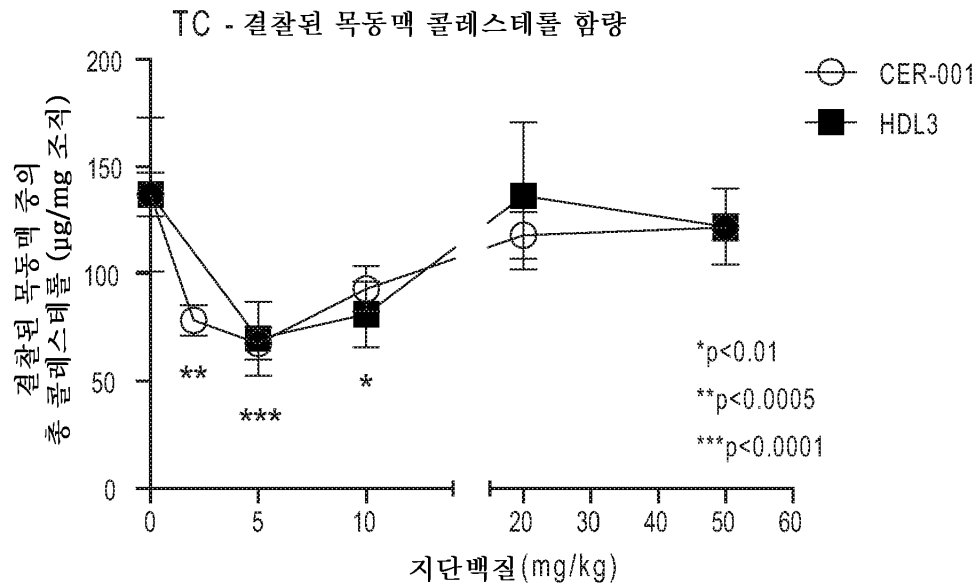
도면46



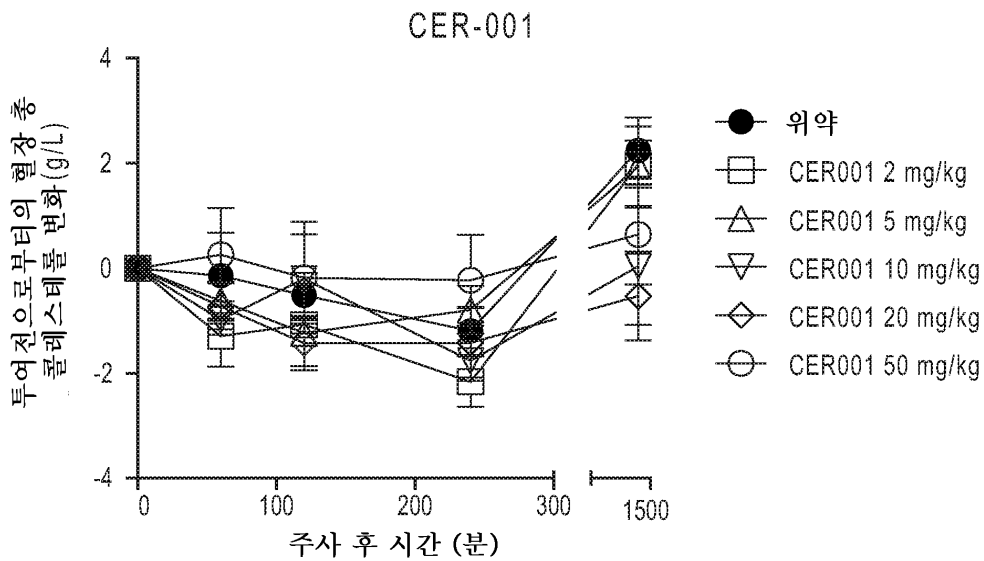
도면47



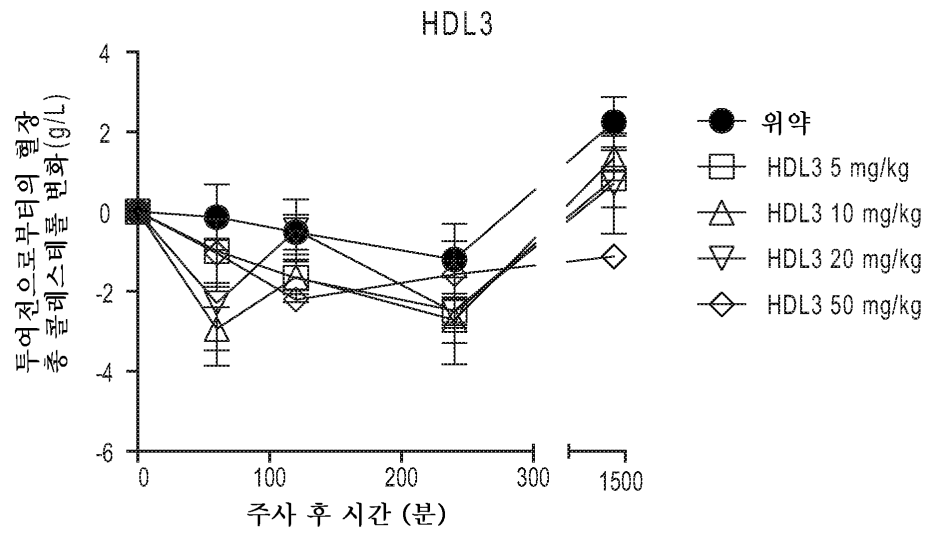
도면48



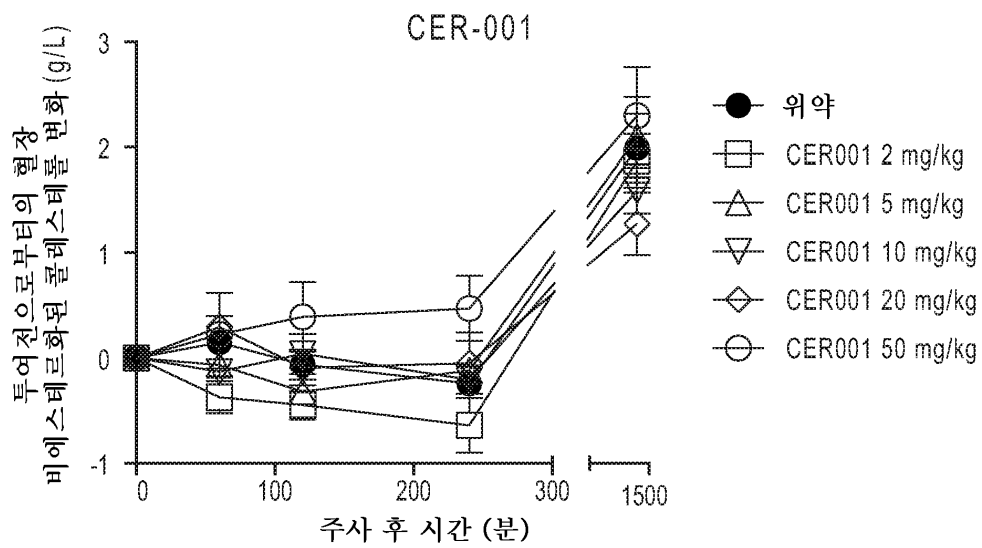
도면49



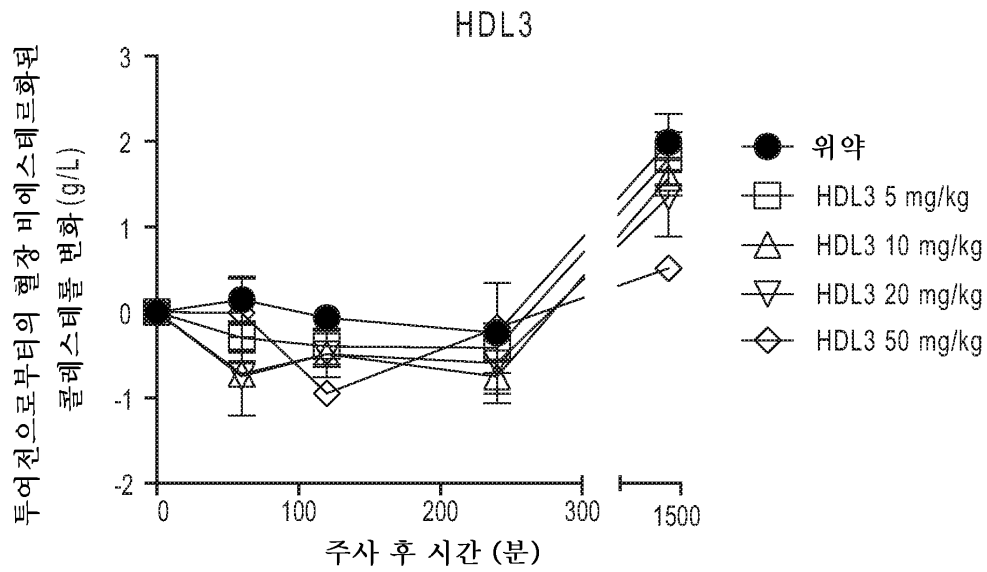
도면50



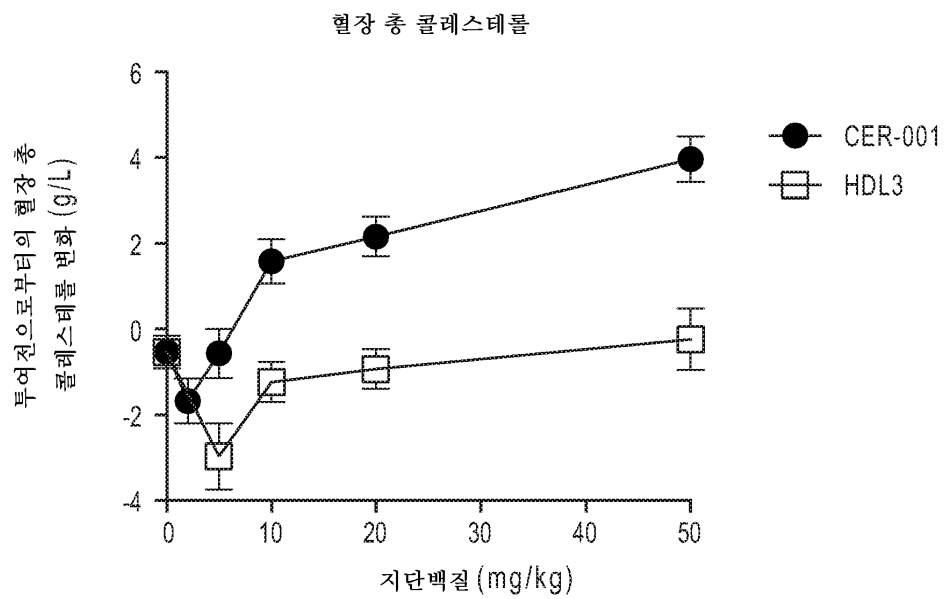
도면51



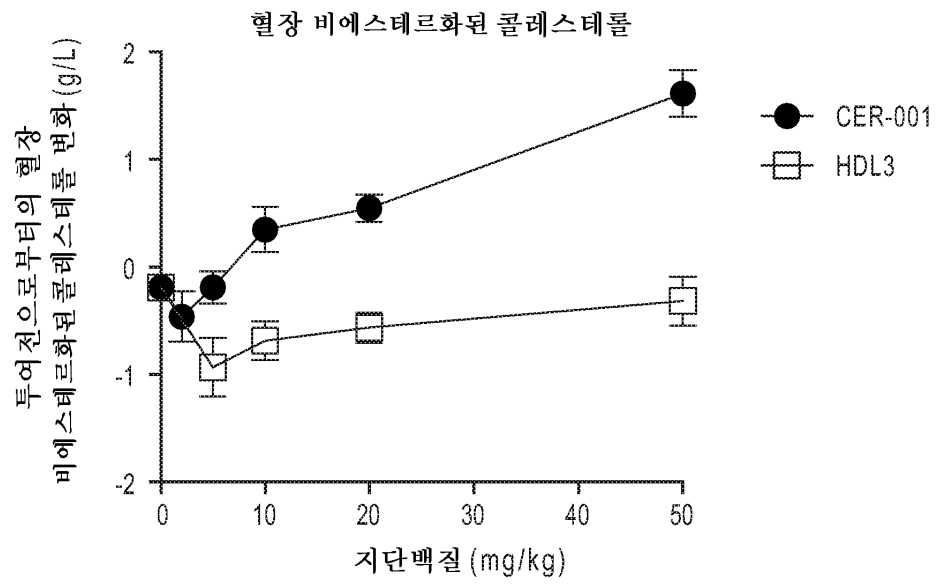
도면52



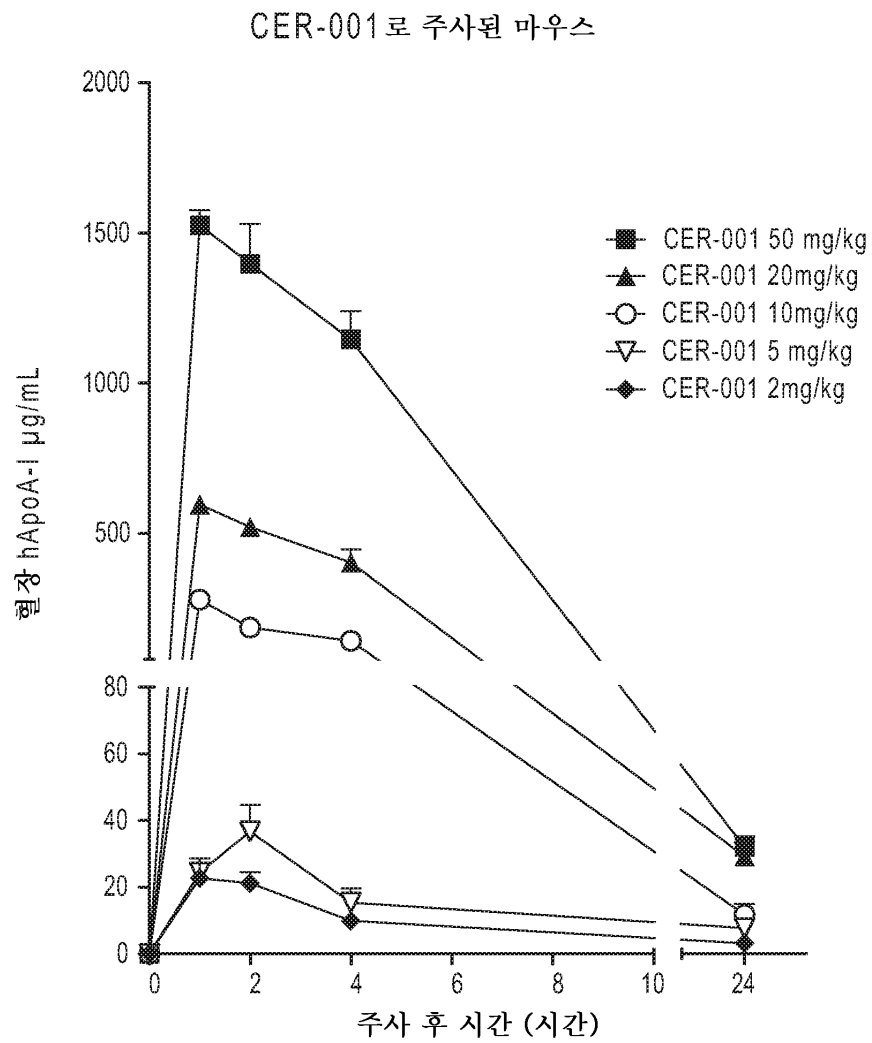
도면53



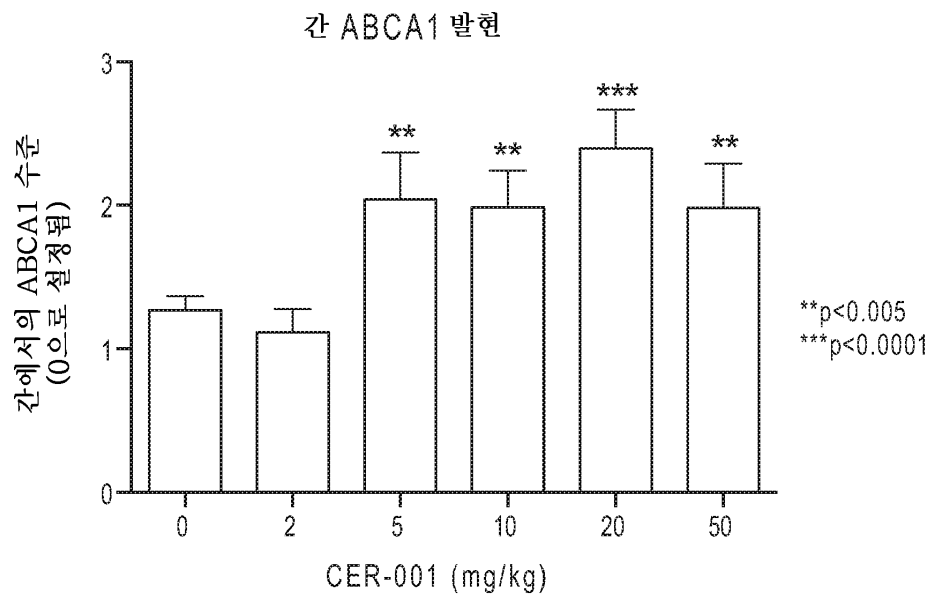
도면54



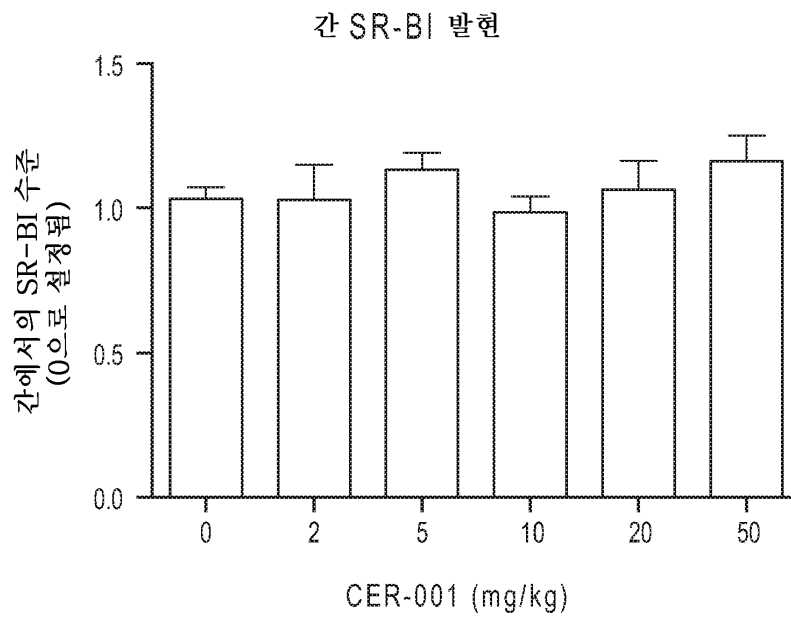
도면55



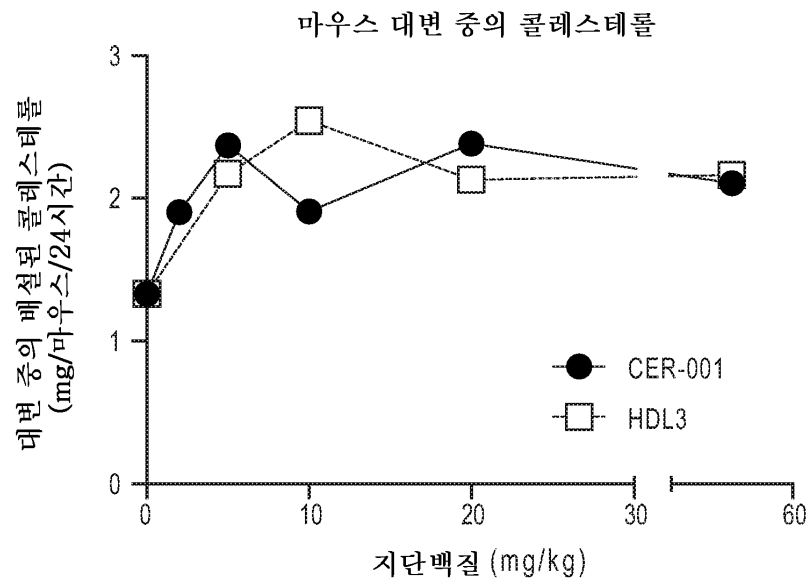
도면58



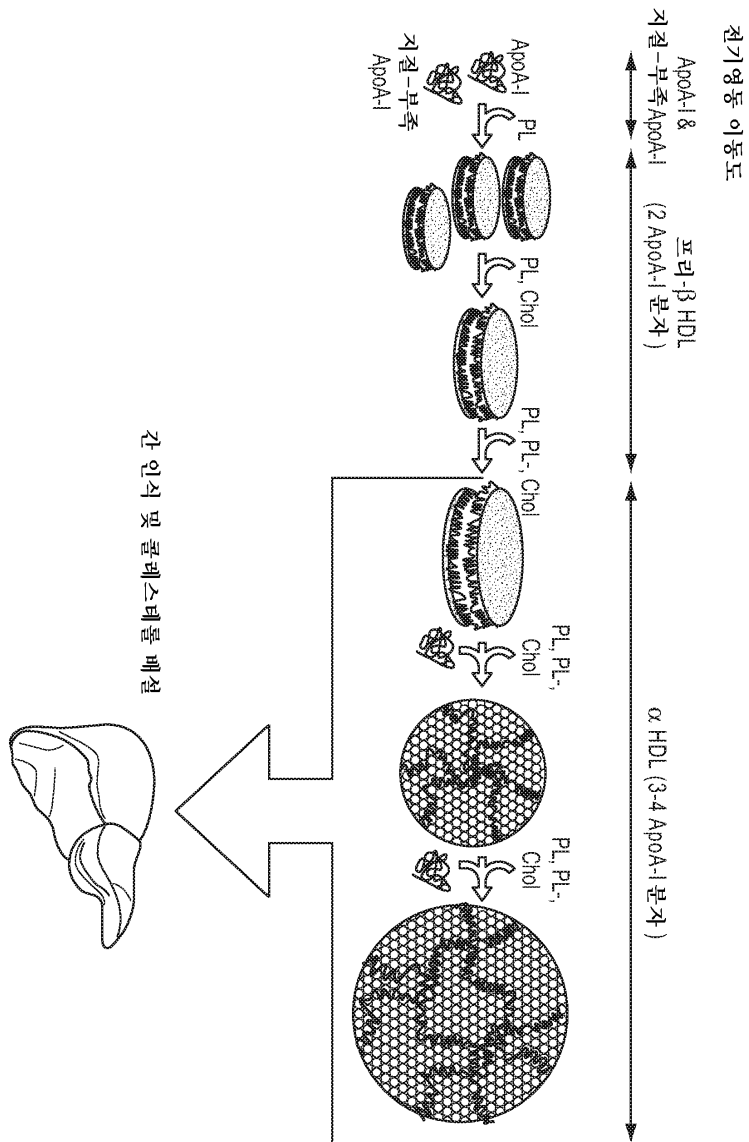
도면59



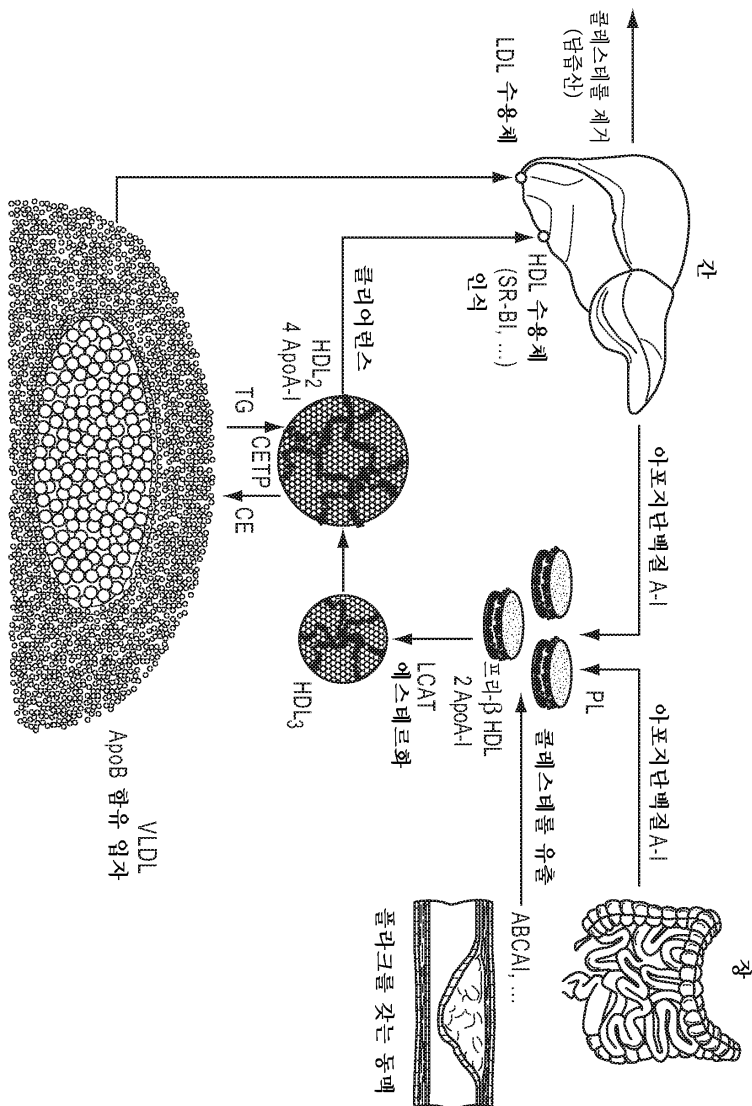
도면60



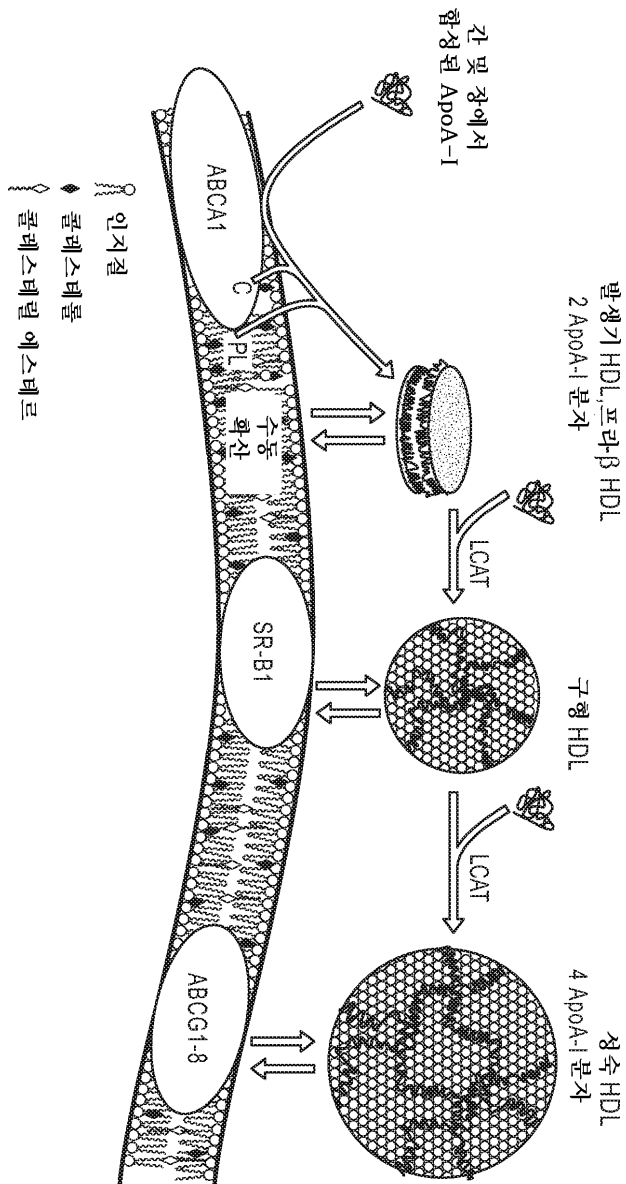
도면61



도면62



도면63



도면64

| | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| MKAAVLT LAV | LFLTGSQ ARH | <u>FWQQDE</u> PPQS | PWDRVKDLAT |
| 5 | 6 | 7 | 8 |
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| VYVDVLKDSG | RDYVSQFEGS | ALGKQLNLKL | LDNWDSVTST |
| 9 | 0 | 1 | 2 |
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| FSKLREQLGP | VTQEFWDNLE | KETEGLRQEM | SKDLEEVKAK |
| 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| VQPYLDDFQK | KWQEEMELYR | QKVEPLRAEL | QEGARQKLHE |
| 1 | 1 | 1 | 2 |
| 7 | 8 | 9 | 0 |
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| LQEKLSPLGE | EMRDRARAHV | DALRTHLAPY | SDELRQRLAA |
| 2 | 2 | 2 | 2 |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| RLEALKENG | GARLAEYHAKA | TEHLSTLSEK | AKPALEDLRQ |
| 2 | 2 | | |
| 5 | 6 | | |
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567 | |
| GLLPVLESFK | VSFLSALEEY | TKKLNTQ | |

도면65aa

```

1 atggcttggt ggctcagct gaggttgctg ctgtggaaga acctcacttt cagaagaaga
61 caaacatgtc agctgctgct ggaagtggcc tggcctctat ttatcttctt gatcctgac
121 tctgttcggc tgagctaccc accctatgaa caacatgaat gccatcttcc aaataaagcc
181 atgcccctcg caggaacact tccttgggtt caggggatta tctgtaatgc caacaacccc
241 tgtttccgtt acccgactcc tggggaggtt cccggagttg ttggaaactt taacaaatcc
301 attgtggctc gctgtttctc agatgctcgg aggttctctt tatacagcca gaaagacacc
361 agcatgaagg acatgcgcaa agttctgaga acattacagc agatcaagaa atccagctca
421 aacttgaagc ttcaagattt cctggtgagc aatgaaacct tctctgggtt cctgtatcac
481 aacctctctc tcccaaagtc tactgtggac aagatgctga gggctgatgt cattctccac
541 aaggtatttt tgcaaggcta ccagttacat ttgacaagtc tgtgcaatgg atcaaaatca
601 gaagagatga ttcaacttgg tgaccaagaa gtttctgagc tttgtggcct accaaggagg
661 aaactggctg cagcagagcg agtacttctg tccaacatgg acatcctgaa gccaatcctg
721 agaactacta actctacatc tcccttcccg agcaaggagc tggctgaagc cacaaaaaca
781 ttgctgcata gtcttgggac tctggcccag gagctgttca gcatgagaag ctggagtgac
841 atgcgacagc aggtgatgtt tctgaccaat gtgaacagct ccagctcctc caccaaaatc
901 taccaggctg tgtctcgtat tgtctgctgg catcccagg gaggggggct gaagatcaag
961 tctctcaact ggtatgagga caacaactac aaagccctct ttggaggcaa tggcactgag
1021 gaagatgctg aaaccttcta tgacaactct acaactcctt actgcaatga tttgatgaag
1081 aatttggagt ctagtctctt tcccgctt atctggaaag ctctgaagcc gctgctcgtt
1141 ggaagatcc tgtatacacc tgacactcca gccacaaggc aggtcatggc tgaggtgaac
1201 aagaccttcc aggaactggc tgtgttccat gatctggaag gcatgtggga ggaactcagc
1261 ccaagatctt ggaccttcat ggagaacagc caagaaatgg acctgtgctg gatgctggtt
1321 gacagcaggg acaatgacca cttttgggaa cagcagttgg atggcttaga ttggacagcc
1381 caagacatcg tggcgttttt ggccaagcac ccagaggatg tccagtccag taatggttct
1441 gtgtacacct ggagagaagc tttcaacgag actaaccagg caatccggac catactctgc
1501 ttcattggagt gtgtcaacct gaacaagcta gaacccatag caacagaagt ctggctcatc
1561 aacaagtcca tggagctgct ggatgagagg aagtctctgg ctggtattgt gttcactgga
1621 attactccag gcagcattga gctgccccat catgtcaagt acaagatccg aatggacatt
1681 gacaatgtgg agaggacaaa taaaatcaag gatgggtact gggaccctgg tccctgagct
1741 gacccctttg aggacatgag gtacgtctgg gggggcttct cctacttgca ggatgtggtg
1801 gagcaggcaa tcatcagggt gctgacgggc accgagaaga aaactggtgt ctatatgcaa
1861 cagatgcctt atccctgtta cgttgatgac atctttctgc ggggtgatgag ccggtcaatg
1921 cccctcttca tgacgtggc ctggatttac tcagtggctg tgatcatcaa gggcatcgtg
1981 tatgagaagg aggcacggct gaaagagacc atgcggatca tgggcctgga caacagcatc
2041 ctctggttta gctggttcat tagtagcctc attcctcttc ttgtgagcgc tggcctgcta
2101 gtggctcatcc tgaagttagg aaacctgctg ccctacagtg atcccagcgt ggtgtttgtc
2161 ttctgtctcg tgtttgctgt ggtgacaatc ctgcagtgtc tctgattag cacactcttc
2221 tccagagcca acctggcagc agcctgtggg ggcacatct acttcacgct gtacctgcc
2281 tacgtctctg gtgtggcatg gcaggactac gtgggcttca cactcaagat cttcgctagc
2341 ctgctgtctc ctgtggcttt tgggtttggc tgtgagtact ttgccctttt tgaggagcag
2401 ggcattggag tgcagtggga caacctgttt gagagtcctg tggaggaaga tggcttcaat
2461 ctcaacctt cggctctccat gatgctgttt gacaccttcc tctatggggt gatgacctgg
2521 tacattgagg ctgtctttcc aggccagtac ggaattccca ggccttggt ttttcttgc
2581 accaagtcct actggtttgg cgaggaaagt gatgagaaga gccaccctgg ttccaaaccag

```

도면65ab

```

2641 aagagaatat cagaaatctg catggaggag gaacccaccc acttgaagct gggcgtgtcc
2701 attcagaacc tggtaaaagt ctaccgagat gggatgaagg tggctgtcga tggcctggca
2761 ctgaattttt atgagggcca gatcacctcc ttcttgggcc acaatggagc ggggaagacg
2821 accaccatgt caatcctgac cgggttgttc ccccgacct cgggcaccgc ctacatcctg
2881 ggaaaagaca ttctgtctga gatgagcacc atccggcaga acctgggggt ctgtcccag
2941 cataacgtgc tgtttgacat gctgactgtc gaagaacaca tctgttcta tgcccgttg
3001 aaagggtctt ctgagaagca cgtgaaggcg gagatggagc agatggccct ggatgttgt
3061 ttgccatcaa gcaagctgaa aagcaaaaca agccagctgt caggtggaat gcagagaaag
3121 ctatctgttg ccttggcctt tgtcggggga tctaagggtt tcattctgga tgaaccaca
3181 gctggtgttg accttactc ccgcagggga atatgggagc tgctgtgaa ataccgaca
3241 ggcgcacca ttattctctc tacacaccac atggatgaag cggacgtcct gggggacagg
3301 attgccatca tctcccatgg gaagctgtgc tgtgtgggct cctccctgtt tctgaagaac
3361 cagctgggaa caggtacta cctgacctg gtcaagaaag atgtggaatc ctccctcagt
3421 tctgcagaa acagtagtag cactgtgtca tacctgaaaa aggaggacag tgtttctcag
3481 agcagttctg atgtggcct gggcagcgac catgagagtg acacgtgac catcgatgtc
3541 tctgtctatc ccaacctcat caggaagcat gtgtctgaag cccgctggtt ggaagacata
3601 gggcatgagc tgacctatgt gctgccatat gaagctgcta aggaggagc ctttgtggaa
3661 ctctttcatg agattgatga ccgctctca gacctgggca tttctagtta tggcatctca
3721 gagacgaccc tggaaagaat attcctcaag gtggccgaag agagtgggtt ggatgtgag
3781 acctcagatg gtaccttgcc agcaagacga aacaggcggg ccttcgggga caagcagagc
3841 tgtcttcgcc cgttcaactga agatgatgct gctgatccaa atgattctga catagacca
3901 gaatccagag agacagactt gctcagtggg atggatggca aagggtccta ccaggtgaaa
3961 ggctggaaac ttacacagca acagtttgtg gcccttttgt ggaagagact gctaattgcc
4021 agacggagtc ggaaggatt tttgtctcag attgtottgc cagctgtgtt tgtctgcatt
4081 gcccttgtgt tcagcctgat cgtgccaccc tttggcaagt accccagcct ggaacttcag
4141 ccttggtatg acaacgaaca gtacacattt gtcagcaatg atgtcctga ggacacggga
4201 acctggaac tottaaagc cctcaccaa gacctggct tcgggacccg ctgtatggaa
4261 ggaaccccaa tcccagacac gccctgccag gcaggggagg aagatggac cactgcccc
4321 gttcccaga catcatgga cctcttcag aatgggaact ggacaatgca gaaccttca
4381 cctgcatgcc agtgtagcag cgacaaaatc aagaagatgc tgctgtgtg tccccagg
4441 gcaggggggc tgcctctcc acaaagaaaa caaaacactg cagatatect tcaggacctg
4501 acaggaagaa acatttcgga ttatctggtg aagacgtatg tgcagatcat agccaaaagc
4561 ttaaagaaca agatctgggt gaatgagttt aggtatggcg gcttttcctt ggggtgtcagt
4621 aatactcaag cacttctctc gagtcaagaa gttaatgatg ccatcaaaca aatgaagaaa
4681 cacctaaagc tggccaagga cagttctgca gatcgatttc tcaacagctt gggaagattt
4741 atgacaggac tggacaccaa aaataatgtc aaggtgtggt tcaataacaa gggctggcat
4801 gcaatcagct ctttctgaa tgtcatcaac aatgccattc tccgggccaa cctgcaaaag
4861 ggagagaacc ctagccatta tgggaattact gctttcaatc atcccctgaa tctaccaag
4921 cagcagctct cagaggtggc tctgatgacc acatcagtgg atgtccttgt gtccatctgt
4981 gtcactcttg caatgtcctt cgtcccagcc agctttgtcg tattcctgat ccaggagcgg
5041 gtcagcaaa caaaacacct gcagttctac agtggagtga agcctgtcat ctactggctc
5101 tctaattttg tctgggatat gtgcaattac gttgtccctg ccacactggt cattatcatc
5161 ttcactctgt tccagcagaa gtcctatgtg tcctccacca atctgcctgt gctagccctt
5221 ctacttttgc tgtatgggtg gtcaatcaca cctctcatgt acccagcctc ctttgtgttc

```

도면65ac

```

5281 aagatcccca gcacagccta tgtggtgctc accagcgtga acctcttcat tggcattaat
5341 ggcagcgtgg ccacctttgt gctggagctg ttcacgcaca ataagctgaa taatatcaat
5401 gatatcctga agtccgtggt cttgatcttc ccacattttt gcctgggacg agggctcato
5461 gacatggtga aaaaccaggc aatggctgat gccctggaaa ggtttgggga gaatcgcttt
5521 gtgtcaccat tatcttggga cttggtggga cgaaacctct tcgccatggc cgtgggaagg
5581 gtggtgttct tcctcattac tgttctgac cagtacagat tcttcatcag gccagacct
5641 gtaaatgcaa agctatctcc tctgaatgat gaagatgaag atgtgaggcg ggaaagacag
5701 agaattcttg atggtggagg ccagaatgac atcttagaaa tcaaggagtt gacgaagata
5761 tatagaagga agcgggaagc tgctgttgac aggatttgcg tgggcattcc tcctggtgag
5821 tgctttgggc tcctgggagt taatggggct ggaaaatcat caactttcaa gatgttaaca
5881 ggagatacca ctgttaccag aggagatgct ttcttaaca aaaatagtat cttatcaaac
5941 atccatgaag tacatcagaa catgggctac tgccctcagt ttgatgccat cacagagctg
6001 ttgactggga gagaacacgt ggagtctttt gcccttttga gaggagtccc agagaaagaa
6061 gttggcaagg ttggtgagtg ggcgattcgg aaactggggc tcgtgaagta tggagaaaaa
6121 tatgctggta actatagtgg aggcaacaaa cgcaagctct ctacagccat ggctttgac
6181 ggcgggcctc ctgtggtggt tctggatgaa ccaccacag gcatggatcc caaagcccgg
6241 cggttcttgt ggaattgtgc cctaagtgtt gtcaaggagg ggagatcagt agtgcttaca
6301 tctcatagta tggaagagtg tgaagctctt tgactagga tggcaatcat ggtcaatgga
6361 aggttcagggt gccttggcag tgtccagcat ctaaaaata ggtttggaga tggttatata
6421 atagttgtac gaatagcagg gtccaaccgg gacctgaagc ctgtccagga tttctttgga
6481 cttgcatttc ctggaagtgt tctaaaagag aaacaccgga acatgctaca ataccagctt
6541 ccatcttcat tatcttctct gcccaggata ttcagcatcc tctcccagag caaaaagcga
6601 ctccacatag aagactactc tgtttctcag acaacacttg accaagtatt tgtgaacttt
6661 gccaaaggacc aaagtgatga tgaccactta aaagacctct cattacacaa aaaccagaca
6721 gtagtggacg ttgcagttct cacatctttt ctacaggatg agaaagtga agaaagctat
6781 gtatga

```

도면65b

```

1 macwpqlril lwknltfrrr qtcqlllewa wplfiflili svrlsyppye qhechfpnka
61 mpsagtlpwv qgiicnannp cfrytpgea pgvvgnfks ivarlfsdar rlllysqkdt
121 smkdmrkvlr tlqqikksss nlklqdfldv netfsgflyh nlsipkstvd kmlradvilh
181 kvflqgyqlh ltslcnsgks eemiqlgdqe vselcglpre klaaaervlr snmdilkpil
241 rtlnstspfp skelaeatkt llhslgtlaq elfsmrswsd mrqevmfltn vnsssstqi
301 yqavsrivcg hpegggkik slnwyednny kalfgngte edaetfydns ttpycndlmk
361 nlessplsri iwkalkpllv gkilytpdtp atrqvmaevn ktfqelavfh dlegmweels
421 pkiwtfmens qemdlvrml dsrnddhfwe qqldgldwta qdivaflakh pedvqssngs
481 vytwreafne tnqairtistr fmecvnlkl epiatevwli nksmellder kfwagivftg
541 itpgsielph hvkykirmdi dnvertnkik dgywdpgpra dpfedmryvw ggfaylqdvv
601 eqaiirvltg tekktgvymq qmpypcyvdd iflrvmssrm plfntlawiy svaviikgiv
661 yekearlket mrimglndsi lwfswfissl ipllvsagll vvilkgnll pysdpsvvfv
721 flsvfavvti lqcflistlf sranlaaacg giifytlylp yvlcvawqdy vgftlkifax
781 llspvafgfg ceyfalfee qigvqwdnlf espveedgfn lttsvsmmlf dtflygvmtw
841 yieavfpggy giprpwyfpc tksywfgees dekshpgsnq kriseicmee epthlklgvs
901 iqnlkvvyrd gmkvavdgl lnyegqits flghngagkt ttmsiltglf pptsqtayil
961 gkdirsemst irqnlgvcpq hnvlfldmlt eehiwfyarl kglsekhvka emeqmaldvg
1021 lpssklkskt sqlsggmqrk lsvalafvgg skvvildept agvdpysrrg iwelllkyrq
1081 grtiilsthh mdeadvlgr iaiishgkic cvgsslflkn qlgtgyyltl vkkdvestls
1141 scrnssstvs ylkkedsvsq sssdaglgd hesdtltidv saislirkh vsearlvedi
1201 gheltyvly eaakegafve lfheiddrls dlgiissygis ettleelflk vaeesgvdae
1261 tsdgtlparr nrrafgdkqs clrpftedda adpndsddp esretdllsg mdgkgsyqvk
1321 gwklrtqqfv allwkrllia rrsrkqffaq ivlpavfvc alvfslivpp fgkypslqlq
1381 pwmyneqytf vsndapedtg tlellnaltk dpgfgtrcme gnpipdtpcq ageewttap
1441 vpqtimdlfq ngnwtmqnps pacqcasski kkmplvcppg agglpppqrk qntadilqdl
1501 tgrnisdylv ktyvqiiaks lknkiwvnef ryggfslgvs ntqalppsge vndaxqmkk
1561 hlklakdssa drflnslgrf mtgldtrnnv kvwfnknkgh aissflnvin nailranlqk
1621 genpshygit afnhplnltk qqlsevoxmt tsdvlvsic vifamsfvpa sfvvfliger
1681 vskakhlqfi sgvkpvlywl snfvwdmcny vvpatlvihi ficfqqksyv sstnlpvlal
1741 llllygwsit plmpasfvf kipstayvvl tsvnlfigin gsvatfvlel ftdnklennin
1801 dilksvflif phfclgrgli dmvnqamad alerfgernf vsplswdlvg rnlfamaveg
1861 vvfflitvli qyrffirprp vnaklsplnd ededvrrerq rildgggqnd ileikeltki
1921 yrrkrkpavd ricvgippge cglgvgnga gksstfkmlt gdtvttrgda flnxnsilsn
1981 ihevhnqmgc cpqfdaitel ltgrehveff allrgvpeke vgkvgewair klglvkygek
2041 yagnysggnk rklstamali ggppvvflde pttgmdpkar rflwncaalsv vkegrsvvlt
2101 shsmeeceal ctrmairvng rfrclgsvqh lknrfgdgyt ivvriagsnp dlkpvgdfff
2161 lafpgsvxke khrnmlqyql pssslslari fsilsgskkr lhiedysvsq ttldqvfvnf
2221 akdqsdddhl kdslshknqt vvdvavltst lqdekakesy v

```

도면66aa

```

1  gctttataaa ggggagtttc cctgcacaag ctctctctct tgtctgccgc catgtgagac
61  atgcctttca ctttccgcca tgatcatgag gcttccccag ccacatggaa ctaatgccag
121 cagttactct gcagagatga cggagcccaa gtcggtgtgt gtctcgggtg atgagggtgt
181 gtccagcaac atggaggcca ctgagacgga cctgctgaat ggacatctga aaaaagtaga
241 taataacctc acggaagccc agcgcttctc ctcttgcct cggagggcag ctgtgaacat
301 tgaattcagg gacctttcct attcggttcc tgaaggacc cgggtggagg aaaaaggata
361 caagaccctc ctgaaaggaa tttccgggaa gttcaatagt ggtgagttgg tggccattat
421 gggctccttc ggggcccggg agtccacgct gatgaacatc ctggttggtg acagggagac
481 gggcatgaag ggggcccgtc tcatcaacgg cctgccccgg gacctgcgct gcttccggaa
541 ggtgtcctgc tacatcatgc aggatgacat gctgctgccg catctcactg tgcaggaggc
601 catgatggtg tcggcacatc tgaagcttca ggagaaggat gaaggcagaa gggaaatggt
661 caaggagata ctgacagcgc tgggcttgct gtcttgccgc aacacgcgga ccgggagcct
721 gtcagggtgt cagcgcaagc gcttgcccat cgcgtggag ctggtgaaca accctccagt
781 catgttcttc gatgagccca ccagcggcct ggacagcgc tctgtcttc aggtggtctc
841 gctgatgaaa gggctcgtc aagggggtcg ctccatcatt tgcaccatcc accagcccag
901 cgccaaactc ttcgagctgt tcgaccagct ttacgtcctg agtcaaggac aatgtgtgta
961 ccggggaaaa gtctgcaatc ttgtgccata tttgagggat ttgggtctga actgcccaac
1021 ctaccacaac ccagcagatt ttgtcatgga ggttgcatcc ggcgagtacg gtgatcagaa
1081 cagtcggtcg gtgagagcgg ttcgggaggg catgtgtgac tcagaccaca agagagacct
1141 cgggggtgat gccgaggtga acccttttct ttggcaccgg cctctgaaag aggactcctc
1201 gtccatggaa ggctgccaca gcttctctgc cagctgcctc acgcagttct gcatcctctt
1261 caagaggacc ttcctcagca tcatgaggga ctcggtcctg acacacctgc gcatcacctc
1321 gcacattggg atcggcctcc tcattggcct gctgtacttg gggatcggga acgaagccaa
1381 gaagggtctg agcaactccg gcttctctct ctctccatg ctgttctctc tgttcgcggc
1441 cctcatgcct actgttctga catttcccct ggagatggga gtctttcttc gggaaacacct
1501 gaactactgg tacagcctga aggcctacta cctggccaag accatggcag acgtgccctt
1561 tcagatcatg ttcccagtg cctactgcag catcgtgtac tggatgacgt cgcagccgtc
1621 cgacgcctg cgctttgtgc tgtttgccgc gctgggcacc atgacctccc tgggtgcaca
1681 gtccctgggc ctgctgatcg gagccgctc cacgtccctg caggtggcca ctctcgtggg
1741 ccacgtgaca gccatcccgg tgctcctgtt ctcggggttc ttctcagct tcgacacct
1801 cccacgtac ctacagtgga tgtcctacat ctctatgtc aggtatgggt tcgaaggggt
1861 catcctctcc atctatggct tagaccggga agatctgcac tgtgacatcg acgagacgtg
1921 ccacttcag aagtcggagg ccacctgcg ggagctggac gtggaaaatg ccaagctgta
1981 cctggacttc atcgtactcg ggattttctt catctccctc cgcctcattg cctattttgt
2041 cctcaggtac aaaatccggg cagagaggta aaacacctga atgccaggaa acaggaagat
2101 tagacactgt ggcgaggggc acgtctagaa tcgaggaggc aagcctgtgc ccgaccgacg
2161 acacagagac tcttctgac caaccctag aaccgcgttg ggtttgtggg tgtctcgtgc
2221 tcagccactc tgcccagctg ggttggtatc tctctccatt cccctttcta gctttaacta
2281 ggaagatgta ggcagattgg tggttttttt ttttttaaca tacagaattt taaataccac
2341 aactggggca gaatttaaag ctgcaacaca gctggtgatg agaggcttcc tcagtccagt
2401 cgctccttag caccaggcac cgtgggtcct ggatggggaa ctgcaagcag cctctcagct
2461 gatggctgca cagtcagatg tctggtggca gagagtcoga gcatggagcg attccatttt
2521 atgactgttg tttttcacat tttcatcttt ctaagggtgtg tctcttttcc aatgagaagt
2581 catttttgca agccaaaagt cgaatcaatcg cattcatitt aagaaattat acccttttag

```

도면66ab

```

2641 tacttgctga agaattgattc agggtaaatc acatactttg tttagagagg cgaggggttt
2701 aaccgagtca ccagctggt ctatatacata gacagcactt gtgaaggatt gaatgcaggt
2761 tccaggtgga ggggaagacgt ggacaccatc tccactgagc catgcagaca tttttaaaag
2821 ctatacaaaa aattgtgaga agacattggc caactctttc aaagtctttc tttttccacg
2881 tgcttcttat ttttaagcga atatatgtgt tgtttcttcc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2941 aaaaaa

```


도면66b

```

1  maclmaafsv gtamnassys aemtepksvc vsvdevvssn meatetdlln ghllkvdnnl
61  teaqrffslp rraavniefr dlsysvpegp wrkkgyktl lkgisgkfns gelvaimgps
121 gagkstlmni lagyretgmk gavlinglpr dlrcfrkvsc yimqddmlip hltvqeammv
181 sahlklqekd egrremvkei ltaigllsca ntrtgslsgg qrkrilaiale lvnnppvmff
241 deptsgldsa scfqvvslmk glaaggrsii ctihqpsakl felldqlyvl sqgqcvyrgk
301 vcnlvpylrd lglncptyhn padfvmevas geygdqnsrl vravregmcd sdhkrdlggd
361 aevnpflwhr pseevkqtkr lkglrkdsss megchsfsas cltqfcilfk rtflsimrds
421 vlthlritsh igiglligll ylgigneakk vlsnsgflff smlflmfaal mptvltfple
481 mgvflrehln ywyslkayyl aktmadvpfq imfpvaycsi vywmtsqspsd avrfvlfaal
541 gtmtslvaqs lglligaast slqvatfvgp vtaipvllfs gffvsfdtip tylqwmisyis
601 yvrygfegvi lsiygldred lhcdidetch fqkseailre ldvenaklyl dfivlgiffi
661 slrliayfvl rykiraer

```

도면67aa

```

1 agttttccgag gaactttttcg ccggcgccgg gccgcctctg aggccagggc aggacacgaa
61 cgcgcggagc ggcggcgggcg actgagagcc ggggcgcggc cggcgctccc taggaagggc
121 cgtacgaggc ggcggggccc ggcggcctcc cggaggaggc ggctgcgcca tggacgagcc
181 acccttcagc gaggcggctt tggagcaggc gctgggcgag ccgtgcgacg tggacgcggc
241 gctgctgacc gacatcgaag gtgaagtccg cgcggggagg ggtagggcca acggcctgga
301 cgccccaagg gcgggcgcag atcgcgagc catggattgc actttcgaag acatgcttca
361 gcttatcaac aaccaagaca gtgacttccc tggcctatct gaccacccct atgctgggag
421 tggggcaggg ggcacagacc ctgccagccc cgataccagc tcccagggca gcttgtctcc
481 acctcctgcc acattgagct cctctcttga agccttctcg agcgggcggc aggcagcgcc
541 ctcacccctg tcccctcccc agcctgcacc cactccattg aagatgtacc cgtccatgcc
601 cgctttctcc cctgggcctg gtatcaagga agagtccagt ccactgagca tctgcagac
661 cccaccccca cagcccctgc caggggccct cctgccacag agcttcccag cccagcccc
721 accgcagttc agctccaccc ctgtgttagg ctaccccagc cctccgggag gcttctctac
781 aggaagccct cccgggaaca cccagcagcc gctgcctggc ctgccactgg cttccccgcc
841 aggggtcccg cccgtctcct tgcacacca ggtccagagt gtggtcccc agcagctact
901 gacagtcaca gctgccccca cggcagcccc tgtaacgacc actgtgacct cgcagatcca
961 gcagggtccg gtctgtctgc agccccactt catcaaggca gactcgtctg ttctgacagc
1021 catgaagaca gacggagcca ctgtgaaggc ggcaggctct agtccctgg tctctggcac
1081 cactgtgcag acagggcctt tgcgaccct ggtgagtggc ggaaccatct tggcaacagt
1141 cccactggtc gtagatgcgg agaagctgcc tatcagccgg ctgcgagctg gcagcaaggc
1201 cccggcctct gccagagacc gtggagagaa gcgcacagcc cacaacgcca ttgagaagcg
1261 ctaccgctcc tccatcaatg acaaaatcat tgagctcaag gatctgggtg tgggcaactga
1321 ggcaaagctg aataaatctg ctgtcttgcg caaggecatc gactacattc gctttctgca
1381 acacagcaac cagaaactca agcaggagaa cctaagtctg cgactgctg tccacaaaag
1441 caaatctctg aaggatctgg tgtcggcctg tggcagtgga gggaaacacag acgtgctcat
1501 ggagggcgtg aagactgagg tggaggacac actgacccca ccccccctcg atgctggctc
1561 acctttccag agcagccccc tgtcccttgg cagcaggggc agtggcagcg gtggcagtgg
1621 cagtgtactg gagcctgaca gccagctctt tgaggacagc aaggcaaagc cagagcagcg
1681 gccgtctctg cacagccggg ccatgctgga ccgctcccgc ctggccctgt gcacgctcgt
1741 ctctctctgc ctgtctgca accccttggc ctcttctgct ggggcccggg ggcttcccag
1801 cccctcagat accaccagcg tctaccatag cctggggcgc aacgtgctgg gcaccgagag
1861 cagagatggc cctggctggg cccagtggct gctgccccca gtggtctggc tgcataatgg
1921 gctgttggtg ctgctctcct tgggtgcttct ctttgtctac ggtgagccag tcacacggcc
1981 ccactcaggc cccgccgtgt acttctggag gcacgcaag caggctgacc tggacctggc
2041 ccggggagac tttgcccagg ctgcccagca gctgtggctg gccctgcggg cactgggccc
2101 gccctgccc acctcccacc tggacctggc ttgtagcctc ctctggaacc tcacccgtca
2161 cctgctgcag cgtctctggg tgggcggctg gctggcaggc cgggcagggg gcctgcagca
2221 ggactgtgct ctgcgagtgg atgctagcgc cagcgcccga gacgcagccc tggcttacca
2281 taagctgcac cagctgcaca ccatggggaa gcacacaggc gggcacctca ctgccaccaa
2341 cctggcgctg agtgccctga acctggcaga gtgtgcaggg gatgccgtgt ctgtggcgac
2401 gctggccgag atctatgtgg cggtgcatt gagagtgaag accagtctcc cacgggcctt
2461 gcattttctg acacgcttct tcctgagcag tgcccggcag gcctgcctgg cacagagtgg
2521 ctcagtgcct cctgccatgc agtggctctg ccaccccggt ggccacggtt tcttcgtgga
2581 tggggactgg tccgtgctca gtaccccatg ggagagcctg tacagcttgg ccgggaaccc

```

도면67ab

```

2641 agtggaccgcc ctggcccagg tgactcagct attccgggaa catctcttag agcgagcact
2701 gaactgtgtg acccagccca accccagccc tgggtcagct gatggggaca aggaattctt
2761 ggatgccctc gggtagcctgc agctgctgaa cagctgttct gatgctgcgg gggctcctgc
2821 ctacagcttc tccatcagtt ccagcatggc caccaccacc ggcgtagacc cggtagccaa
2881 gtggtggggc tctctgacag ctgtggtgat ccactggctg cggcgggatg aggagcggc
2941 tgagcggctg tgcccgtggtg tggagcacct gcccgggtg ctgcaggagt ctgagagacc
3001 cctgcccagg gcagctctgc actccttcaa ggctgcccgg gccctgctgg gctgtgccaa
3061 ggcagagtct ggtccagcca gctgacctat ctgtgagaag gccagtgggt acctgcagga
3121 cagcctggct accacaccag ccagcagctc cattgacaag gccgtgcagc tgttcctgtg
3181 tgacctgctt cttgtggtgc gcaccagcct gtggcggcag cagcagcccc cggccccggc
3241 cccagcagcc cagggcacca gcagcaggcc ccaggcttcc gcccttgagc tgcgtggctt
3301 ccaacgggac ctgagcagcc tgaggcggct ggcacagagc ttccggcccg ccattgcggag
3361 ggtgttccta catgaggcca cggcccggct gatggcgggg gccagcccca cacggacaca
3421 ccagctcttc gaccgcagtc tgaggcggcg ggcaggcccc ggtggcaaa gaggcgggt
3481 ggcggagctg gagcgcgggc ccacgcggcg ggagcacgag gaggccttgc tgcgtggctc
3541 ctgctacctg cccccggct tctgtcggc gcccgggcag cgcgtgggca tgcgtgctga
3601 ggcggcgccg acactcgaga agcttggcga tcgcccgtg ctgcacgact gtcacagat
3661 gctcatgccc gctggcggtg ggaccactgt cacttccagc tagacccgt gtccccggc
3721 tcagcaccgc tgtctctagc cactttggtc cgtgacgct tctgtcctgc gtcgaagctt
3781 tgaaggccga aggcagtga agagactctg gcctccacag ttccacctgc ggtgctgtg
3841 tgccttcgag gtggaaggcc cgagggcgcg gatcttgacc ctaagaccgg cggccatgat
3901 ggtgctgacc tctggtggcc gatcggggca ctgcaggggc cgagccattt tggggggccc
3961 cctccttgc tctgcaggca ccttagtggc ttttttctc ctgtgtacag ggaagagagg
4021 ggtacatttc cctgtgctga cggaagccaa cttggcttcc cggactgca agcagggctc
4081 tgcccagag gctctctct cgtcgtggg agagagacgt gtacatagtg taggtcagcg
4141 tgcttagcct cctgacctga ggtcctgtg ctactttgcc ttttgcaaac tttattttca
4201 tagattgaga agttttgtac agagaattaa aatatgaaatt atttataaaa aaaaaaaaaa
4261 aa

```

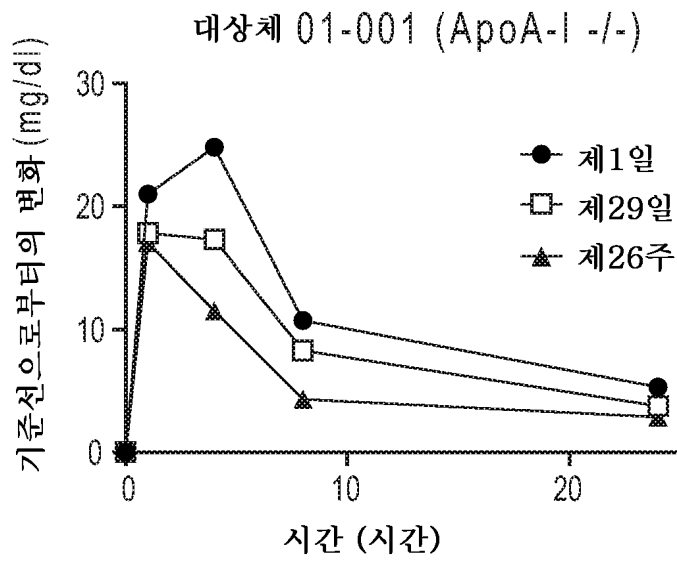
도면67b

```

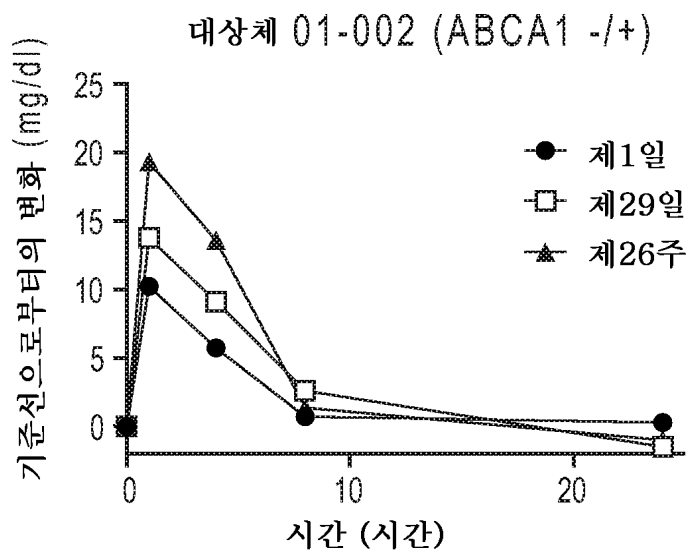
1 mdeppfseaa leqalgepcd ldaalltdie dmlqlinnqd sdfpglfdpp yagsgaggt
61 paspdtsspg slspppatls ssleafllsgp qaapsplsp qpaptplkmy psmfafspgp
121 gikeesvpls ilqtptpql pgallpqsfp apappqfsst pvlgypppg gfstgsppgn
181 tqqlplgpl asppgvppvs lhtqvqsvvp qllltvtaap taapvttvt sqiqqvpvll
241 qphfikadsl lltamktdga tvkaaglspl vsgettvtgtp lptlvsggti latvplvda
301 eklpinrlaa gskapasaqs rgekrtahna iekryrssi dkielkdlv vgteaklnks
361 avlrkaidyi rflqhsnqkl kqenlslrta vhskslkd vsacsggnt dvlmegvkte
421 vedtltppps dagspfqsps lslgsrgsgs ggsgsdsepd spvfedskak peqrpslhr
481 gmlrslral ctlvflclsc nplaslglar glpspsdtt vyhspgrnvl gtesrdgpgw
541 aqwllppvw lllglllvls lvllfvypg vtrphsgpav yfwrhrkqad ldlargdfaq
601 aaqqlwlar algrplptsh ldlacsllwn lirlhlqlw vgrwlagrag glqddcalrv
661 dasasardaa lvyhklhqlh tmgkhtgghl tatnlalsal nlaecagdav svatlaiyv
721 aaalrvktsl pralhfltrf flssarqacl aqsgsvppam qwlchpvghr ffvdgdwsvl
781 stpweslysl agnpvdpla vtqlfrehll eralnvtqp npspgsadgd kefsdalgyl
841 qllnscsdaa gapaysfsis ssmatttgvd pvakwwaslt avvihwlrdd eeaaerlcpl
901 vehlprvlqe serplpraal hsfkaarall gcakaesgpa slticekasg yldslattp
961 asssidkavq lfledlllv rtslwrqqp papapaaqgt ssrpqasale lrgfqrldss
1021 lrrlaqsfrp amrrvflhea tarlmagasp trthqlldrs lrrragpggk ggavaelepr
1081 ptrrehaeal llascylppg flsapggrvg mlaeaartle klgdrllhd cqqlmlrlgg
1141 gttvtss

```

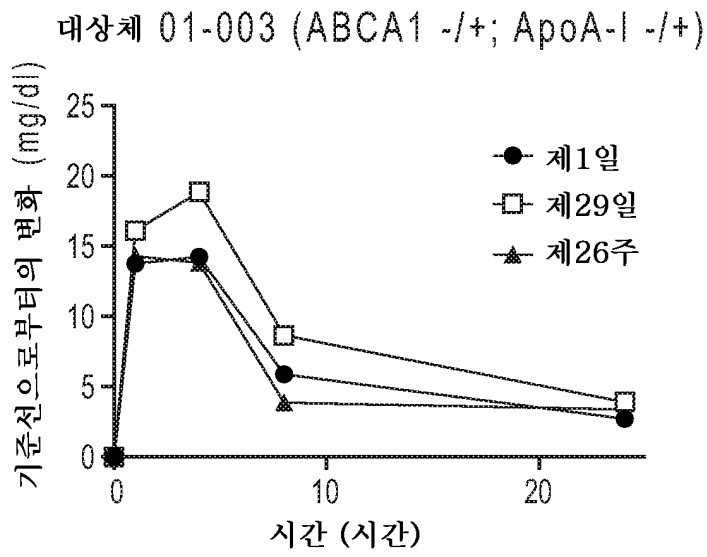
도면68a



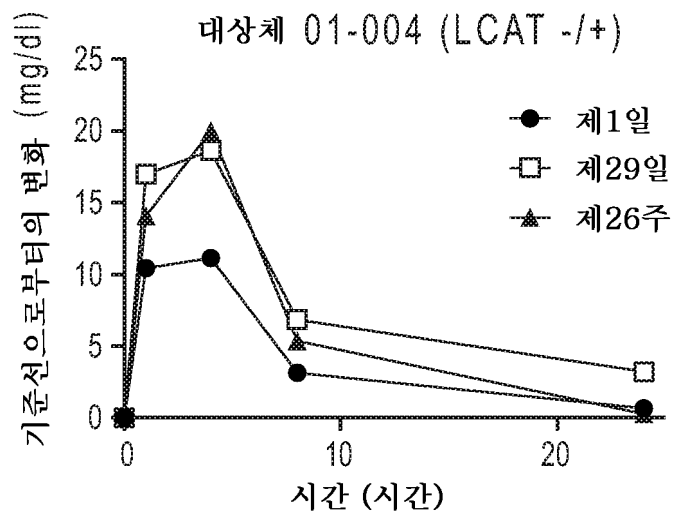
도면68b



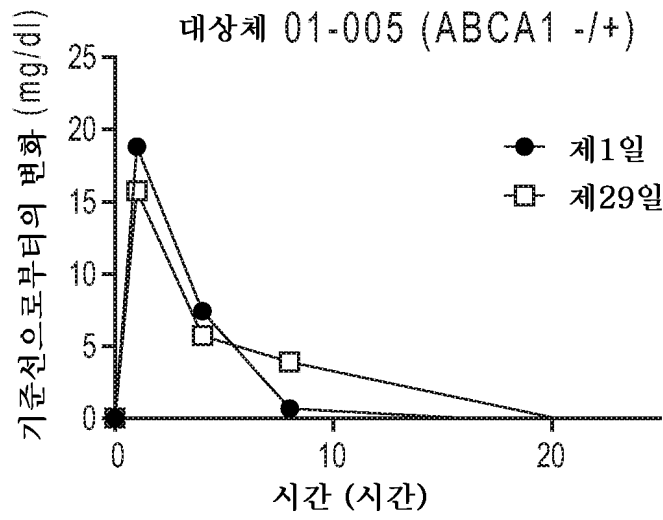
도면68c



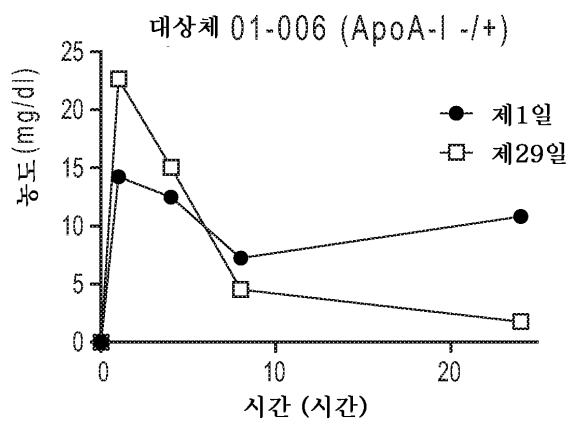
도면68d



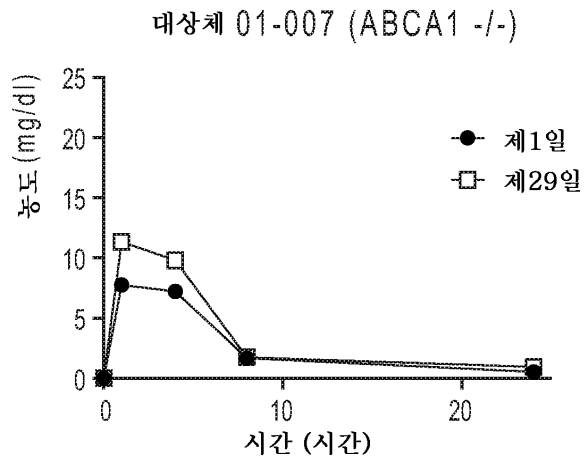
도면68e



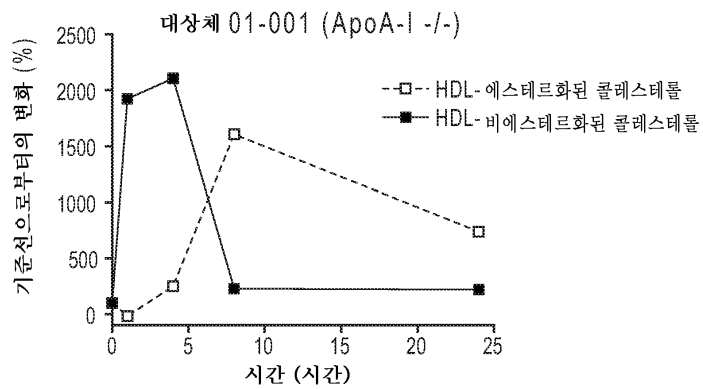
도면68f



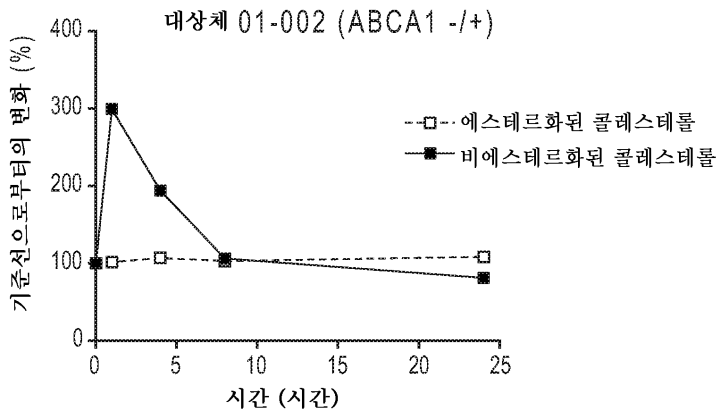
도면68g



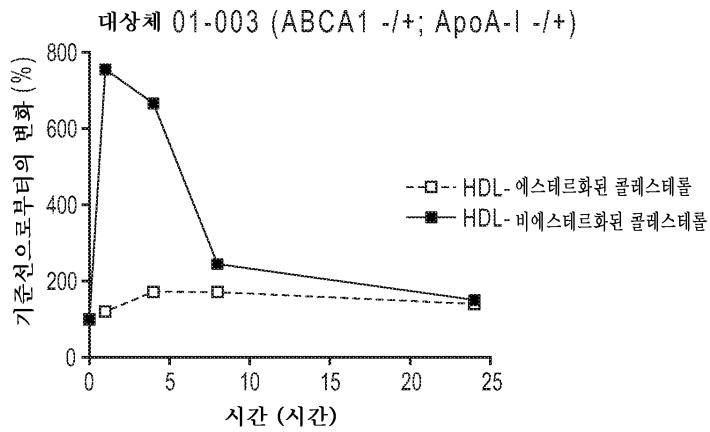
도면69a



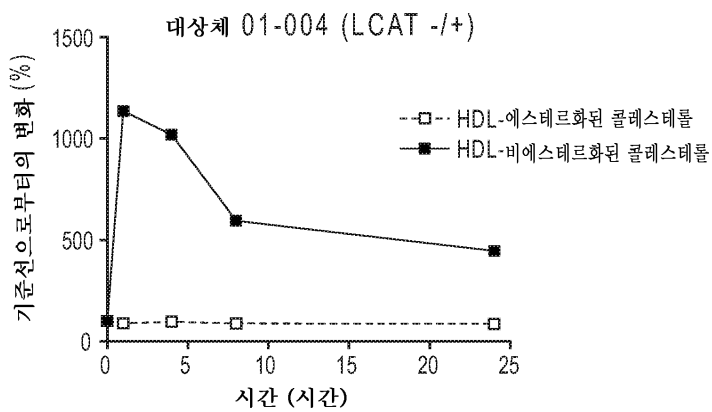
도면69b



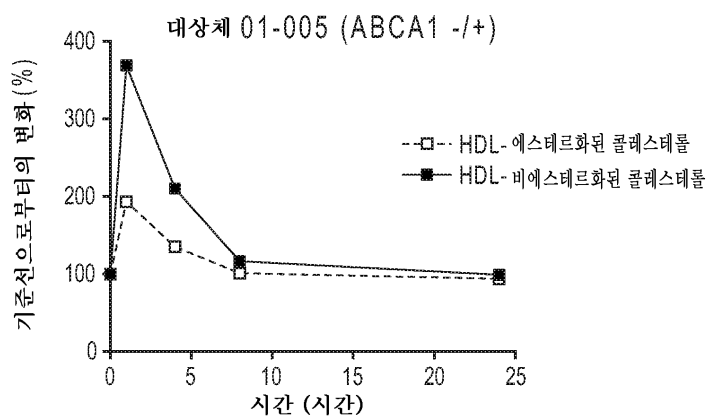
도면69c



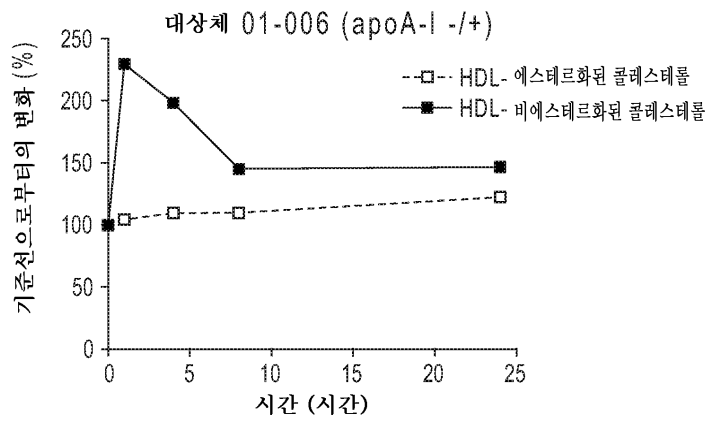
도면69d



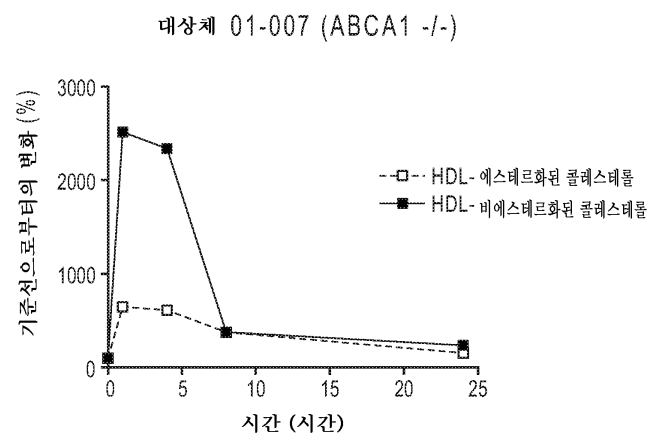
도면69e



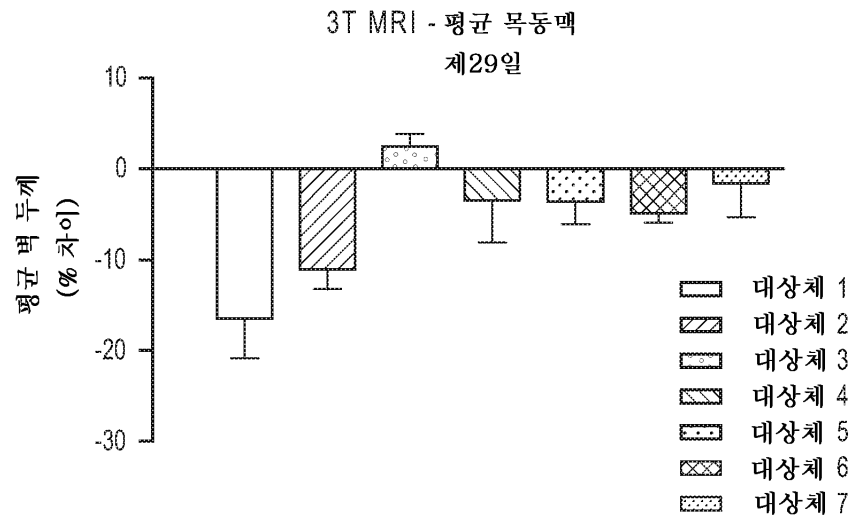
도면69f



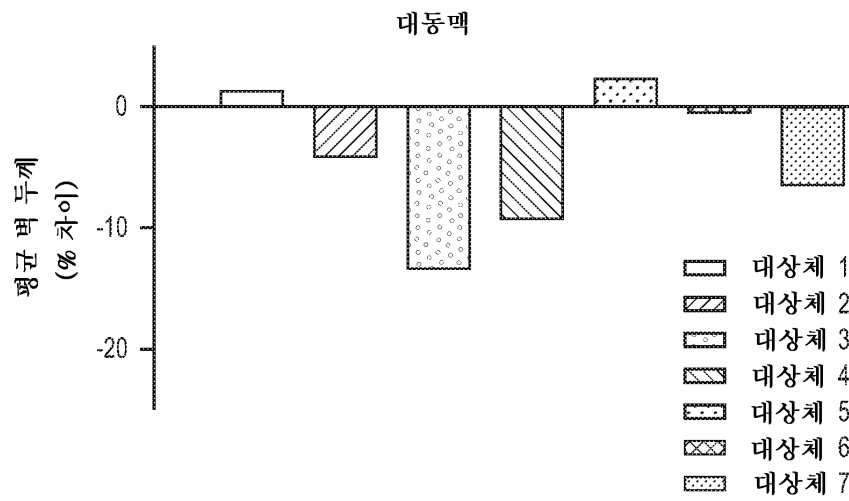
도면69g



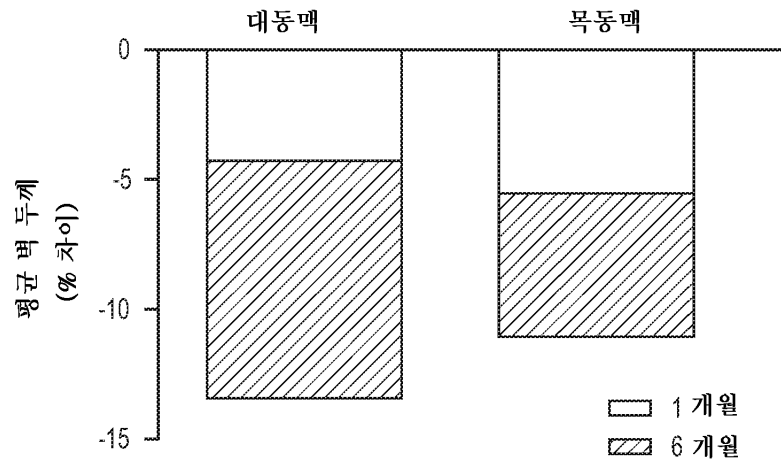
도면70



도면71



도면72



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CERENIS THERAPEUTICS HOLDING S.A.

<120> HDL THERAPY MARKERS

<130> CRN-016W0

<140><141><150> 61/988,095

<151> 2014-05-02

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp

35 40 45

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

50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
 65 70 75 80
 Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
 85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
 100 105 110
 Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
 115 120 125
 Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
 130 135 140
 Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu
 145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala
 165 170 175
 Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
 180 185 190
 Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn
 195 200 205
 Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu
 210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln
 225 230 235 240
 Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala
 245 250 255
 Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
 260 265

<210> 2

<211> 6786

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggcttggtt ggcctcagct gaggttgctg ctgtggaaga acctcacttt cagaagaaga

60

| | |
|--|------|
| caaacatgtc agctgctgct ggaagtggcc tggcctctat ttatcttcct gatcctgac | 120 |
| | |
| tctgttcggc tgagctaccc accctatgaa caacatgaat gccattttcc aaataaagcc | 180 |
| atgccctctg caggaacact tccttgggtt caggggatta tctgtaatgc caacaacccc | 240 |
| tgtttccgtt acccgactcc tggggaggct cccggagtgt ttggaaactt taacaaatcc | 300 |
| attgtggctc gcctgttctc agatgctcgg aggccttcttt tatacagcca gaaagacacc | 360 |
| agcatgaagg acatgcgcaa agttctgaga acattacagc agatcaagaa atccagctca | 420 |
| aacttgaagc ttcaagattt cctgggtggac aatgaaacct tctctgggtt cctgtatcac | 480 |
| aacctctctc tcccaaagtc tactgtggac aagatgctga gggctgatgt cattctccac | 540 |
| | |
| aaggtatfff tgcaaggcta ccagttacat ttgacaagtc tgtgcaatgg atcaaaatca | 600 |
| gaagagatga ttcaacttgg tgaccaagaa gtttctgagc tttgtggcct accaaggagg | 660 |
| aaactggctg cagcagagcg agtacttctg tccaacatgg acatcctgaa gccaatcctg | 720 |
| agaacactaa acitctacatc tcccttcccg agcaaggagc tggctgaagc cacaaaaaca | 780 |
| ttgtgcata gtcttgggac tctggcccag gagctgttca gcatgagaag ctggagtgc | 840 |
| atgcgacagg aggtgatgtt tctgaccaat gtgaacagct ccagctctc caccctaatc | 900 |
| taccaggctg tctctcgtat tgtctgcggg catcccagg gaggggggct gaagatcaag | 960 |
| | |
| tctctcaact ggtatgagga caacaactac aaagccctct ttggaggcaa tggcactgag | 1020 |
| gaagatgctg aaaccttcta tgacaactct acaactcctt actgcaatga tttgatgaag | 1080 |
| aatttggagt ctagtctctt ttcccgcatt atctggaag ctctgaagcc gctgctcgtt | 1140 |
| gggaagatcc tgtatacacc tgacactcca gccacaaggc aggtcatggc tgaggatgaac | 1200 |
| aagaccttc aggaactggc tgtgttccat gatctggaag gcatgtggga ggaactcagc | 1260 |
| ccaagatct ggaccttcat ggagaacagc caagaaatgg acctgtccg gatgctgttg | 1320 |
| gacagcaggg acaatgacca cttttgggaa cagcagttgg atggcttaga ttggacagcc | 1380 |
| | |
| caagacatcg tggcgttttt ggccaagcac ccagaggatg tccagtccag taatggttct | 1440 |
| gtgtacacct ggagagaagc tttaacgag actaaccagg caatccggac catatctcgc | 1500 |
| ttcatggagt gtgtcaacct gaacaagcta gaacccatag caacagaagt ctggctcatc | 1560 |
| aacaagtcca tggagctgct ggatgagagg aagtcttggg ctggtattgt gttcactgga | 1620 |
| attactccag gcagcattga gctgccccat catgtcaagt acaagatccg aatggacatt | 1680 |
| gacaatgtgg agaggacaaa taaaatcaag gatgggtact gggaccctgg tcctcgagct | 1740 |
| gaccctttg aggacatgcg gtacgtctgg gggggcttcg cctacttgca ggatgtggtg | 1800 |

gagcaggcaa tcatcagggt gctgacgggc accgagaaga aaactggtgt ctatatgcaa 1860
 cagatgccct atccctgtta cgttgatgac atctttctgc gggatgatgag ccggtcaatg 1920
 cccctcttca tgacgtggc ctggatttac tcagtggctg tgatcatcaa gggcatcgtg 1980
 tatgagaagg aggcacggct gaaagagacc atgcggatca tgggcctgga caacagcatc 2040
 ctctggttta gctggttcat tagtagcctc attcctcttc ttgtgagcgc tggcctgcta 2100
 gtggtcatcc tgaagttagg aaacctgctg cctacagtg atcccagcgt ggtgtttgtc 2160
 ttctgtccg tgtttgctgt ggtgacaatc ctgcagtgt tctgattag cacactcttc 2220

 tccagagcca acctggcagc agcctgtggg ggcatcatct acttcacgt gtacctgccc 2280
 tacgtcctgt gtgtggcatg gcaggactac gtgggcttca cactcaagat cttcgttagc 2340
 ctgctgtctc ctgtggcttt tgggtttggc tgtgagtact ttgccctttt tgaggagcag 2400
 ggcatggag tcagtgga caacctgttt gagagtctg tggaggaaga tggcttcaat 2460
 ctaccactt cggctctcat gatgtgttt gacaccttc tctatgggt gatgacctgg 2520
 tacattgagg ctgtctttcc aggccagtac ggaattcca gcccttgta tttccttgc 2580
 accaagtct actggtttgg cgaggaaagt gatgagaaga gccacctgg ttccaaccag 2640

 aagagaatat cagaaatctg catggaggag gaaccaccc acttgaagct gggcgtgtcc 2700
 attcagaacc tggtaaaagt ctaccgagat gggatgaagg tggctgtcga tggcctggca 2760
 ctgaattttt atgaggcca gatcacctc ttctgggccc acaatggagc ggggaagacg 2820
 accaccatgt caatcctgac cgggttgttc cccccacct cgggcaccgc ctacatcctg 2880
 ggaaaagaca ttgctctga gatgagcacc atccggcaga acctgggggt ctgtccccag 2940
 cataactgac tgtttgacat gctgactgtc gaagaacaca tctggttcta tgcccgttg 3000
 aaagggtct ctgagaagca cgtgaaggcg gagatggagc agatggcct ggatgttgg 3060

 ttgcatcaa gcaagctgaa aagcaaaaca agccagctgt caggtggaat gcagagaaag 3120
 ctatctgtgg ccttggcctt tgtcggggga tctaaggttg tcattctgga tgaaccaca 3180
 gctggtgtgg acccttactc ccgagggga atatgggagc tgtgctgaa ataccgaaa 3240
 ggccgacca ttattctctc tacacaccac atggatgaag cggacgtct gggggacagg 3300
 attgcatca tctccatgg gaagctgtgc tgtgtgggt cctcctgtt tctgaagaac 3360
 cagctgggaa caggtacta cctgacctg gtcaagaaag atgtggaatc ctccctcagt 3420
 tctgcagaa acagtagtag cactgtgtca tacctgaaa aggaggacag tgtttctcag 3480

 agcagttctg atgctggcct gggcagcgac catgagagt acacgtgac catcgatgtc 3540
 tctgctatct ccaacctcat caggaagcat gtgtctgaag cccggctggt ggaagacata 3600
 gggcatgagc tgacctatgt gctgccatat gaagctgcta aggaggagc ctttgtgaa 3660

| | |
|---|------|
| ctctttcatg agattgatga ccggctctca gacctgggca tttctagtta tggcatctca | 3720 |
| gagacgaccc tggaagaaat attcctcaag gtggccgaag agagtggggt ggatgctgag | 3780 |
| acctcagatg gtaccttgcc agcaagacga aacaggcggg ccttcgggga caagcagagc | 3840 |
| tgtcttcgcc cgttcactga agatgatgct gctgatccaa atgattctga catagacca | 3900 |
| | |
| gaatccagag agacagactt gctcagtggg atggatggca aagggtccta ccaggtgaaa | 3960 |
| ggctggaaac ttacacagca acagtttgtg gcccttttgt ggaagagact gctaattgcc | 4020 |
| agacggagtc ggaaaggatt ttttctcag attgtcttgc cagctgtgtt tgtctgcatt | 4080 |
| gcccttgtgt tcagcctgat cgtgccaccc ttggcaagt accccagcct ggaacttcag | 4140 |
| ccctggatgt acaacgaaca gtacacattt gtcagcaatg atgctcctga ggacacggga | 4200 |
| accctggaac tcitaaacgc cctcaccaa gacctggct tcgggaccg ctgtatggaa | 4260 |
| ggaaacccaa tcccagacac gccctgccag gcaggggagg aagagtggac cactgcccc | 4320 |
| | |
| gttccccaga ccatcatgga cctcttccag aatgggaact ggacaatgca gaacccttca | 4380 |
| cctgcatgcc agttagcag cgacaaaatc aagaagatgc tgcctgtgtg tccccaggg | 4440 |
| gcaggggggc tgcctctcc acaagaaaa caaaactg cagatctct tcaggacctg | 4500 |
| acaggaagaa acatttcgga ttatctgggt aagacgtatg tgcagatcat agccaaaagc | 4560 |
| ttaaagaaca agatctgggt gaatgagttt aggtatggcg gcttttcct ggggtgtcagt | 4620 |
| aatactaag cacttctcc gagtcaagaa gttaatgatg ccatcaaaca aatgaagaaa | 4680 |
| cacctaaagc tggccaagga cagtctgca gatcgattt tcaacagctt gggaagattt | 4740 |
| | |
| atgacaggac tggacaccaa aaataatgtc aagggtgtgt tcaataacaa gggctggcat | 4800 |
| gcaatcagct ctttctgaa tgtcatcaac aatgccattc tccgggcca cctgcaaaag | 4860 |
| ggagagaacc ctagccatta tggaattact gctttcaatc atccctgaa tctaccaag | 4920 |
| cagcagctct cagaggtggc tctgatgacc acatcagtgg atgtccttgt gtccatctgt | 4980 |
| gtcatctttg caatgtcctt cgtcccagcc agctttgtcg tattcctgat ccaggagcgg | 5040 |
| gtcagcaaag caaaacacct gcagttcatc agtggagtga agcctgtcat ctactggctc | 5100 |
| tctaattttg tctgggatat gtgcaattac gttgtccctg ccacactggt cattatcatc | 5160 |
| | |
| ttcatctgct tccagcagaa gtctatgtg tctccacca atctgcctgt gctagccctt | 5220 |
| ctacttttgc tgtatgggtg gtcaatcaca cctctcatgt acccagctc ctttgtgttc | 5280 |
| aagatcccca gcacagccta tgttggtgtc accagcgtga acctcttcat tggcattaat | 5340 |
| ggcagcgtgg ccacctttgt gctggagctg ttaccgaca ataagctgaa taatatcaat | 5400 |
| gatatcctga agtccgtgtt cttgatcttc ccacattttt gcctgggacg agggctcatc | 5460 |
| gacatggtga aaaaccaggc aatggctgat gccctggaaa ggtttgggga gaatcgcttt | 5520 |

gtgtcaccaat taicttggga cttggtggga cgaaacctct tcgcatggc cgtggaaggg 5580

gigggtttct tctcattac tgttctgac cagtacagat tcttcatcag gcccagacct 5640

gtaaagtcaa agctatctcc tctgaatgat gaagatgaag atgtgaggcg ggaaagacag 5700

agaattcttg atggtggagg ccagaatgac atcttagaaa tcaaggagtt gacgaagata 5760

tatagaagga agcgggaagc tgctgttgac aggatttgcg tgggcattcc tcttgtgag 5820

tgctttgggc tcttgggagt taatggggct ggaaaatcat caactttcaa gatgttaaca 5880

ggagatacca ctgttaccag aggagatgct ttccttaaca aaaatagtat cttatcaaac 5940

atccatgaag tacatcagaa catgggctac tgcctcagt ttgatgcat cacagagctg 6000

ttgactggga gagaacacgt ggagtcttt gcccttttga gaggagtccc agagaaagaa 6060

gttggcaagg ttggtgagtg ggcgattcgg aaactgggcc tcgtgaagta tggagaaaaa 6120

tatgctggta actatagtg aggcaacaaa cgcaagctct ctacagccat ggctttgatc 6180

ggcgggcctc ctgtggtgtt tctggatgaa cccaccacag gcatggatcc caaagcccgg 6240

cggttcttgt ggaattgtgc cctaagtgt gtcaaggagg ggagatcagt agtgcttaca 6300

tctcatagta tggaagagtg tgaagctctt tgcactagga tggcaatcat ggtcaatgga 6360

aggttcaggt gccttggcag tgtccagcat ctaaaaata ggtttggaga tggttataca 6420

atagtgtac gaatagcagg gtccaaccg gacctgaagc ctgtccagga ttcttttga 6480

cttgcatctc ctggaagtgt tctaaaagag aaacaccgga acatgctaca ataccagctt 6540

ccatcttcat tatcttctct ggccaggata ttcagcatcc tctcccagag caaaaagcga 6600

ctccacatag aagactactc tgtttctcag acaacacttg accaagtatt tgtgaacttt 6660

gccaaggacc aaagtatga tgaccactta aaagacctct cattacacaa aaaccagaca 6720

gtagtggacg ttgcagttct cacatctttt ctacaggatg agaaagtga agaaagctat 6780

gtatga 6786

<210> 3

<211> 2261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (780)..(780)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (1555)..(1555)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (1648)..(1648)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (1974)..(1974)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (2168)..(2168)

<223> Any amino acid

<400> 3

Met Ala Cys Trp Pro Gln Leu Arg Leu Leu Leu Trp Lys Asn Leu Thr

1 5 10 15

Phe Arg Arg Arg Gln Thr Cys Gln Leu Leu Leu Glu Val Ala Trp Pro

20 25 30

Leu Phe Ile Phe Leu Ile Leu Ile Ser Val Arg Leu Ser Tyr Pro Pro

35 40 45

Tyr Glu Gln His Glu Cys His Phe Pro Asn Lys Ala Met Pro Ser Ala

50 55 60

Gly Thr Leu Pro Trp Val Gln Gly Ile Ile Cys Asn Ala Asn Asn Pro

65 70 75 80

Cys Phe Arg Tyr Pro Thr Pro Gly Glu Ala Pro Gly Val Val Gly Asn

85 90 95

Phe Asn Lys Ser Ile Val Ala Arg Leu Phe Ser Asp Ala Arg Arg Leu

100 105 110

Leu Leu Tyr Ser Gln Lys Asp Thr Ser Met Lys Asp Met Arg Lys Val

115 120 125

Leu Arg Thr Leu Gln Gln Ile Lys Lys Ser Ser Ser Asn Leu Lys Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Leu Ser Leu Pro Lys Ser Thr Val Asp Lys Met Leu Arg Ala Asp

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 165 | 170 | 175 | |
| Val Ile Leu His Lys Val Phe Leu Gln Gly Tyr Gln Leu His Leu Thr | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Ser Leu Cys Asn Gly Ser Lys Ser Glu Glu Met Ile Gln Leu Gly Asp | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| | | | |
| Gln Glu Val Ser Glu Leu Cys Gly Leu Pro Arg Glu Lys Leu Ala Ala | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Ala Glu Arg Val Leu Arg Ser Asn Met Asp Ile Leu Lys Pro Ile Leu | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Arg Thr Leu Asn Ser Thr Ser Pro Phe Pro Ser Lys Glu Leu Ala Glu | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Ala Thr Lys Thr Leu Leu His Ser Leu Gly Thr Leu Ala Gln Glu Leu | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| | | | |
| Phe Ser Met Arg Ser Trp Ser Asp Met Arg Gln Glu Val Met Phe Leu | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Thr Asn Val Asn Ser Ser Ser Ser Ser Thr Gln Ile Tyr Gln Ala Val | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Ser Arg Ile Val Cys Gly His Pro Glu Gly Gly Gly Leu Lys Ile Lys | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Ser Leu Asn Trp Tyr Glu Asp Asn Asn Tyr Lys Ala Leu Phe Gly Gly | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| | | | |
| Asn Gly Thr Glu Glu Asp Ala Glu Thr Phe Tyr Asp Asn Ser Thr Thr | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Pro Tyr Cys Asn Asp Leu Met Lys Asn Leu Glu Ser Ser Pro Leu Ser | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Arg Ile Ile Trp Lys Ala Leu Lys Pro Leu Leu Val Gly Lys Ile Leu | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Tyr Thr Pro Asp Thr Pro Ala Thr Arg Gln Val Met Ala Glu Val Asn | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| | | | |
| Lys Thr Phe Gln Glu Leu Ala Val Phe His Asp Leu Glu Gly Met Trp | | | |
| 405 | 410 | 415 | |

Glu Glu Leu Ser Pro Lys Ile Trp Thr Phe Met Glu Asn Ser Gln Glu
420 425 430

Met Asp Leu Val Arg Met Leu Leu Asp Ser Arg Asp Asn Asp His Phe
435 440 445

Trp Glu Gln Gln Leu Asp Gly Leu Asp Trp Thr Ala Gln Asp Ile Val
450 455 460

Ala Phe Leu Ala Lys His Pro Glu Asp Val Gln Ser Ser Asn Gly Ser
465 470 475 480

Val Tyr Thr Trp Arg Glu Ala Phe Asn Glu Thr Asn Gln Ala Ile Arg
485 490 495

Thr Ile Ser Arg Phe Met Glu Cys Val Asn Leu Asn Lys Leu Glu Pro
500 505 510

Ile Ala Thr Glu Val Trp Leu Ile Asn Lys Ser Met Glu Leu Leu Asp
515 520 525

Glu Arg Lys Phe Trp Ala Gly Ile Val Phe Thr Gly Ile Thr Pro Gly
530 535 540

Ser Ile Glu Leu Pro His His Val Lys Tyr Lys Ile Arg Met Asp Ile
545 550 555 560

Asp Asn Val Glu Arg Thr Asn Lys Ile Lys Asp Gly Tyr Trp Asp Pro
565 570 575

Gly Pro Arg Ala Asp Pro Phe Glu Asp Met Arg Tyr Val Trp Gly Gly
580 585 590

Phe Ala Tyr Leu Gln Asp Val Val Glu Gln Ala Ile Ile Arg Val Leu
595 600 605

Thr Gly Thr Glu Lys Lys Thr Gly Val Tyr Met Gln Gln Met Pro Tyr
610 615 620

Pro Cys Tyr Val Asp Asp Ile Phe Leu Arg Val Met Ser Arg Ser Met
625 630 635 640

Pro Leu Phe Met Thr Leu Ala Trp Ile Tyr Ser Val Ala Val Ile Ile
645 650 655

Lys Gly Ile Val Tyr Glu Lys Glu Ala Arg Leu Lys Glu Thr Met Arg

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 660 | 665 | 670 | |
| Ile Met Gly Leu Asp Asn Ser Ile Leu Trp Phe Ser Trp Phe Ile Ser | | | |
| 675 | 680 | 685 | |
| Ser Leu Ile Pro Leu Leu Val Ser Ala Gly Leu Leu Val Val Ile Leu | | | |
| 690 | 695 | 700 | |
| Lys Leu Gly Asn Leu Leu Pro Tyr Ser Asp Pro Ser Val Val Phe Val | | | |
| 705 | 710 | 715 | 720 |
| | | | |
| Phe Leu Ser Val Phe Ala Val Val Thr Ile Leu Gln Cys Phe Leu Ile | | | |
| 725 | 730 | 735 | |
| Ser Thr Leu Phe Ser Arg Ala Asn Leu Ala Ala Ala Cys Gly Gly Ile | | | |
| 740 | 745 | 750 | |
| Ile Tyr Phe Thr Leu Tyr Leu Pro Tyr Val Leu Cys Val Ala Trp Gln | | | |
| 755 | 760 | 765 | |
| Asp Tyr Val Gly Phe Thr Leu Lys Ile Phe Ala Xaa Leu Leu Ser Pro | | | |
| 770 | 775 | 780 | |
| | | | |
| Val Ala Phe Gly Phe Gly Cys Glu Tyr Phe Ala Leu Phe Glu Glu Gln | | | |
| 785 | 790 | 795 | 800 |
| Gly Ile Gly Val Gln Trp Asp Asn Leu Phe Glu Ser Pro Val Glu Glu | | | |
| 805 | 810 | 815 | |
| Asp Gly Phe Asn Leu Thr Thr Ser Val Ser Met Met Leu Phe Asp Thr | | | |
| 820 | 825 | 830 | |
| Phe Leu Tyr Gly Val Met Thr Trp Tyr Ile Glu Ala Val Phe Pro Gly | | | |
| 835 | 840 | 845 | |
| | | | |
| Gln Tyr Gly Ile Pro Arg Pro Trp Tyr Phe Pro Cys Thr Lys Ser Tyr | | | |
| 850 | 855 | 860 | |
| Trp Phe Gly Glu Glu Ser Asp Glu Lys Ser His Pro Gly Ser Asn Gln | | | |
| 865 | 870 | 875 | 880 |
| Lys Arg Ile Ser Glu Ile Cys Met Glu Glu Glu Pro Thr His Leu Lys | | | |
| 885 | 890 | 895 | |
| Leu Gly Val Ser Ile Gln Asn Leu Val Lys Val Tyr Arg Asp Gly Met | | | |
| 900 | 905 | 910 | |

Lys Val Ala Val Asp Gly Leu Ala Leu Asn Phe Tyr Glu Gly Gln Ile
 915 920 925
 Thr Ser Phe Leu Gly His Asn Gly Ala Gly Lys Thr Thr Thr Met Ser
 930 935 940
 Ile Leu Thr Gly Leu Phe Pro Pro Thr Ser Gly Thr Ala Tyr Ile Leu
 945 950 955 960
 Gly Lys Asp Ile Arg Ser Glu Met Ser Thr Ile Arg Gln Asn Leu Gly
 965 970 975

 Val Cys Pro Gln His Asn Val Leu Phe Asp Met Leu Thr Val Glu Glu
 980 985 990
 His Ile Trp Phe Tyr Ala Arg Leu Lys Gly Leu Ser Glu Lys His Val
 995 1000 1005
 Lys Ala Glu Met Glu Gln Met Ala Leu Asp Val Gly Leu Pro Ser
 1010 1015 1020
 Ser Lys Leu Lys Ser Lys Thr Ser Gln Leu Ser Gly Gly Met Gln
 1025 1030 1035

 Arg Lys Leu Ser Val Ala Leu Ala Phe Val Gly Gly Ser Lys Val
 1040 1045 1050
 Val Ile Leu Asp Glu Pro Thr Ala Gly Val Asp Pro Tyr Ser Arg
 1055 1060 1065
 Arg Gly Ile Trp Glu Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Gln Gly Arg Thr
 1070 1075 1080
 Ile Ile Leu Ser Thr His His Met Asp Glu Ala Asp Val Leu Gly
 1085 1090 1095

 Asp Arg Ile Ala Ile Ile Ser His Gly Lys Leu Cys Cys Val Gly
 1100 1105 1110
 Ser Ser Leu Phe Leu Lys Asn Gln Leu Gly Thr Gly Tyr Tyr Leu
 1115 1120 1125
 Thr Leu Val Lys Lys Asp Val Glu Ser Ser Leu Ser Ser Cys Arg
 1130 1135 1140
 Asn Ser Ser Ser Thr Val Ser Tyr Leu Lys Lys Glu Asp Ser Val

| | | |
|---|------|------|
| 1145 | 1150 | 1155 |
| Ser Gln Ser Ser Ser Asp Ala Gly Leu Gly Ser Asp His Glu Ser | | |
| 1160 | 1165 | 1170 |
| Asp Thr Leu Thr Ile Asp Val Ser Ala Ile Ser Asn Leu Ile Arg | | |
| 1175 | 1180 | 1185 |
| Lys His Val Ser Glu Ala Arg Leu Val Glu Asp Ile Gly His Glu | | |
| 1190 | 1195 | 1200 |
| Leu Thr Tyr Val Leu Pro Tyr Glu Ala Ala Lys Glu Gly Ala Phe | | |
| 1205 | 1210 | 1215 |
| Val Glu Leu Phe His Glu Ile Asp Asp Arg Leu Ser Asp Leu Gly | | |
| 1220 | 1225 | 1230 |
| Ile Ser Ser Tyr Gly Ile Ser Glu Thr Thr Leu Glu Glu Ile Phe | | |
| 1235 | 1240 | 1245 |
| Leu Lys Val Ala Glu Glu Ser Gly Val Asp Ala Glu Thr Ser Asp | | |
| 1250 | 1255 | 1260 |
| Gly Thr Leu Pro Ala Arg Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gly Asp Lys | | |
| 1265 | 1270 | 1275 |
| Gln Ser Cys Leu Arg Pro Phe Thr Glu Asp Asp Ala Ala Asp Pro | | |
| 1280 | 1285 | 1290 |
| Asn Asp Ser Asp Ile Asp Pro Glu Ser Arg Glu Thr Asp Leu Leu | | |
| 1295 | 1300 | 1305 |
| Ser Gly Met Asp Gly Lys Gly Ser Tyr Gln Val Lys Gly Trp Lys | | |
| 1310 | 1315 | 1320 |
| Leu Thr Gln Gln Gln Phe Val Ala Leu Leu Trp Lys Arg Leu Leu | | |
| 1325 | 1330 | 1335 |
| Ile Ala Arg Arg Ser Arg Lys Gly Phe Phe Ala Gln Ile Val Leu | | |
| 1340 | 1345 | 1350 |
| Pro Ala Val Phe Val Cys Ile Ala Leu Val Phe Ser Leu Ile Val | | |
| 1355 | 1360 | 1365 |
| Pro Pro Phe Gly Lys Tyr Pro Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Met | | |
| 1370 | 1375 | 1380 |

Tyr Asn Glu Gln Tyr Thr Phe Val Ser Asn Asp Ala Pro Glu Asp
1385 1390 1395

Thr Gly Thr Leu Glu Leu Leu Asn Ala Leu Thr Lys Asp Pro Gly
1400 1405 1410

Phe Gly Thr Arg Cys Met Glu Gly Asn Pro Ile Pro Asp Thr Pro
1415 1420 1425

Cys Gln Ala Gly Glu Glu Glu Trp Thr Thr Ala Pro Val Pro Gln
1430 1435 1440

Thr Ile Met Asp Leu Phe Gln Asn Gly Asn Trp Thr Met Gln Asn
1445 1450 1455

Pro Ser Pro Ala Cys Gln Cys Ser Ser Asp Lys Ile Lys Lys Met
1460 1465 1470

Leu Pro Val Cys Pro Pro Gly Ala Gly Gly Leu Pro Pro Pro Gln
1475 1480 1485

Arg Lys Gln Asn Thr Ala Asp Ile Leu Gln Asp Leu Thr Gly Arg
1490 1495 1500

Asn Ile Ser Asp Tyr Leu Val Lys Thr Tyr Val Gln Ile Ile Ala
1505 1510 1515

Lys Ser Leu Lys Asn Lys Ile Trp Val Asn Glu Phe Arg Tyr Gly
1520 1525 1530

Gly Phe Ser Leu Gly Val Ser Asn Thr Gln Ala Leu Pro Pro Ser
1535 1540 1545

Gln Glu Val Asn Asp Ala Xaa Lys Gln Met Lys Lys His Leu Lys
1550 1555 1560

Leu Ala Lys Asp Ser Ser Ala Asp Arg Phe Leu Asn Ser Leu Gly
1565 1570 1575

Arg Phe Met Thr Gly Leu Asp Thr Arg Asn Asn Val Lys Val Trp
1580 1585 1590

Phe Asn Asn Lys Gly Trp His Ala Ile Ser Ser Phe Leu Asn Val
1595 1600 1605

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

| | | |
|-----------------------------|---------------------|-------------|
| 1610 | 1615 | 1620 |
| Pro Ser His Tyr Gly Ile Thr | Ala Phe Asn His Pro | Leu Asn Leu |
| 1625 | 1630 | 1635 |
| Thr Lys Gln Gln Leu Ser Glu | Val Ala Xaa Met Thr | Thr Ser Val |
| 1640 | 1645 | 1650 |
| Asp Val Leu Val Ser Ile Cys | Val Ile Phe Ala Met | Ser Phe Val |
| 1655 | 1660 | 1665 |
| Pro Ala Ser Phe Val Val Phe | Leu Ile Gln Glu Arg | Val Ser Lys |
| 1670 | 1675 | 1680 |
| Ala Lys His Leu Gln Phe Ile | Ser Gly Val Lys Pro | Val Ile Tyr |
| 1685 | 1690 | 1695 |
| Trp Leu Ser Asn Phe Val Trp | Asp Met Cys Asn Tyr | Val Val Pro |
| 1700 | 1705 | 1710 |
| Ala Thr Leu Val Ile Ile Ile | Phe Ile Cys Phe Gln | Gln Lys Ser |
| 1715 | 1720 | 1725 |
| Tyr Val Ser Ser Thr Asn Leu | Pro Val Leu Ala Leu | Leu Leu Leu |
| 1730 | 1735 | 1740 |
| Leu Tyr Gly Trp Ser Ile Thr | Pro Leu Met Tyr Pro | Ala Ser Phe |
| 1745 | 1750 | 1755 |
| Val Phe Lys Ile Pro Ser Thr | Ala Tyr Val Val Leu | Thr Ser Val |
| 1760 | 1765 | 1770 |
| Asn Leu Phe Ile Gly Ile Asn | Gly Ser Val Ala Thr | Phe Val Leu |
| 1775 | 1780 | 1785 |
| Glu Leu Phe Thr Asp Asn Lys | Leu Asn Asn Ile Asn | Asp Ile Leu |
| 1790 | 1795 | 1800 |
| Lys Ser Val Phe Leu Ile Phe | Pro His Phe Cys Leu | Gly Arg Gly |
| 1805 | 1810 | 1815 |
| Leu Ile Asp Met Val Lys Asn | Gln Ala Met Ala Asp | Ala Leu Glu |
| 1820 | 1825 | 1830 |
| Arg Phe Gly Glu Asn Arg Phe | Val Ser Pro Leu Ser | Trp Asp Leu |
| 1835 | 1840 | 1845 |

| | | | |
|---------|---------------------|---------------------|-------------|
| Val Gly | Arg Asn Leu Phe Ala | Met Ala Val Glu Gly | Val Val Phe |
| 1850 | 1855 | 1860 | |
| Phe Leu | Ile Thr Val Leu Ile | Gln Tyr Arg Phe Phe | Ile Arg Pro |
| 1865 | 1870 | 1875 | |
| Arg Pro | Val Asn Ala Lys Leu | Ser Pro Leu Asn Asp | Glu Asp Glu |
| 1880 | 1885 | 1890 | |
| Asp Val | Arg Arg Glu Arg Gln | Arg Ile Leu Asp Gly | Gly Gly Gln |
| 1895 | 1900 | 1905 | |
| Asn Asp | Ile Leu Glu Ile Lys | Glu Leu Thr Lys Ile | Tyr Arg Arg |
| 1910 | 1915 | 1920 | |
| Lys Arg | Lys Pro Ala Val Asp | Arg Ile Cys Val Gly | Ile Pro Pro |
| 1925 | 1930 | 1935 | |
| Gly Glu | Cys Phe Gly Leu Leu | Gly Val Asn Gly Ala | Gly Lys Ser |
| 1940 | 1945 | 1950 | |
| Ser Thr | Phe Lys Met Leu Thr | Gly Asp Thr Thr Val | Thr Arg Gly |
| 1955 | 1960 | 1965 | |
| Asp Ala | Phe Leu Asn Xaa Asn | Ser Ile Leu Ser Asn | Ile His Glu |
| 1970 | 1975 | 1980 | |
| Val His | Gln Asn Met Gly Tyr | Cys Pro Gln Phe Asp | Ala Ile Thr |
| 1985 | 1990 | 1995 | |
| Glu Leu | Leu Thr Gly Arg Glu | His Val Glu Phe Phe | Ala Leu Leu |
| 2000 | 2005 | 2010 | |
| Arg Gly | Val Pro Glu Lys Glu | Val Gly Lys Val Gly | Glu Trp Ala |
| 2015 | 2020 | 2025 | |
| Ile Arg | Lys Leu Gly Leu Val | Lys Tyr Gly Glu Lys | Tyr Ala Gly |
| 2030 | 2035 | 2040 | |
| Asn Tyr | Ser Gly Gly Asn Lys | Arg Lys Leu Ser Thr | Ala Met Ala |
| 2045 | 2050 | 2055 | |
| Leu Ile | Gly Gly Pro Pro Val | Val Phe Leu Asp Glu | Pro Thr Thr |
| 2060 | 2065 | 2070 | |
| Gly Met | Asp Pro Lys Ala Arg | Arg Phe Leu Trp Asn | Cys Ala Leu |

2075 2080 2085
 Ser Val Val Lys Glu Gly Arg Ser Val Val Leu Thr Ser His Ser
 2090 2095 2100
 Met Glu Glu Cys Glu Ala Leu Cys Thr Arg Met Ala Ile Met Val
 2105 2110 2115

Asn Gly Arg Phe Arg Cys Leu Gly Ser Val Gln His Leu Lys Asn
 2120 2125 2130
 Arg Phe Gly Asp Gly Tyr Thr Ile Val Val Arg Ile Ala Gly Ser
 2135 2140 2145
 Asn Pro Asp Leu Lys Pro Val Gln Asp Phe Phe Gly Leu Ala Phe
 2150 2155 2160
 Pro Gly Ser Val Xaa Lys Glu Lys His Arg Asn Met Leu Gln Tyr
 2165 2170 2175

Gln Leu Pro Ser Ser Leu Ser Ser Leu Ala Arg Ile Phe Ser Ile
 2180 2185 2190
 Leu Ser Gln Ser Lys Lys Arg Leu His Ile Glu Asp Tyr Ser Val
 2195 2200 2205
 Ser Gln Thr Thr Leu Asp Gln Val Phe Val Asn Phe Ala Lys Asp
 2210 2215 2220
 Gln Ser Asp Asp Asp His Leu Lys Asp Leu Ser Leu His Lys Asn
 2225 2230 2235

Gln Thr Val Val Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Phe Leu Gln Asp
 2240 2245 2250
 Glu Lys Val Lys Glu Ser Tyr Val
 2255 2260

<210> 4

<211> 2946

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gctttataaa ggggagtttc cctgcacaag ctctctctct tgtctgccgc catgtgagac 60

atgcctttca ccttcgcca tgatcatgag gcttccccag ccacatggaa ctaatgccag 120

| | |
|---|------|
| cagttactct gcagagatga cggagcccaa gtcggtgtgt gtctcggtgg atgaggtggt | 180 |
| gtccagcaac atggaggcca ctgagacgga cctgctgaat ggacatctga aaaaagtaga | 240 |
| taataacctc acggaagccc agcgtttctc ctcccttgct cggagggcag ctgtgaacat | 300 |
| tgaattcagg gacctttcct attcggttcc tgaaggaccc tggaggagga agaaaggata | 360 |
| caagacctc ctgaaaggaa ttcccgga gttcaatagt ggtgagttgg tggccattat | 420 |
| gggtccttcc ggggcccga agtcacgct gatgaacatc ctggctggat acaggagagac | 480 |
| gggcatgaag ggggccgtcc tcatcaacgg cctgccccgg gacctgcgct gcttccgga | 540 |
| ggtgtcctgc tacatcatgc aggatgacat gctgctgcc catctcactg tgcaggaggc | 600 |
| catgatggtg tcggcacatc tgaagcttca ggagaaggat gaaggcagaa gggaaatggt | 660 |
| caaggagata ctgacagcgc tgggttgct gtcttgccc aacacgcgga ccgggagcct | 720 |
| gtcaggtggt cagcgcaagc gcctggccat cgcgtggag ctggtgaaca accctccagt | 780 |
| catgtttctc gatgagccca ccagcggcct ggacagcgc tctgtctcc aggtggtctc | 840 |
| gctgatgaaa gggctcgtc aagggggtcg ctccatcatt tgcacatcc accagcccag | 900 |
| cgccaaactc ttcgagctgt tcgaccagct ttacgtctg agtcaaggac aatgtgtgta | 960 |
| ccggggaaaa gtctgcaatc ttgtccata ttgagggat ttgggtctga actgccaac | 1020 |
| ctaccacaac ccagcagatt ttgtcatgga ggttgcatcc ggcgagtacg gtgatcagaa | 1080 |
| cagtcggctg gtgagagcgg ttcgggaggg catgtgtgac tcagaccaca agagagacct | 1140 |
| cgggggtgat gccgaggtga acccttttct ttggcaccgg ccctctgaag aggactcctc | 1200 |
| gtccatggaa ggtgccaca gcttctctgc cagctgcctc acgcagttct gcatcctctt | 1260 |
| caagaggacc ttctcagca tcatgaggga ctcggtcctg acacacctgc gcatcacctc | 1320 |
| gcacattggg atcggcctcc tcatggcct gctgtacttg gggatcgga acgaagccaa | 1380 |
| gaaggcttg agcaactccg gcttctctt cttctcatg ctgttctca tgttcgggc | 1440 |
| cctcatgcct actgttctga cattccccct ggagatggga gtctttctc gggaacacct | 1500 |
| gaactactgg tacagctga aggcctacta cctggccaag accatggcag acgtgccctt | 1560 |
| tcagatcatg ttcccagtg cctactgcag catcgtgtac tggatgacgt cgcagccgtc | 1620 |
| cgacccgtg cgctttgtgc tgtttgccg gctgggcacc atgacctccc tggtgccaca | 1680 |
| gtccctggg ctgctgatc gagccgctc cagtcctcg caggtggcca ctttcgtggg | 1740 |
| cccagtgaca gccatcccg tgcctctgt ctcggggttc ttcgtcagct tcgacacat | 1800 |
| ccccacgtac ctacagtga tgcctacat ctctatgtc aggtatgggt tcgaagggt | 1860 |

catcctctcc atctatggct tagaccggga agatctgcac tgtgacatcg acgagacgtg 1920

ccacttccag aagtcggagg ccatctgcg ggagctggac gtgaaaaatg ccaagctgta 1980

cctggacttc atcgactcgg ggattttctt catctccctc cgctcattg cctattttgt 2040

cctcaggtac aaaatccggg cagagaggta aaacacctga atgccaggaa acaggaagat 2100

tagacactgt ggccgagggc acgtctagaa tcgaggaggc aagcctgtgc ccgaccgacg 2160

acacagagac tcttctgac caacccttag aaccgcgttg ggtttgtggg tgtctcgtgc 2220

tcagccactc tgcccagctg ggttggatct tctctccatt cccctttcta gctttaacta 2280

ggaagatgta ggcagattgg tggttttttt tttttaaca tacagaattt taaataccac 2340

aactggggca gaatttaaag ctgcaacaca gctggtgatg agaggcttcc tcagtccagt 2400

cgctccttag caccaggcac cgtgggtcct ggatggggaa ctgcaagcag cctctcagct 2460

gatggctgca cagtcagatg tctggtggca gagagtccga gcatggagcg attccatitt 2520

atgactgttg tttttcacat tttcatcttt ctaaggtgtg tctcttttcc aatgagaagt 2580

catttttgca agccaaaagt cgatcaatcg cattcatitt aagaaattat accttttttag 2640

tacttctgta agaatgattc aggttaaacc acatactttg ttttagagagg cgaggggttt 2700

aaccgagtca cccagctggt ctcatacata gacagcactt gtgaaggatt gaatgcaggt 2760

tccaggtgga ggaagacgt ggacaccatc tccactgagc catgcagaca tttttaaaag 2820

ctatacaaaa aattgtgaga agacattggc caactctttc aaagtctttc tttttccacg 2880

tgcttcttat ttttaagcga atatattgtt tgtttcttcc taaaaaaaa aaaaaaaaaa 2940

aaaaaa 2946

<210> 5

<211> 678

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Cys Leu Met Ala Ala Phe Ser Val Gly Thr Ala Met Asn Ala

1 5 10 15

Ser Ser Tyr Ser Ala Glu Met Thr Glu Pro Lys Ser Val Cys Val Ser

20 25 30

Val Asp Glu Val Val Ser Ser Asn Met Glu Ala Thr Glu Thr Asp Leu

35 40 45

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

50 55 60
 Arg Phe Ser Ser Leu Pro Arg Arg Ala Ala Val Asn Ile Glu Phe Arg
 65 70 75 80
 Asp Leu Ser Tyr Ser Val Pro Glu Gly Pro Trp Trp Arg Lys Lys Gly

 85 90 95
 Tyr Lys Thr Leu Leu Lys Gly Ile Ser Gly Lys Phe Asn Ser Gly Glu
 100 105 110
 Leu Val Ala Ile Met Gly Pro Ser Gly Ala Gly Lys Ser Thr Leu Met
 115 120 125
 Asn Ile Leu Ala Gly Tyr Arg Glu Thr Gly Met Lys Gly Ala Val Leu
 130 135 140
 Ile Asn Gly Leu Pro Arg Asp Leu Arg Cys Phe Arg Lys Val Ser Cys

 145 150 155 160
 Tyr Ile Met Gln Asp Asp Met Leu Leu Pro His Leu Thr Val Gln Glu
 165 170 175
 Ala Met Met Val Ser Ala His Leu Lys Leu Gln Glu Lys Asp Glu Gly
 180 185 190
 Arg Arg Glu Met Val Lys Glu Ile Leu Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ser
 195 200 205
 Cys Ala Asn Thr Arg Thr Gly Ser Leu Ser Gly Gly Gln Arg Lys Arg

 210 215 220
 Leu Ala Ile Ala Leu Glu Leu Val Asn Asn Pro Pro Val Met Phe Phe
 225 230 235 240
 Asp Glu Pro Thr Ser Gly Leu Asp Ser Ala Ser Cys Phe Gln Val Val
 245 250 255
 Ser Leu Met Lys Gly Leu Ala Gln Gly Gly Arg Ser Ile Ile Cys Thr
 260 265 270
 Ile His Gln Pro Ser Ala Lys Leu Phe Glu Leu Phe Asp Gln Leu Tyr

 275 280 285
 Val Leu Ser Gln Gly Gln Cys Val Tyr Arg Gly Lys Val Cys Asn Leu
 290 295 300

Val Pro Tyr Leu Arg Asp Leu Gly Leu Asn Cys Pro Thr Tyr His Asn
305 310 315 320
Pro Ala Asp Phe Val Met Glu Val Ala Ser Gly Glu Tyr Gly Asp Gln
325 330 335
Asn Ser Arg Leu Val Arg Ala Val Arg Glu Gly Met Cys Asp Ser Asp
340 345 350
His Lys Arg Asp Leu Gly Gly Asp Ala Glu Val Asn Pro Phe Leu Trp
355 360 365
His Arg Pro Ser Glu Glu Val Lys Gln Thr Lys Arg Leu Lys Gly Leu
370 375 380
Arg Lys Asp Ser Ser Ser Met Glu Gly Cys His Ser Phe Ser Ala Ser
385 390 395 400
Cys Leu Thr Gln Phe Cys Ile Leu Phe Lys Arg Thr Phe Leu Ser Ile
405 410 415
Met Arg Asp Ser Val Leu Thr His Leu Arg Ile Thr Ser His Ile Gly
420 425 430
Ile Gly Leu Leu Ile Gly Leu Leu Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Glu Ala
435 440 445
Lys Lys Val Leu Ser Asn Ser Gly Phe Leu Phe Phe Ser Met Leu Phe
450 455 460
Leu Met Phe Ala Ala Leu Met Pro Thr Val Leu Thr Phe Pro Leu Glu
465 470 475 480
Met Gly Val Phe Leu Arg Glu His Leu Asn Tyr Trp Tyr Ser Leu Lys
485 490 495
Ala Tyr Tyr Leu Ala Lys Thr Met Ala Asp Val Pro Phe Gln Ile Met
500 505 510
Phe Pro Val Ala Tyr Cys Ser Ile Val Tyr Trp Met Thr Ser Gln Pro
515 520 525
Ser Asp Ala Val Arg Phe Val Leu Phe Ala Ala Leu Gly Thr Met Thr
530 535 540
Ser Leu Val Ala Gln Ser Leu Gly Leu Leu Ile Gly Ala Ala Ser Thr

545 550 555 560
 Ser Leu Gln Val Ala Thr Phe Val Gly Pro Val Thr Ala Ile Pro Val
 565 570 575
 Leu Leu Phe Ser Gly Phe Phe Val Ser Phe Asp Thr Ile Pro Thr Tyr
 580 585 590
 Leu Gln Trp Met Ser Tyr Ile Ser Tyr Val Arg Tyr Gly Phe Glu Gly

 595 600 605
 Val Ile Leu Ser Ile Tyr Gly Leu Asp Arg Glu Asp Leu His Cys Asp
 610 615 620
 Ile Asp Glu Thr Cys His Phe Gln Lys Ser Glu Ala Ile Leu Arg Glu
 625 630 635 640
 Leu Asp Val Glu Asn Ala Lys Leu Tyr Leu Asp Phe Ile Val Leu Gly
 645 650 655
 Ile Phe Phe Ile Ser Leu Arg Leu Ile Ala Tyr Phe Val Leu Arg Tyr

 660 665 670
 Lys Ile Arg Ala Glu Arg

675

<210> 6

<211> 4262

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

| | |
|--|-----|
| agtttccgag gaacttttcg ccggcgccgg gccgcctctg aggccagggc aggacacgaa | 60 |
| cgcgccggagc ggcgggcgcg actgagagcc ggggccgcgg cggcgctccc taggaagggc | 120 |
| cgtacgaggc ggcgggcccc gcgggcctcc cggaggaggc ggctgcgcca tggacgagcc | 180 |
| acccttcagc gagcggtt tggagcagc gctgggcgag ccgtgcgac tggacgcggc | 240 |
| gctgctgacc gacatcgaag gtgaagtcgg cgcggggagg ggtagggcca acggcctgga | 300 |
| | |
| cgccccaagg gcgggcgag atcgcgagc catggattgc actttcgaag acatgettca | 360 |
| gcttatcaac aaccaagaca gtgacttccc tggcctatit gaccacacct atgctgggag | 420 |
| tggggcaggg ggcacagacc ctgccagccc cgataccagc tccccaggca gcttgtctcc | 480 |
| acctctgcc acattgagct cctctcttga agccttctg agcgggccc aggcagcgcc | 540 |
| ctcaccctg tcccctccc agcctgcacc cactccattg aagatgtacc cgtccatgcc | 600 |

cgctttctcc cctgggcctg gtatcaagga agagtcagtg cactgagca tctgcagac 660
 cccacccca cagccccctgc caggggcctt cctgccacag agcttcccag cccagcccc 720

accgcagttc agctccacce ctgtgttagg ctaccccagc cctccgggag gcttctctac 780
 aggaagccct cccgggaaca cccagcagcc gctgcctggc ctgccactgg cttccccgcc 840
 aggggtcccc cccgtctcct tgcacacca ggtccagagt gtgggtcccc agcagctact 900
 gacagtcaca gctgccccca cggcagcccc tgtaacgacc actgtgacct cgcagatcca 960
 gcagggtccc gtctgtctgc agccccactt catcaaggca gactcgctgc ttctgacagc 1020
 catgaagaca gacggagcca ctgtgaaggc ggcaggtctc agtcccctgg tctctggcac 1080
 cactgtgcag acagggcctt tgccgaccct ggtgagtggc ggaaccatct tggcaacagt 1140

cccactggtc gtagatgcgg agaagctgcc tatcagccgg ctgcagctg gcagcaaggc 1200
 cccggcctct gccagagcc gtggagagaa gcgcacagcc cacaacgcca ttgagaagcg 1260
 ctaccgctcc tccatcaatg acaaaatcat tgagctcaag gatctggtgg tgggactga 1320
 ggcaaagctg aataaatctg ctgtcttgcg caaggccatc gactacattc gctttctgca 1380
 acacagcaac cagaaaacta agcaggagaa cctaagtctg cgactgctg tccacaaaag 1440
 caaatctctg aaggatctgg tgtcgccctg tggcagtggg gggaacacag acgtgctcat 1500
 ggagggcgtg aagactgagg tggaggacac actgaccca ccccctcgg atgctggctc 1560

acctttccag agcagccctt tgtcccttgg cagcaggggc agtggcagcg gtggcagtgg 1620
 cagtactcg gacctgaca gccagctctt tgaggacagc aaggcaaagc cagagcagcg 1680
 gccgtctctg cacagccggg gcatgctgga ccgctcccgc ctggccctgt gcacgctcgt 1740
 ctctctctgc ctgtctgca accccttggc ctcttctctg ggggcccggg ggcttcccag 1800
 cccctcagat accaccagc tctaccatag ccctgggcgc aacgtgctgg gcaccgagag 1860
 cagagatggc cctggctggg cccagtggct gctgccccca gtggtctggc tgctcaatgg 1920
 gctgttgggt ctctctcct tgggtcttct ctttgtctac ggtgagccag tcacacggcc 1980

cactcaggc cccgccgtgt acttctggag gcatcgcaag caggtgacc tggacctggc 2040
 ccggggagac ttgtcccagg ctgccagca gctgtggctg gccctgcggg cactgggccg 2100
 gccctgccc acctcccacc tggacctggc ttgtagctc ctctggaacc tcatccgtca 2160
 cctgtgcag cgtctctggg tgggccgtg gctggcagc cgggcagggg gcctgcagca 2220
 ggactgtgct ctgcagtggt atgctagcgc cagcgccga gacgcagccc tggcttacca 2280
 taagctgcac cagctgcaca ccatggggaa gcacacaggc gggcacctca ctgccacaa 2340

cctggcgctg agtgcctga acctggcaga gtgtgcaggg gatgccgtgt ctgtggcgac 2400

gctggccgag atctatgtgg cggctgcatt gagagtgaag accagtctcc cacgggcctt 2460

gcattttctg acacgcttct tcctgagcag tgcgccag gcctgcctgg cacagagtgg 2520

ctcagtgcct ccigccatgc agtggctctg ccaccccggtg ggccaccgtt tcttcgtgga 2580

tggggactgg tccgtgctca gtaccccatg ggagagcctg tacagcttgg ccgggaaccc 2640

agtggacccc ctggcccagg tgactcagct attccgggaa catctcttag agcgagcact 2700

gaactgtgtg acccagccca accccagccc tgggtcagct gatggggaca aggaattctt 2760

ggatgccctc gggtaacctgc agctgctgaa cagctgttct gatgctgcgg gggtcctgc 2820

ctacagcttc tccatcagtt ccagcatggc caccaccacc ggctagacc cggtagccaa 2880

gtggtgggcc tctctgacag ctgtggtgat cactggctg cggcgggatg aggagcggc 2940

tgagcggctg tgcctgtgg tggagcact gccccgggtg ctgcaggagt ctgagagacc 3000

cctgcccagg gcagctctgc actccttcaa ggctgcccgg gccctgctgg gctgtgcaa 3060

ggcagagtct ggtccagcca gcctgacat ctgtgagaag gccagtgggt acctgcagga 3120

cagcctggct accacaccag ccagcagctc cattgacaag gccgtgcagc tgttctgtg 3180

tgacctgctt ctgtgtgtgc gcaccagcct gtggcggcag cagcagcccc cggccccggc 3240

cccagcagcc cagggcacca gcagcaggcc ccaggcttcc gcccttgagc tgcgtggctt 3300

ccaacgggac ctgagcagcc tgaggcggct ggcacagagc ttccggcccg ccatgcggag 3360

ggtgttctca catgaggcca cggccccgct gatggcgggg gccagccca cacggacaca 3420

ccagctcttc gaccgcagtc tgaggcggcg ggcaggcccc ggtggcaaag gaggcgggt 3480

ggcggagctg gagccgcggc ccacgcggcg ggagcacgag gaggccttgc tgctggcctc 3540

ctgctacctg cccccggct tctgtcggc gcccgggcag cgcgtgggca tgctggctga 3600

ggcggcgcgc aactcagaga agcttggcga tcgccggctg ctgcacgact gtcagcagat 3660

gctcatgcgc ctggcggtg ggaccactgt cacttcagc tagaccccggt gtccccggcc 3720

tcagacccc tgtctctagc cactttggtc ccgtgcagct tctgtctgc gtcaagctt 3780

tgaaggcca aggccagtga agagactctg gcctccacag ttccacctgc ggctgtgtg 3840

tgcttctcgc gtggaaggcc cgaggggcgc gatcttgacc ctaagaccgg cggccatgat 3900

ggtgtgaccc tctggtggcc gatcggggca ctgcaggggc cgagccattt tggggggccc 3960

ccctccttgc tctgcaggca ccttagtggc tttttctc ctgtgtacag ggaagagagg 4020

ggtacatttc cctgtgtga cggaagccaa ctgggtttc ccgactgca agcagggtc 4080

tgccccagag gcctctctct cgcgcgtggg agagagacgt gtacatagtg taggtcagcg 4140
 tgcttagcct cctgacctga ggctcctgtg ctactttgcc ttttgcaaac tttattttca 4200
 tagattgaga agttttgtac agagaattaa aatgaaatt atttataaaa aaaaaaaaaa 4260
 aa 4262

<210> 7

<211> 1147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Asp Glu Pro Pro Phe Ser Glu Ala Ala Leu Glu Gln Ala Leu Gly

1 5 10 15

Glu Pro Cys Asp Leu Asp Ala Ala Leu Leu Thr Asp Ile Glu Asp Met

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Tyr Ala Gly Ser Gly Ala Gly Gly Thr Asp Pro Ala Ser Pro

50 55 60

Asp Thr Ser Ser Pro Gly Ser Leu Ser Pro Pro Pro Ala Thr Leu Ser

65 70 75 80

Ser Ser Leu Glu Ala Phe Leu Ser Gly Pro Gln Ala Ala Pro Ser Pro

85 90 95

Leu Ser Pro Pro Gln Pro Ala Pro Thr Pro Leu Lys Met Tyr Pro Ser

100 105 110

Met Pro Ala Phe Ser Pro Gly Pro Gly Ile Lys Glu Glu Ser Val Pro

115 120 125

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

130 135 140

Leu Pro Gln Ser Phe Pro Ala Pro Ala Pro Pro Gln Phe Ser Ser Thr

145 150 155 160

Pro Val Leu Gly Tyr Pro Ser Pro Pro Gly Gly Phe Ser Thr Gly Ser

165 170 175

Pro Pro Gly Asn Thr Gln Gln Pro Leu Pro Gly Leu Pro Leu Ala Ser

180 185 190
 Pro Pro Gly Val Pro Pro Val Ser Leu His Thr Gln Val Gln Ser Val
 195 200 205
 Val Pro Gln Gln Leu Leu Thr Val Thr Ala Ala Pro Thr Ala Ala Pro

 210 215 220
 Val Thr Thr Thr Val Thr Ser Gln Ile Gln Gln Val Pro Val Leu Leu
 225 230 235 240
 Gln Pro His Phe Ile Lys Ala Asp Ser Leu Leu Leu Thr Ala Met Lys
 245 250 255
 Thr Asp Gly Ala Thr Val Lys Ala Ala Gly Leu Ser Pro Leu Val Ser
 260 265 270
 Gly Thr Thr Val Gln Thr Gly Pro Leu Pro Thr Leu Val Ser Gly Gly

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

 340 345 350
 Thr Glu Ala Lys Leu Asn Lys Ser Ala Val Leu Arg Lys Ala Ile Asp
 355 360 365
 Tyr Ile Arg Phe Leu Gln His Ser Asn Gln Lys Leu Lys Gln Glu Asn
 370 375 380
 Leu Ser Leu Arg Thr Ala Val His Lys Ser Lys Ser Leu Lys Asp Leu
 385 390 395 400
 Val Ser Ala Cys Gly Ser Gly Gly Asn Thr Asp Val Leu Met Glu Gly

 405 410 415
 Val Lys Thr Glu Val Glu Asp Thr Leu Thr Pro Pro Pro Ser Asp Ala
 420 425 430

Gly Ser Pro Phe Gln Ser Ser Pro Leu Ser Leu Gly Ser Arg Gly Ser
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ser Glu Pro Asp Ser Pro Val Phe
450 455 460

Glu Asp Ser Lys Ala Lys Pro Glu Gln Arg Pro Ser Leu His Ser Arg
465 470 475 480

Gly Met Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu Cys Thr Leu Val Phe Leu
485 490 495

Cys Leu Ser Cys Asn Pro Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Arg Gly Leu
500 505 510

Pro Ser Pro Ser Asp Thr Thr Ser Val Tyr His Ser Pro Gly Arg Asn
515 520 525

Val Leu Gly Thr Glu Ser Arg Asp Gly Pro Gly Trp Ala Gln Trp Leu
530 535 540

Leu Pro Pro Val Val Trp Leu Leu Asn Gly Leu Leu Val Leu Val Ser
545 550 555 560

Leu Val Leu Leu Phe Val Tyr Gly Glu Pro Val Thr Arg Pro His Ser
565 570 575

Gly Pro Ala Val Tyr Phe Trp Arg His Arg Lys Gln Ala Asp Leu Asp
580 585 590

Leu Ala Arg Gly Asp Phe Ala Gln Ala Ala Gln Gln Leu Trp Leu Ala
595 600 605

Leu Arg Ala Leu Gly Arg Pro Leu Pro Thr Ser His Leu Asp Leu Ala
610 615 620

Cys Ser Leu Leu Trp Asn Leu Ile Arg His Leu Leu Gln Arg Leu Trp
625 630 635 640

Val Gly Arg Trp Leu Ala Gly Arg Ala Gly Gly Leu Gln Gln Asp Cys
645 650 655

Ala Leu Arg Val Asp Ala Ser Ala Ser Ala Arg Asp Ala Ala Leu Val
660 665 670

Tyr His Lys Leu His Gln Leu His Thr Met Gly Lys His Thr Gly Gly

675 680 685
 His Leu Thr Ala Thr Asn Leu Ala Leu Ser Ala Leu Asn Leu Ala Glu
 690 695 700
 Cys Ala Gly Asp Ala Val Ser Val Ala Thr Leu Ala Glu Ile Tyr Val
 705 710 715 720
 Ala Ala Ala Leu Arg Val Lys Thr Ser Leu Pro Arg Ala Leu His Phe

 725 730 735
 Leu Thr Arg Phe Phe Leu Ser Ser Ala Arg Gln Ala Cys Leu Ala Gln
 740 745 750
 Ser Gly Ser Val Pro Pro Ala Met Gln Trp Leu Cys His Pro Val Gly
 755 760 765
 His Arg Phe Phe Val Asp Gly Asp Trp Ser Val Leu Ser Thr Pro Trp
 770 775 780
 Glu Ser Leu Tyr Ser Leu Ala Gly Asn Pro Val Asp Pro Leu Ala Gln

 785 790 795 800
 Val Thr Gln Leu Phe Arg Glu His Leu Leu Glu Arg Ala Leu Asn Cys
 805 810 815
 Val Thr Gln Pro Asn Pro Ser Pro Gly Ser Ala Asp Gly Asp Lys Glu
 820 825 830
 Phe Ser Asp Ala Leu Gly Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Ser Cys Ser Asp
 835 840 845
 Ala Ala Gly Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Ser Ser Met Ala

 850 855 860
 Thr Thr Thr Gly Val Asp Pro Val Ala Lys Trp Trp Ala Ser Leu Thr
 865 870 875 880
 Ala Val Val Ile His Trp Leu Arg Arg Asp Glu Glu Ala Ala Glu Arg
 885 890 895
 Leu Cys Pro Leu Val Glu His Leu Pro Arg Val Leu Gln Glu Ser Glu
 900 905 910
 Arg Pro Leu Pro Arg Ala Ala Leu His Ser Phe Lys Ala Ala Arg Ala

 915 920 925

Leu Leu Gly Cys Ala Lys Ala Glu Ser Gly Pro Ala Ser Leu Thr Ile
 930 935 940
 Cys Glu Lys Ala Ser Gly Tyr Leu Gln Asp Ser Leu Ala Thr Thr Pro
 945 950 955 960
 Ala Ser Ser Ser Ile Asp Lys Ala Val Gln Leu Phe Leu Cys Asp Leu
 965 970 975
 Leu Leu Val Val Arg Thr Ser Leu Trp Arg Gln Gln Gln Pro Pro Ala
 980 985 990
 Pro Ala Pro Ala Ala Gln Gly Thr Ser Ser Arg Pro Gln Ala Ser Ala
 995 1000 1005
 Leu Glu Leu Arg Gly Phe Gln Arg Asp Leu Ser Ser Leu Arg Arg
 1010 1015 1020
 Leu Ala Gln Ser Phe Arg Pro Ala Met Arg Arg Val Phe Leu His
 1025 1030 1035
 Glu Ala Thr Ala Arg Leu Met Ala Gly Ala Ser Pro Thr Arg Thr
 1040 1045 1050
 His Gln Leu Leu Asp Arg Ser Leu Arg Arg Arg Ala Gly Pro Gly
 1055 1060 1065
 Gly Lys Gly Gly Ala Val Ala Glu Leu Glu Pro Arg Pro Thr Arg
 1070 1075 1080
 Arg Glu His Ala Glu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Cys Tyr Leu Pro
 1085 1090 1095
 Pro Gly Phe Leu Ser Ala Pro Gly Gln Arg Val Gly Met Leu Ala
 1100 1105 1110
 Glu Ala Ala Arg Thr Leu Glu Lys Leu Gly Asp Arg Arg Leu Leu
 1115 1120 1125
 His Asp Cys Gln Gln Met Leu Met Arg Leu Gly Gly Gly Thr Thr
 1130 1135 1140
 Val Thr Ser Ser
 1145