

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7046381号

(P7046381)

(45)発行日 令和4年4月4日(2022.4.4)

(24)登録日 令和4年3月25日(2022.3.25)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/727(2006.01) A 6 1 K 31/727
 A 6 1 K 31/702(2006.01) A 6 1 K 31/702
 A 6 1 K 31/7016(2006.01) A 6 1 K 31/7016
 A 6 1 K 31/7024(2006.01) A 6 1 K 31/7024
 A 6 1 K 31/7028(2006.01) A 6 1 K 31/7028

請求項の数 15 (全61頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-513787(P2019-513787)

(86)(22)出願日 平成29年9月20日(2017.9.20)

(65)公表番号 特表2019-529402(P2019-529402
A)

(43)公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/073747

(87)国際公開番号 WO2018/054959

(87)国際公開日 平成30年3月29日(2018.3.29)

審査請求日 令和2年9月17日(2020.9.17)

(31)優先権主張番号 PA201670733

(32)優先日 平成28年9月20日(2016.9.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関
デンマーク(DK)

早期審査対象出願

(73)特許権者 509168656

オーフス ウニベルシテット

デンマーク国, デーコー - 8 0 0 0 オ
ーフス セー, ノルドレ リングガーデ 1

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 グスタフセン, カミラ

デンマーク国, 8 0 0 0 オルフス シー
, ランゲランズガデ 1 9

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リポタンパク質代謝障害の治療のための化合物

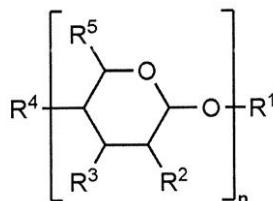
(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験体におけるリポタンパク質代謝の障害の治療での使用のための

式(I):

【化1】



(I)

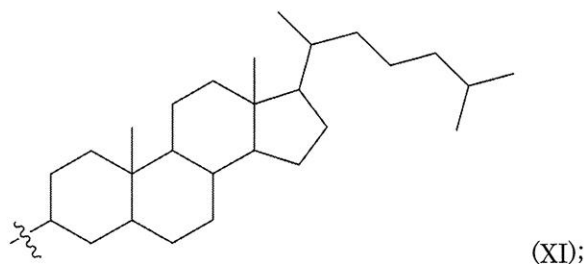
の一般構造を有する化合物、またはその医薬的に許容可能な塩、溶媒和物、多型、もしくは
 は互変異性体を含む組成物であって、

ここで、

- R¹は

a) 式(XI):

【化 2】

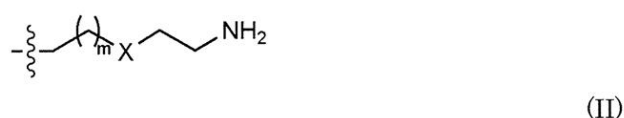


10

または

b) 式 (II) :

【化 3】



20

(ここで X は SO_2 であり、m は独立して 1 以上の整数である)、
から選択される式を有する基を含み、

- 各 R^2 は独立して $-\text{OSO}_3-$ 、および $-\text{NH}\text{SO}_3-$ からなる群から選択され、
- 各 R^3 は独立して $-\text{OSO}_3-$ 、および $-\text{OH}$ からなる群から選択され、
- 各 R^4 は独立して $-\text{OSO}_3-$ 、および $-\text{OH}$ からなる群から選択され、
- 各 R^5 は独立して $-\text{CH}_2\text{OSO}_3-$ 、および $-\text{COO}-$ からなる群から選択され、
- n は 3 ~ 10 の整数であり、

ここで前記リポタンパク質代謝の障害は糖尿病、肥満、メタボリック症候群、黄色腫、高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、脂質異常症、高トリグリセリド血症、高脂血症、シトステロール血症、高血圧、狭心症、急性冠状動脈症候群、冠状動脈性心臓病、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管炎症および敗血症からなる群から選択される、
組成物。

30

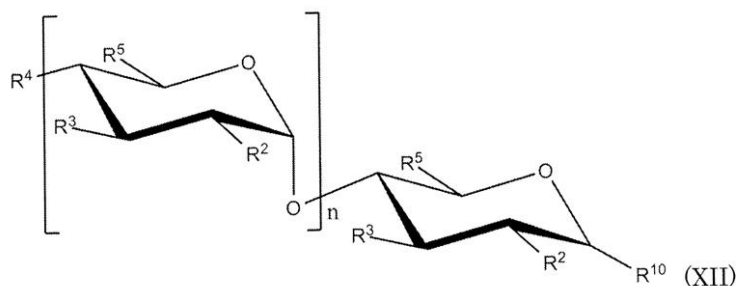
【請求項 2】

R^2 、 R^3 、 R^4 が $-\text{OSO}_3-$ であり、 R^5 が $-\text{CH}_2\text{OSO}_3-$ である、請求項 1 に記載の使用のための組成物。

【請求項 3】

前記化合物が一般構造式 (XII) :

【化 4】



40

を有し、ここで R^{10} が $-\text{O}-\text{R}^1$ であり、かつ n が 2 ~ 9 の整数である、請求項 1 また

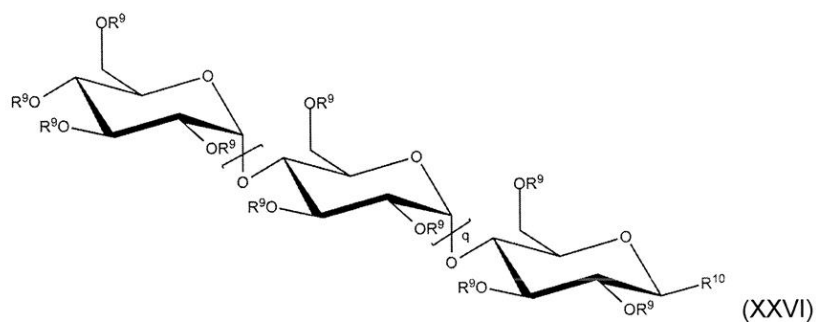
50

は請求項 2 に記載の使用のための組成物。

【請求項 4】

前記化合物が一般構造式 (XXVI) :

【化 5】



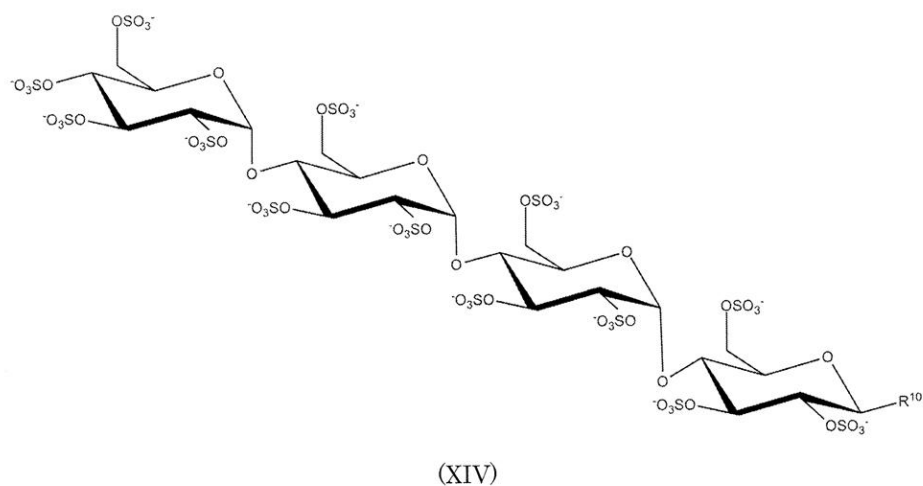
10

を有し、ここで q が 1 ~ 8 の整数であり、 R^9 は $-SO_3^-$ であり、かつ R^{10} は $-O-R^1$ である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

前記化合物が一般構造式 (XIV) :

【化 6】



20

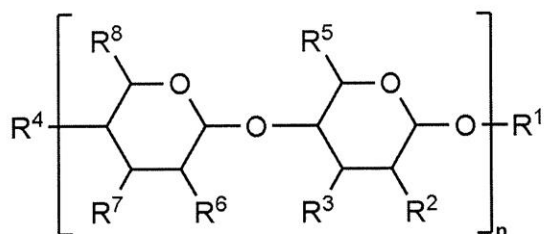
30

を有し、ここで R^{10} が $-O-R^1$ である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

前記化合物が一般構造 (III) :

【化 7】



40

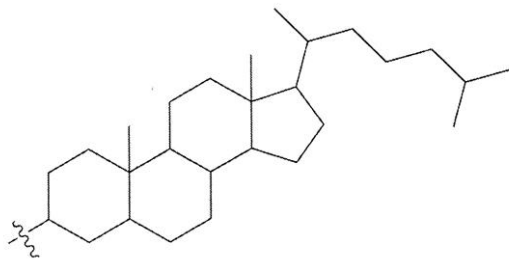
50

を有し、ここで、

- R¹ は

a) 式 (XI) :

【化 8】



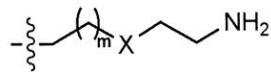
(XI);

10

または

b) 式 (II) :

【化 9】



(II)

20

(ここで X は SO₂ であり、m は独立して 1 以上の整数である)、

から選択される式を有する基を含み、

- R² は -OSO₃- であり、

- R³ は独立して -OSO₃-、および -OH からなる群から選択され、

- R⁵ は独立して -CH₂OSO₃-、および -COO- からなる群から選択され、

- 各 R⁴ は独立して -OSO₃-、および -OH からなる群から選択され、

- R⁶ は独立して -OSO₃-、および -NHOSO₃- からなる群から選択され、

- R⁷ は独立して -OSO₃-、および -OH からなる群から選択され、

- R⁸ は独立して -CH₂OSO₃- であり、

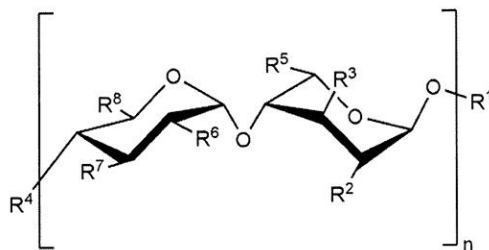
- n は 2 ~ 5 の整数である、

請求項 1 に記載の使用のための組成物。

【請求項 7】

前記化合物が一般構造 (IV) :

【化 10】



(IV).

40

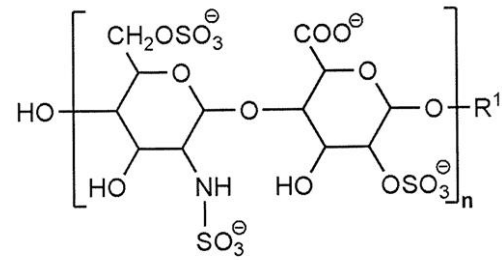
を有する、請求項 1 または請求項 6 に記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

50

前記化合物が一般構造 (V) :

【化 1 1】



10

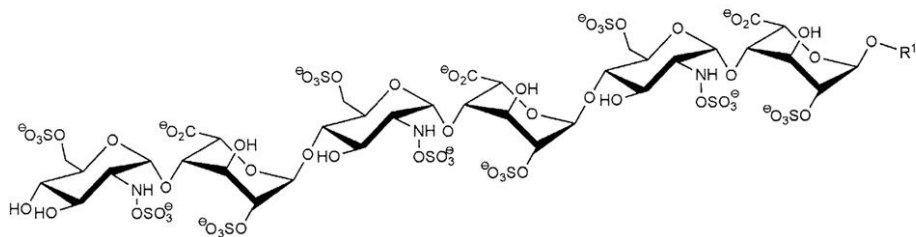
(V).

を有する、請求項 1 または請求項 6 に記載の使用のための組成物。

【請求項 9】

前記化合物が一般構造 (V I I) :

【化 1 2】



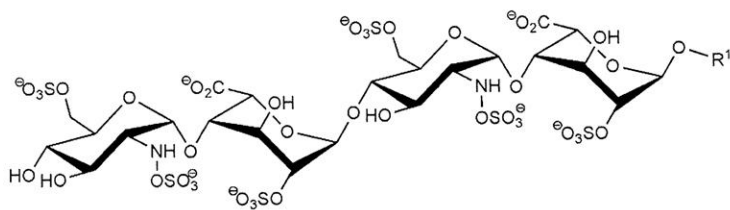
20

(VII)

を有する、または

前記化合物が一般構造 (V I I I) :

【化 1 3】



(VIII)

30

を有する、請求項 1 または請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

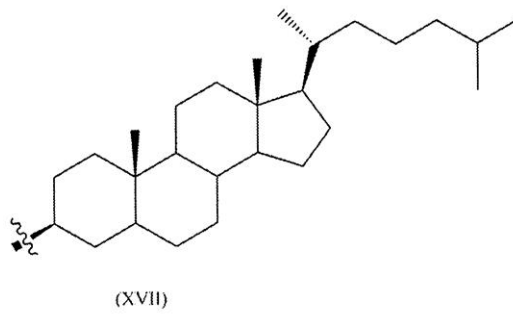
【請求項 10】

R¹ が式 (X V I I) :

40

50

【化 1 4】



10

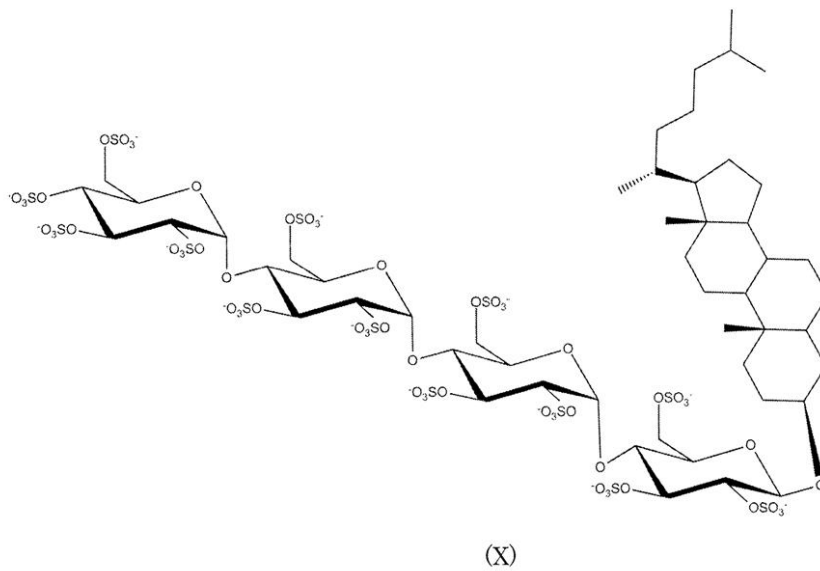
の基を含む、または前記基からなる、請求項 1 に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 1】

前記化合物が

(1) . 式 (X) の化合物である、

【化 1 5】

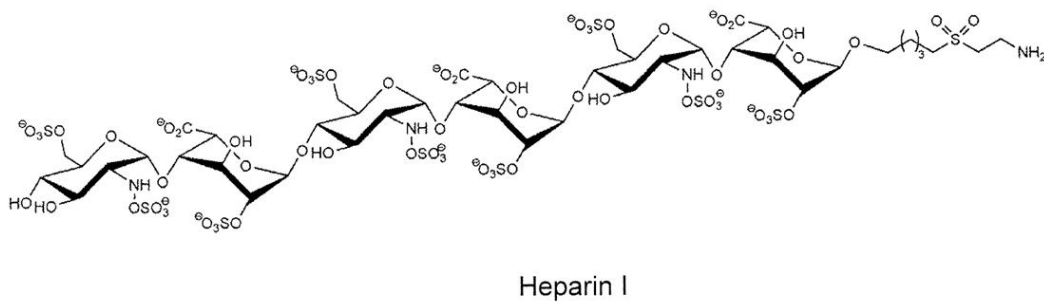


20

30

(2) . 以下式のヘパリン I である、または

【化 1 6】

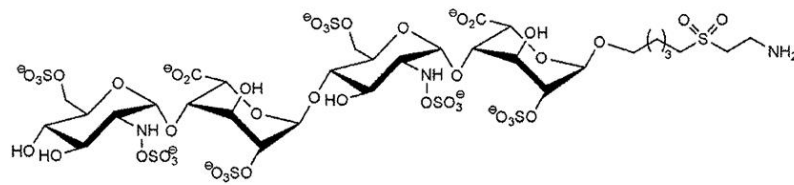


40

(3) . 以下式のヘパリン V I I である、

50

【化 1 7】



Heparin VII

10

請求項 1 に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 2】

前記化合物が、前記式 X X V I の化合物であって、かつ q は 2 でありかつ R¹⁰ は - O - 式 (X V I I) である、請求項 4 に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 3】

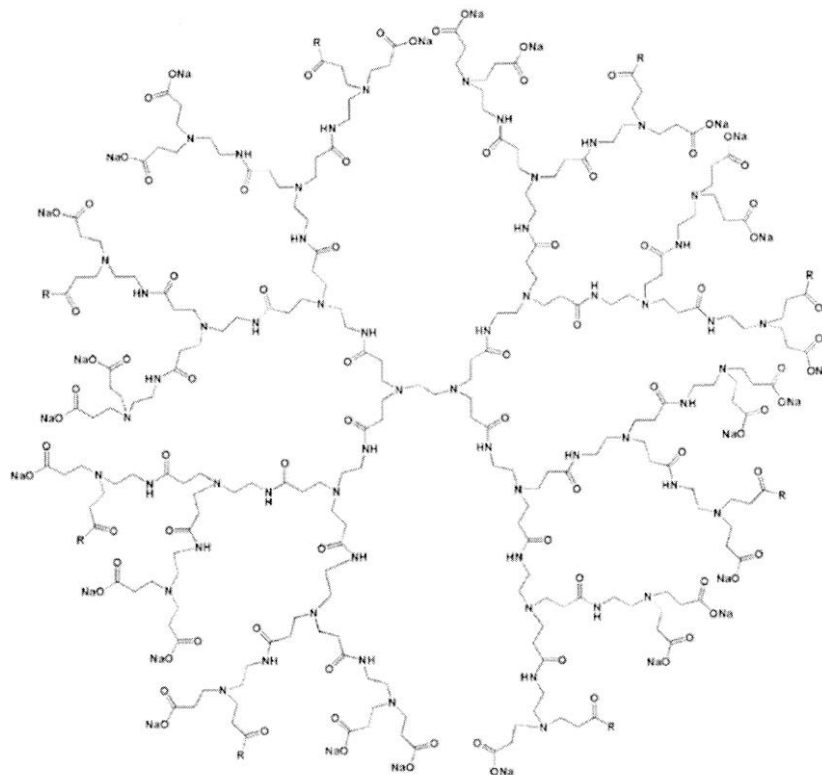
前記化合物が、前記式 X X V I の化合物であって、かつ q は 1 でありかつ R¹⁰ は - O - 式 (X V I I) である、請求項 1 0 に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 4】

前記化合物が前記化合物に共役体化された、胆汁酸のアルブミン結合部分をさらに含む、または前記化合物が以下の式の樹状構造に末端アミノ基 (R) を介して共有結合する、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

20

【化 1 8】



30

40

【請求項 1 5】

前記化合物が P C S K 9 (S E Q I D N O : 1) の R 9 3、R 9 6、R 9 7、R 1 0 4、R 1 0 5、K 1 3 6、H 1 3 9、R 1 6 5 および R 1 6 7 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸に結合する、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の使用のための組成

50

物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、リポタンパク質代謝障害の治療のための、プロタンパク質転換酵素サブチリシン様/ケキシン9型(PCSK9)の阻害剤としてのヘパリンアナログの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

アテローム性動脈硬化症によって生じる冠状動脈疾患は、欧州および米国における主要な死亡原因である。アテローム性動脈硬化症の発症における主なリスク因子は、循環におけるコレステロール含有低比重リポタンパク質(LDLコレステロールまたはLDL-C)粒子の増加した濃度を有する高コレステロール血症である。LDLコレステロール粒子の代謝は、コレステロールの合成と食事摂取を平衡化するように高度に調節されて、体内でのコレステロールに対する要求に応える。LDLコレステロールの代謝回転における主要な調節因子はLDL受容体(LDLR)であり、LDLRの欠如または機能障害によって生じる家族性高コレステロール血症を有する患者によって説明されるように、LDL粒子の細胞取り込みを仲介し、循環におけるLDLコレステロールの濃度を低下させる。

【0003】

LDLコレステロールの血漿中濃度を低下する有効な戦略は細胞中のLDLR濃度を増加することであり、LDLコレステロールを低下させるために現在最も幅広く使用されている医薬品はスタチンである。スタチンはコレステロールの合成を阻害しLDLRの発現を上方調節し、このため全体として循環LDLコレステロール量の低下をもたらす。しかし、かなりの数の患者がスタチンに应答しない、または様々な副作用のためにスタチンに耐容性がない。さらに、スタチンはまた、LDLRの強力な負の調節因子として最近同定されたプロタンパク質転換酵素サブチリシン様/ケキシン9型(PCSK9)の発現を増加し(Seidahら, 2014)、これによってLDLコレステロールに対する有効な効果を妨げる。

【0004】

PCSK9を標的にすることは、血漿LDL-Cを低下するための最近の戦略である(Lagaceら, 2006)。細胞中のLDLR濃度はLDLRを結合するPCSK9の能力によって低下され、これによってリサイクルを損ない、受容体のリソソーム分解を高める。PCSK9機能獲得変異は、増加したLDLRの分解によって循環LDL-Cの有意な増加をもたらす。これに反し、PCSK9機能喪失変異を有する個体は、LDL-C濃度の低下を示し、冠動脈性心臓疾患の事象をほとんど示さない。いくつかの主な製薬会社が高コレステロール血症の改善のためにPCSK9を標的とする治療戦略について承認を得ている。PCSK9のLDLR結合部位に対するPCSK9特異抗体の投与は、フェーズIII臨床試験においてLDL-Cの血漿中濃度を低下すると報告されている(Mullard(2015)Nat Rev Drug Discov; Sheridan(2015)Nature Biotechnology)。しかし、PCSK9血漿濃度は約6nMである(Lakoskiら, 2009)のに対しPCSK9:LDLR結合定数は120~620nMの範囲であり(Cunninghamら, 2007、Fisherら, 2007)、PCSK9が生理学的に関連する濃度で直接的にLDLRを結合しない可能性を高くしている。さらに、PCSK9は肝臓でのみLDLRを標的にし、例えば、高量のLDLRも発現するステロイドホルモン産生組織では標的にせず、肝臓特異的共受容体の必要性を示唆する(Seidahら, 2014)。このため、LDLRは主要なPCSK9受容体でありそうにない。代わりに、未知の受容体(受容体X)が循環PCSK9を捕捉し、続いてこれをLDLRに送達し得る。この受容体に対するPCSK9結合の阻害は従って、PCSK9:LDLR相互作用の阻害に比べて優れた戦略である。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

本発明者らは P C S K 9 がヘパラン硫酸プロテオグリカン (H S P G) に対する結合モチーフを有することを発見した。このモチーフに導入される変異ならびにヘパリンによる H S P G への結合の阻害は、P C S K 9 誘発性分解に対して L D L R を保護する。P C S K 9 と H S P G の間の相互作用の阻害は、P C S K 9 阻害抗体の臨床試験に比べて優れた治療能力を有する (C h a n ら , 2 0 0 9) 。重要なことに、P C S K 9 における H S P G 結合モチーフは、L D L R 結合表面のものと異なる。H S P G は 1 つ以上のヘパラン硫酸グリコサミノグリカン鎖によって置換されるコアタンパク質からなる。ヘパリンはヘパラン硫酸 (H S) と構造が密接に関連するグリコサミノグリカンの群である。ヘパリンおよび H S はともに、ウロン酸 (グルクロン酸 (G l c A) またはイズロン酸 (I d o A)) および N - アセチルグルコサミン (G l c N) からなる反復するジサッカライド単位から構成され、それらは O - および / または N - 硫酸化され得る。ヘパリンはヘパラン硫酸の高度に硫酸化された変種である。H S P G は高度にグルコシル化されたタンパク質であり、H S P G 結合モチーフを有するタンパク質リガンドを結合し、例えば成長因子などの限局的蓄積を生じる (X u および E s k o , 2 0 1 4) 。データは、P C S K 9 が H S P G を結合すること、およびその相互作用が P C S K 9 中の H S P G 結合モチーフの部位特異的変異誘発によって消失され、ヘパリンを結合できない P C S K 9 変異体をもたらす L D L R を分解する能力の低下を示すことを示す。さらに、ヘパリンまたはヘパリンアナログとの細胞のインキュベーションは、培地中の P C S K 9 の増加した濃度を伴う、L D L R の増加した量を生じる。まとめると、本例で概説される結果は、P C S K 9 機能が H S P G の結合に依存し、P C S K 9 と H S P G の間の相互作用が抑制されるときに細胞の L D L R 量が増加することを示す。

【 0 0 0 6 】

このため、H S P G は細胞表面 L D L R の P C S K 9 仲介分解に重要である。本結果は、H S P G が L D L R の P C S K 9 誘発性下方調節において重要な機能を有することを示す。

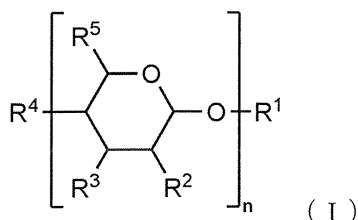
【 0 0 0 7 】

P C S K 9 と H S P G の間の相互作用部位は、P C S K 9 機能をブロックする際、特に L D L R 量に対する P C S K 9 の影響を阻害する際に標的にされ得る。このためリポタンパク質代謝の障害の治療における新規戦略が開示される。

【 0 0 0 8 】

第一態様では、本発明は被験体におけるリポタンパク質代謝の障害の治療での使用のための、式 (I) の一般構造を有する化合物、

【 化 1 】



またはその医薬的に許容可能な塩、溶媒和物、多型、もしくは互変異性体を含む組成物に関し、

ここで、

- R ¹ はアルキル、置換アルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、アルキルスルホニル、置換アルキルスルホニル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、エステル、アミド、アシル、置換アシル、アミノ、置換アミノ、チオアルキル、置換チオアルキル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、水素、およびハロゲンからなる群から選択され、

- 各 R ² は独立して - O S O ₃ ⁻、- O H、- N H ₂、- N H S O ₃ ⁻、- N H O C H ₃ および - O P O ₃ ²⁻ からなる群から選択され、

10

20

30

40

50

- 各 R^3 は独立して $-OSO_3^-$ 、 $-OH$ および $-OPO_3^{2-}$ からなる群から選択され、
- 各 R^4 は独立して $-OSO_3^-$ 、 $-OH$ 、 $-OPO_3^{2-}$ および $-H$ からなる群から選択され、
- 各 R^5 は独立して $-CH_2OSO_3^-$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-COO^-$ および $-CH_2OPO_3^{2-}$ からなる群から選択され、
- n は 1 以上の整数である。

【0009】

一つの態様では、本発明は LDLR の分解を阻害する方法に関し、当該方法は本明細書で定められる化合物を含む組成物を投与することを含む。

【0010】

別の態様では、本発明はそれを必要とする被験体における血漿リポタンパク質の濃度を低下させるための方法に関し、当該方法は本明細書で定められる化合物または医薬組成物を当該被験体に投与するステップを含む。一つの実施形態では、リポタンパク質は LDL-C である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】肝細胞表面での HSPG による PCSK9 の捕捉および LDLR に対するその後の提示を示す提唱モデルの図である。LDLR は LDL-C 粒子を循環から取り込み、それらを分解のためにリソソームに送達し、一方、受容体 (LDLR) はエンドソームでのカーゴの放出後に細胞表面に再循環される。PCSK9 への結合時に LDLR それ自体はリソソームで分解される。肝細胞表面上の HSPG は、PCSK9 を捕捉しそれを LDLR に提示すると提唱され、これによって PCSK9 : LDLR 複合体形成のための最適な条件を確実にする。従って、PCSK9 の高活性は、細胞表面での LDLR 量の低下および血漿コレステロールの増加をもたらし、一方、PCSK9 活性の阻害は血漿コレステロール濃度を低下させ冠動脈疾患の進行を遅らせる。

【図2】(A) 左右の矢印によってそれぞれ示される LDLR 結合部位および HSPG 結合部位を有する PCSK9 の空間充填モデルを示す。(B) 示される正電荷アミノ酸 (R : アルギニン、H : ヒスチジン) を有する PCSK9 (PDB ID : 2PMW) 中の予測される HSPG 結合部位 (Piper ら, 2007) の静電表面 (赤色が負、青色が正) でのヘパリンペンタサッカライド (SANORG、棒状) である。(C) PCSK9 (リボン) 中の HSPG 結合部位への SANORG の重ね合わせである。(D) ヘパリナーゼの有無における処理後に PCSK9 を発現する非透過性 HepG2 細胞 (白色) である。核を Hoechst によって染色した (暗灰色)。(E) ヘパリンへの PCSK9 結合をヘパリンアフィニティークロマトグラフィーによって分析した。PCSK9 を 500 mM の NaCl 濃度でカラムから溶出した。

【図3】表示されるアミノ酸残基がアラニンに変異された PCSK9 変異体を CHO 細胞で一時的に発現させた。(A) 細胞溶解物および培地の抗 PCSK9 ウェスタンブロッティングは、すべての PCSK9 変異体の発現ならびに細胞溶解物中のプロタンパク質 (プロ PCSK9) から成熟 PCSK9 への正確なプロセッシング、および細胞の培地中への成熟 PCSK9 の分泌を示した。偽トランスフェクション細胞では PCSK9 の発現は検出されなかった。(B) 一時的にトランスフェクションされた CHO 細胞の培地に分泌された PCSK9 変異体をアフィニティークロマトグラフィー、続いて抗 PCSK9 を用いる画分のウェスタンブロッティングによって分析した。すべての変異体は表示位置でアラニン置換を有する。野生型 (WT) PCSK9 および変異体 R165R167 は 0.3 ~ 0.4 M の NaCl に相当する画分に溶出され、一方、PCSK9 変異体 R96R97 および R104R105 はヘパリンに対する親和性低下を示し、通過画分または第一画分で認められた。PCSK9 変異体 R93R104R105H139 および R93R96R97R104R105H139 はフロースルーにのみ認められ、ヘパリンに結合しなかった。(C) HSPG 結合領域は、LDLR フラグメント (PDB : 3P5B) との複合体での PCSK9 の表面描写での PCSK9 の空間充填モデルで示されるように、LDLR 結合

10

20

30

40

50

部位と反対側に位置する。LDLRフラグメントはプロペラ領域、EGF領域AおよびB、ならびにL7を含み、PCSK9のC端、触媒領域、およびプロドメインが基本ラセンで示される。モデル化ヘパリンフラグメントは棒状で示される。(D) HepG2細胞の培養培地からの内因性PCSK9およびアポEは、アフィニティークロマトグラフィーおよびウェスタンブロッティングによって分析される場合、ヘパリンに対して同様な結合を示した。

【図4】WT PCSK9 (10 nM) と18時間インキュベーションされたHepG2細胞は、変異体(R93R96R97R104R105H139) PCSK9 (mut4) とインキュベーションされた細胞よりも有意に低い量のLDLRを示す。LDLR受容体量をウェスタンブロッティングによって評価し(A)、GAPDH量をコントロールとして示す。棒グラフ(B)はデンストメトリーによって定量されたLDLRの平均値(n=3)を、平均の標準誤差(SEM)とともに示す。結果はスチューデントt検定を用いて評価した。***P<0.01、****P<0.0001。

10

【図5】ヘパリン(50 U/mL)と24時間インキュベーションされたHepG2細胞はウェスタンブロッティングによって評価される、LDLR量の増加を示す(A)。GAPDH量をコントロールとして示す。棒グラフ(B)はデンストメトリーによって定量されたLDLRの平均値(n=4)を平均の標準誤差(SEM)とともに示す。ヘパリンとのインキュベーションも、ELISAによって測定されるとき、培地中のPCSK9量の増加をもたらす(C)。棒グラフは平均PCSK9濃度をSEMとともに示す(n=4)。結果はスチューデントt検定を用いて評価した。***P<0.001、****P<0.0001。(D)非透過処理HepG2細胞のPLA分析は、LDLRとPCSK9の間の共局在がヘパリン(50 U/mL)との細胞のインキュベーションで著しく低下したことを示した。

20

【図6】(A)細胞フリーPCSK9/LDLR結合アッセイ(BPS Bioscience)を用いて、ヘパリン(5および50 U/mL)が、PCSK9のLDLR結合領域を標的にするコントロール阻害剤抗PCSK9抗体(5 nM)(BPS Bioscience 71207)と対照的に、PCSK9のLDLRとの直接的相互作用を阻害しないことを認めた。結合アッセイにおいて、固定化LDLRに結合するビオチニル化PCSK9からの化学発光シグナルを定量し、結果はここで阻害剤を加えないサンプルからのシグナルに対して基準化して示される。棒グラフは平均値(n=3)を標準偏差誤差バーとともに示す。結果はスチューデントt検定を用いて評価した。****p<0.0001、Y軸：阻害剤無添加に対する%。(B)ELISAによって測定された培地中のPCSK9に対するヘパリンの用量依存的効果(n=3)。Y軸：培地中のPCSK9(%)。(C)RT-PCRによる細胞溶解物中のmRNA量の定量的分析。

30

【図7】ヘパリンアナログであるアリクストラ(フォンダパリヌクス, GlaxoSmithKline Pharma)の増加する濃度(0~250 µg/mL)と24時間インキュベーションされたHepG2細胞はLDLR量を高めた。GAPDHのウェスタンブロッティングを負荷コントロールとして示す。

【図8】(A)フラグミン(100 U/mL)およびイノヘップ(100 U/mL)と18時間インキュベーションした後のHepG2細胞でのLDLRのウェスタンブロッティングは、低分子量ヘパリンのこれら2種の治療用調製物が、ヘパリン(50 U/mL)の効果に匹敵して細胞のLDLR量を増加できることを示す。GAPDHのウェスタンブロッティングを負荷コントロールとして示す。(B)10 µgのPCSK9単独でのまたは50 Uヘパリンと組み合わせた静脈投与1時間後のマウスの肝臓中のLDLR量を示すウェスタンブロッティングである。50 µgの膜タンパク質調製物を加えた。ウェスタンブロットでコントロールとして示されるソルチリンは、PCSK9誘発性分解の標的ではないことが以前に示されたPCSK9受容体である。(C)B)のバンドの定量をデンストメトリーによって定量し、ドットプロットは各サンプルの個別量をビヒクル(0.9% NaCl)を注射されたコントロールに対するパーセントとして、平均値およびSEMとともに示す。PCSK9とヘパリンを共注射されたマウスは、LDLRの有意に高い量を示す(

40

50

60.3 ± 12.3% LDLR 対 24.0 ± 4.04%、n = 7 マウス / 群、p = 0.0157、両側スチューデント t 検定)。

【図 9】(A) ヘパリン模倣剤硫酸デキストラン (200 μg/mL) と 24 時間インキュベーションした後の HepG2 細胞での LDLR のウェスタンブロッティングであり、この化合物が細胞の LDLR 量を強力に増加し得ることを示す。比較のためヘパリン (50 U/mL) を示す。GAPDH を負荷コントロールとして示す。(B) LDLR 量のデンストメトリー定量は、硫酸デキストラン (0 ~ 200 μg/mL) とのインキュベーション後の HepG2 細胞中の LDLR 量の濃度依存的増加を示す。棒グラフは LDLR 平均を未処理細胞に対する % として SEM 誤差バーとともに示す。(C) PCSK9 および硫酸デキストランのマイクロスケール熱泳動 (MST) 結合曲線である。Y 軸：蛍光シグナル。X 軸：硫酸デキストランまたはデキストラン濃度、 $K_D = 180 \mu M$ 。丸：硫酸デキストラン。正方形：デキストラン。(D) 硫酸ペントサン (0 ~ 200 μg/mL) と 24 時間インキュベーションした後の HepG2 細胞での LDLR のウェスタンブロッティングおよびデンストメトリー定量 (E) であり、50 ~ 200 μg/mL の硫酸ペントサンで処理された細胞由来の溶解物中での LDLR の 4 倍の増加を示す。棒グラフは LDLR 平均を未処理細胞に対する % として SEM 誤差バーとともに示す。(F) PCSK9 および硫酸ペントサンについての MST 結合曲線である。Y 軸：蛍光シグナル。X 軸：硫酸ペントサン濃度。丸：硫酸ペントサン、 $K_D = 381 \mu M$ 。正方形：コントロール。(G) スラミン (0 ~ 200 μg/mL) と 24 時間インキュベーションした後の HepG2 細胞での LDLR の定量である。棒グラフは LDLR 平均を未処理細胞に対する % として SEM 誤差バーとともに示す。スラミンとインキュベーションした HepG2 細胞での LDLR の代表的なウェスタンブロッティングを (A) に示す。(H) PCSK9 およびスラミンについての MST 結合曲線である。Y 軸：蛍光シグナル。X 軸：スラミン濃度。丸：スラミン、 $K_D = 190 \mu M$ 、正方形：コントロール。(I) ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド S-dC-36 (0 ~ 5.0 μM) と 24 時間インキュベーションした後の HepG2 細胞での LDLR のウェスタンブロッティングおよびデンストメトリー定量 (J) であり、細胞受容体量の濃度依存的増加を示す。棒グラフは LDLR 平均を未処理細胞に対する % として SEM 誤差バーとともに示す。結果はスチューデント t 検定を用いて評価した。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、**** p < 0.0001。(K) PCSK9 および S-dC-36 についての MST 結合曲線である。Y 軸：蛍光シグナル。X 軸：S-dC-36 濃度。丸：S-dC-36、 $K_D = 4.8 \mu M$ 。正方形：コントロール。

【図 10】PCSK9 (10 μg) の注射前のヘパリナーゼ I の注入は、LDLR の PCSK9 誘発性分解を完全に阻害する。代表的なサンプルのウェスタンブロッティング (A) および LDLR の棒グラフ定量 (B) を示す。ウェスタンブロッティングでは、GAPDH を負荷コントロールとして使用する。e：空レーン。コントロールは n = 7、PCSK9 は n = 6、ヘパリナーゼは n = 5、ヘパリナーゼ / PCSK9 は n = 5。PCSK9 (10 μg) およびヘパリン (50 U) またはスラミン (300 μg) を共注射されたマウスは、PCSK9 を単独で注射されたマウスと比べて有意に高い LDLR 量を示す (C)。コントロールは n = 15、PCSK9 は n = 10、PCSK9 / ヘパリンは n = 7、PCSK9 / スラミンは n = 3。(D) ヘパリン (50 U) の静脈内注射後に、ネズミ PCSK9 特異的 ELISA によって評価した PCSK9 の血漿中濃度である。

【図 11】10 μg の PCSK9 単独でのまたは 50 μg の PCSK9 阻害抗体 5E11 と組み合わせた静脈内投与後 1 時間のマウスの肝臓中の LDLR 量である。

【図 12】棒グラフは、蛍光色素 Bodipy によって標識された 10 ng/mL の LDL 粒子とインキュベーションした 4 時間後にスラミン (200 μg/mL) と一昼夜インキュベーションした後の HepG2 細胞中の相対的蛍光シグナルを示す。スラミンによる PCSK9 の阻害は LDL の取り込みを 2 倍増加する。

【図 13】(A) および (B) の棒グラフは、100 μM スラミンまたは HMG CoA レダクターゼ阻害剤であるメバスタチンおよびシンバスタチンとのインキュベーションの

10

20

30

40

50

24 および 48 時間後にウェスタンブロッティングによって評価した Hep G2 細胞中の LDL R 量を示す。スラミンとインキュベーションされた細胞は、スタチンとインキュベーションされた細胞より高い LDL R 量を示す。

【図 14】(A) PCSK9 と細胞外マトリックスグリカンの間の相互作用の、合成グリカンマイクロアレイを用いた精査。異なるヘパリンフラグメントに対する結合のみを示す。天然ヘパリンは陽性コントロールとして含まれる。(B) グリカンマイクロアレイで使用されたヘパリン下位構造を示す。PCSK9 と相互作用する構造は、[4) - - GlcN - 6, N - 二硫酸 (1 4) - - IdoA - 2 - 硫酸 - (1) の反復を含む。

【図 15】(A) 変異された HSPG 結合部位 (R93R96R97R104R105H139, mut4) を有する PCSK9 (10 μg) は、マウスにおける注射で肝 LDL R 分解 (各 n = 3) を誘発するのに効果的ではない。ウェスタンブロットの定量を (B) に示す。(C) PCSK9 は西欧型食餌で飼育されたマウス中の全コレステロールを有意に増加するが、PCSK9 mut4 は増加しない (コントロールは n = 25、PCSK9 は n = 12、PCSK9 mut4 は n = 9)。(D) 注射された PCSK9 mut4 は、HSPG による捕捉の低下および LDL R による排除に則して、PCSK9 WT に比べて高い濃度で循環に残存した。

【図 16】(A) 化合物 (X) の PCSK9 - ヘパリン相互作用を阻害する能力を、PCSK9 (1 μg / mL) を阻害剤の存在下でヘパリン - セファロースビーズによって沈殿させるアッセイで試験した。一昼夜インキュベーション後、ビーズをペレット化し、上清中の非沈殿化 PCSK9 (遊離 PCSK9) を ELISA によって評価した。棒グラフは、表示のように増加する濃度の化合物 (X) を含むサンプル中の遊離 PCSK9 (%) を、ヘパリン - セファロースビーズを添加しないサンプル中の PCSK9 濃度 (添加コントロール) に対して基準化して示す。陰性コントロールサンプルは阻害剤を加えずにインキュベーションし、陽性サンプルは可溶性ヘパリン (5 mg / mL) とインキュベーションした。平均値を SEM とともに示す (n = 2)。(B) 化合物 (X) の表示の濃度と一昼夜インキュベーションした Hep G2 細胞における LDL R の代表的なウェスタンブロッティングである。棒グラフは、WB の定量を示す (SEM を伴う平均値、n = 2)。コントロール細胞は阻害剤を無添加で (陰性コントロール) または 500 μg / mL ヘパリンを添加して (陽性コントロール) インキュベーションした。(C) PCSK9 (0.4 mg / kg) による注射の 1 時間前に、PCSK9 阻害剤化合物 (X) (0.13 mg / kg) またはエボロクマブ (8 mg / kg) を注射されたマウス (BALB6 / c J R j、雄、10 週齢) の肝臓サンプル中の LDL R 量である。肝臓サンプルを PCSK9 注射の 1 時間後に収集した。コントロール群は PCSK9 または NaCl の注射前に NaCl (0.9 %) を注射された。棒グラフは、平均値を SEM とともに示す。NaCl / NaCl 群は n = 3、NaCl / PCSK9 群は n = 5、エボロクマブ / PCSK9 群は n = 5、化合物 (X) / PCSK9 群は n = 8。

【図 17】(A) 表示濃度でのヘパリンヘキサマーまたは 18 マーと一昼夜インキュベーションした Hep G2 細胞中の LDL R 量のウェスタンブロッティングである。(B) 棒グラフは、WB の定量を示す (SEM を伴う平均値、n = 2)。

【図 18】(A) イノヘップのサイズ排除クロマトグラフィーによって得られる溶出プロファイル。表示分画の PCSK9 阻害活性を続いて Hep G2 細胞で試験した。(B) サイズ排除画分 (20 μM) とインキュベーションされた Hep G2 細胞中の LDL R 量を示すウェスタンブロッティングである。画分 H6 との一昼夜インキュベーションは細胞 LDL R を 5 倍増加し、この画分をさらに強アニオン交換 (SAX) クロマトグラフィーを用いて分画した (図 19)。

【図 19】(A) イノヘップ画分 H6 の強アニオン交換 (SAX) クロマトグラフィーによって得られた溶出プロファイルである。(B) 選択された SAX 画分と一昼夜インキュベーションされた Hep G2 細胞での LDL R のウェスタンブロッティング。SAX 画分 I1、I8、および I9 は PCSK9 阻害活性を有するヘパリンフラグメントを含み、試験した濃度 (500 nM) で LDL R 量を最大で 2 倍増加する。

10

20

30

40

50

【図 20】ヘパリン - アルブミンへの P C S K 9 結合のピアコア分析。分析は、ヘパリン - アルブミン（シグマ、H 0 4 0 3）またはアルブミン（シグマ、A 4 5 0 3）のいずれかと結合されたセンサーチップを使用した。（A）P C S K 9 のヘパリン - アルブミンへの結合。（B）P C S K 9 のアルブミンへの結合。P C S K 9 はヘパリン - アルブミンに 7 0 0 p M の親和定数で結合し、アルブミンと結合されたセンサーチップへの結合は認められなかった。干渉アッセイを実施して P C S K 9 と化合物（X）の間の結合を評価した。（C）増加する濃度の化合物（X）とプレインキュベーションした P C S K 9 を、ヘパリン - アルブミンと結合されたセンサーチップに注入した。結合曲線は、化合物（X）が P C S K 9 のヘパリン - アルブミンセンサーチップへの結合を 5 0 n M の推定 I C 5 0 で阻害することを示した。

10

【図 21】（A）スクロースオクタ硫酸の構造。（B）棒グラフは、表示のスクロースオクタ硫酸濃度の存在下でのヘパリン - セファロースビーズによる P C S K 9 の沈殿を示す。非沈殿 P C S K 9（遊離 P C S K 9）のパーセントを、ヘパリン - セファロースビーズを加えないサンプル中の P C S K 9 濃度（添加コントロール）に対して計算した。陽性コントロールサンプルを可溶性ヘパリン（5 m g / m L）とインキュベーションした。平均値を S E M とともに示す（n = 3 ~ 2）。

【発明を実施するための形態】

【0012】

定義

用語「アシル」は、本明細書で使用されるとき、少なくとも 1 つのオキソ部分（- C = O）を含む後述のアルキル基を意味する。

20

【0013】

用語「アルカン」は、飽和の直鎖、分枝および/または環式カルボヒドリドを指す。当該アルカンは一般式 $C_n H_{2n+2}$ のものであり得る。いくつかの実施形態では、当該アルカンは環構造を含む。

【0014】

用語「アルケニル」は、本明細書で使用されるとき、アルケンから 1 つの - H の除去によって得られる置換基を指す。アルケンは少なくとも 1 つの二重結合を含む任意の非環式炭化水素であり得る。しばしば、アルケニルは一般式 $- C_n H_{2n-1}$ を有する。

【0015】

用語「アルキル」はアルカンから 1 つの - H の除去によって得られる置換基を指す。

30

【0016】

用語「アルキニル」は、本明細書で使用されるとき、アルキンから 1 つの - H の除去によって得られる置換基を指す。アルキンは少なくとも 1 つの三重結合を含む任意の非環式炭化水素であり得る。しばしば、アルキニルは一般式 $- C_n H_{2n-3}$ を有する。

【0017】

用語「アルキルスルホニル」は、末端基または架橋基であり得る - S (O) ₂ - アルキル基を指す。

【0018】

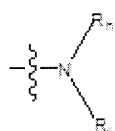
用語「アミド」は、官能基 $R C (O) N R ' R ''$ を指す。

40

【0019】

用語「アミノ」は、本明細書で使用されるとき、一般式

【化 2】



の置換基を指す。波線は置換基の結合点を示す。このためアミノは、例えば - N H ₂ または - N H - であり得る。

50

【 0 0 2 0 】

用語「アレーン」は、本明細書で使用されるとき、芳香族単環または多環炭化水素を指す。

【 0 0 2 1 】

用語「アリール」は、本明細書で使用されるとき、環中のCからの1つの-Hの除去によってアレーンから得られる置換基を指す。本発明で使用される有用なアリールの例は、フェニル、ナフチル、アントラセニル、フェナントレニル、およびピレニルを含む。

【 0 0 2 2 】

用語「エステル」は、官能基 $R-C(=O)-O-R'$ を指す。

【 0 0 2 3 】

用語「ハロゲン」は、本明細書で使用されるとき、-F、-Cl、-Brおよび-Iからなる群から選択される置換基を指す。

10

【 0 0 2 4 】

用語「ヘパリンアナログ」は、ヘパリンと構造的に類似する化合物を指す。

【 0 0 2 5 】

用語「ヘパリン模倣剤」は、機能的にヘパリンのような、すなわちヘパリンを模倣する挙動を示す化合物を指す。本用語はこのため、構造的に類似している化合物だけでなく、異なる構造だがヘパリンと同様な機能性を有する化合物の両方を、本開示の文脈で含む。

【 0 0 2 6 】

用語「ヘテロアルキル」は、本明細書で使用されるとき、1つ以上の炭素がS、O、P、およびNから選択されるヘテロ原子によって交換されているアルキル基を指す。

20

【 0 0 2 7 】

用語「ヘテロアリール」は、本明細書で使用されるとき、ヘテロアレーンの環構造中の原子からの1つの-Hの除去によって当該ヘテロアレーンから得られる置換基を指す。ヘテロアレーンは、環構造に1つ以上のヘテロ原子を含む単環または多環芳香族化合物である。当該ヘテロ原子は、好ましくはS、N、およびOからなる群から選択される。本発明で使用される有用なヘテロアリールの非限定的な例は、アゾリル、ピリジニル、ピリミジニル、フラニル、およびチオフェニルを含む。

【 0 0 2 8 】

LDLコレステロール(LDL-C)量：対象個体に対する最適なLDL-C量は、各個体の根底にある心臓疾患リスクに応じて変動する。健常個体では、LDL-Cコレステロール量は理想的には $2.6 \sim 3.3 \text{ mmol/L}$ (または $100 \sim 129 \text{ mg/dL}$)未満である。 $3.4 \sim 4.1 \text{ mmol/L}$ または $130 \sim 159 \text{ mg/dL}$ の量は境界で高く、 $4.1 \sim 4.9 \text{ mmol/L}$ または $160 \sim 189 \text{ mg/dL}$ の量は高く、 4.9 mmol/L または 189 mg/dL を超える量は非常に高い。心臓疾患のリスクのある個体では、 2.6 mmol/L または 100 mg/dL 未満の量が推奨され、一方、 1.8 mmol/L または 70 mg/dL 未満の量が心臓疾患の非常に高いリスクのある個体にとって望ましい。

30

【 0 0 2 9 】

低比重リポタンパク質受容体(LDLR)量：細胞におけるLDLRの合成は、細胞内遊離コレステロールの量によって調節され、コレステロールが細胞の必要性に対して過剰である場合、LDLRの転写が阻害されるであろう。LDLR量は、限定されないが、ウェスタンブロッティング、RT-PCR、およびフローサイトメトリーなどの、従来技術で知られている方法によって推定できる。

40

【 0 0 3 0 】

用語「低分子量ヘパリン」は、限定されたサイズのヘパリンの群を指す。天然ヘパリンは種々の長さまたは分子量の分子鎖からなる。例えば、 $5000 \sim 40,000$ ダルトン超である種々の分子量の鎖が、多分散系の医薬品グレードのヘパリンを構成する。低分子量ヘパリンはこれに反し、ポリサッカライドの短鎖のみからなる。低分子量ヘパリンは、 8000 Da 未満の平均分子量を有するヘパリン塩として定められ、全鎖の少なくとも60%が 8000 Da 未満の分子量を有する。これらは、ポリマーヘパリンの分画化または脱

50

重合化などの、従来技術の当業者に知られている様々な方法によって得られる。

【0031】

用語「リポタンパク質代謝障害」は、脂質恒常性の障害およびこれらと関連する障害を指し、例として、糖尿病、肥満、メタボリック症候群、黄色腫、高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、脂質異常症、高トリグリセリド血症、高脂血症、シトステロール血症、高血圧、狭心症、急性冠状動脈症候群、冠状動脈性心臓病、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管炎症および敗血症を含む。

PCSK9量：PCSK9の血漿中濃度は一般集団において30～3000 ng/mLで変動し、中央値は一般的に男性より女性で高い。PCSK9量はLDL-C量と相関する。

【0032】

用語「モノサッカライド単位」は、本明細書で使用されるとき、炭水化物の最も基本的な単位を指し、アルドース、ケトースおよび幅広い種々の誘導体を含む。1つを超えるモノサッカライド単位が結合されるならば、結合は個別に もしくは (1 2)、 もしくは (1 3) または もしくは (1 4) であり得る。好ましくは、結合は または (1 4) である。モノサッカライド単位はアルドースまたはケトースであり得る。

【0033】

用語「置換された」は、化学化合物と関連して本明細書で使用されるとき、別の部分によって置換される水素基を指す。このため、「Xで置換された」は、化学化合物と関連して本明細書で使用されるとき、Xで置換される水素基を指す。同様に、「置換X」はXを指し、ここで1つの水素基が別の部分によって置換されている。例として、「置換アルキル」はアルキル-Rを指し、ここでRは-H以外の任意の部分である。

【0034】

用語「置換基」は、化学化合物と関連して本明細書で使用されるとき、水素原子の代わりに置換される原子または原子群を指す。

【0035】

用語「チオアルキル」は、本明細書で使用されるとき、一般式-S-アルキルの置換基を指す。

【0036】

用語「チオアリール」は、本明細書で使用されるとき、一般式-S-アリールの置換基を指す。

【0037】

本発明の詳細説明

本発明は請求項で定められる通りである。

【0038】

ヘパリンアナログ

本発明は、一つの態様では、被験体におけるリポタンパク質代謝の障害の治療に使用するための化合物を含む組成物に関する。化合物は一般的にはヘパリンアナログである。ヘパリンアナログの例は、本明細書に参考によって援用される、R. Lever et al. (編集), Heparin - A Century of Progress, Handbook of Experimental Pharmacology (ヘパリン - 進歩の世紀、実験薬理学のハンドブック) 207, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012に記載される。

【0039】

一つの態様では、本発明のヘパリンアナログは、被験体におけるリポタンパク質代謝の障害の治療での使用のための、式(I)の一般構造、

10

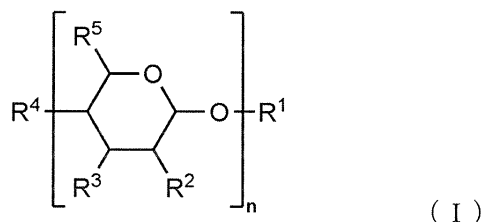
20

30

40

50

【化 3】



またはその医薬的に許容可能な塩、溶媒和物、多型、もしくは互変異性体を有し、
ここで、

- R¹ はアルキル、置換アルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、アルキルスルホニル、置換アルキルスルホニル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、エステル、アミド、アシル、置換アシル、アミノ、置換アミノ、チオアルキル、置換チオアルキル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、水素、およびハロゲンからなる群から選択され、

- 各 R² は独立して -OSO₃⁻、-OH、-NH₂、-NHSO₃⁻、-NHOCCH₃ および -OPO₃²⁻ からなる群から選択され、

- 各 R³ は独立して -OSO₃⁻、-OH および -OPO₃²⁻ からなる群から選択され、
- 各 R⁴ は独立して -OSO₃⁻、-OH、-OPO₃²⁻ および -H からなる群から選択され、

- 各 R⁵ は独立して -CH₂OSO₃⁻、-CH₂OH、-COO⁻ および -CH₂OPO₃²⁻ からなる群から選択され、
- n は 1 以上の整数である。

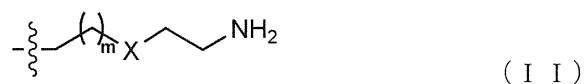
【0040】

一つの実施形態では、n は 1、2、3 または 4 である。

【0041】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物における R¹ は式 (II) の基を含み、

【化 4】



ここで、

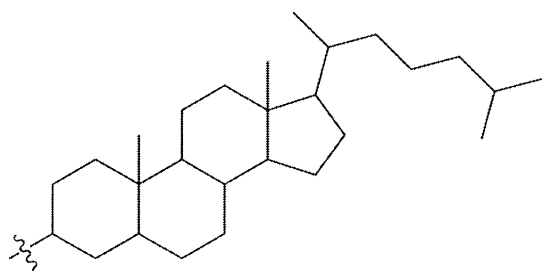
- X は CH₂ または SO₂ であり、

- m は独立して 1 以上の整数である。

【0042】

一つの実施形態では、m は 1、2、3、4、5 または 6 である。一つの実施形態では、R¹ は式 (XI) の基を含む。

【化 5】



【0043】

いくつかの実施形態では、 R^1 は置換ヘテロアルキルである。当該置換ヘテロアルキルはモノサッカライド単位を含み得る。いくつかの実施形態では、 R^1 は少なくとも1つのモノサッカライド単位、少なくとも2つのモノサッカライド単位など、少なくとも3つのモノサッカライド単位など、少なくとも4つのモノサッカライド単位などを含む。好ましい実施形態では、式(I)におけるnは、 R^1 が少なくとも1つのモノサッカライド単位を含むとき、1である。

【0044】

一つの実施形態では、 R^1 はさらにアルキル、置換アルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、アルキルスルホニル、置換アルキルスルホニル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、エステル、アミド、アシル、置換アシル、アミノ、置換アミノ、チオアルキル、置換チオアルキル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、水素、およびハロゲンからなる群から選択される部分を含む。

10

【0045】

一つの実施形態では、 R^1 は式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)、式(XX)、式(XXIX)、式(XXX)、式(XXXI)、-PEG2000-OMe、および-PEG5000-OMeからなる群から選択される基を含む。

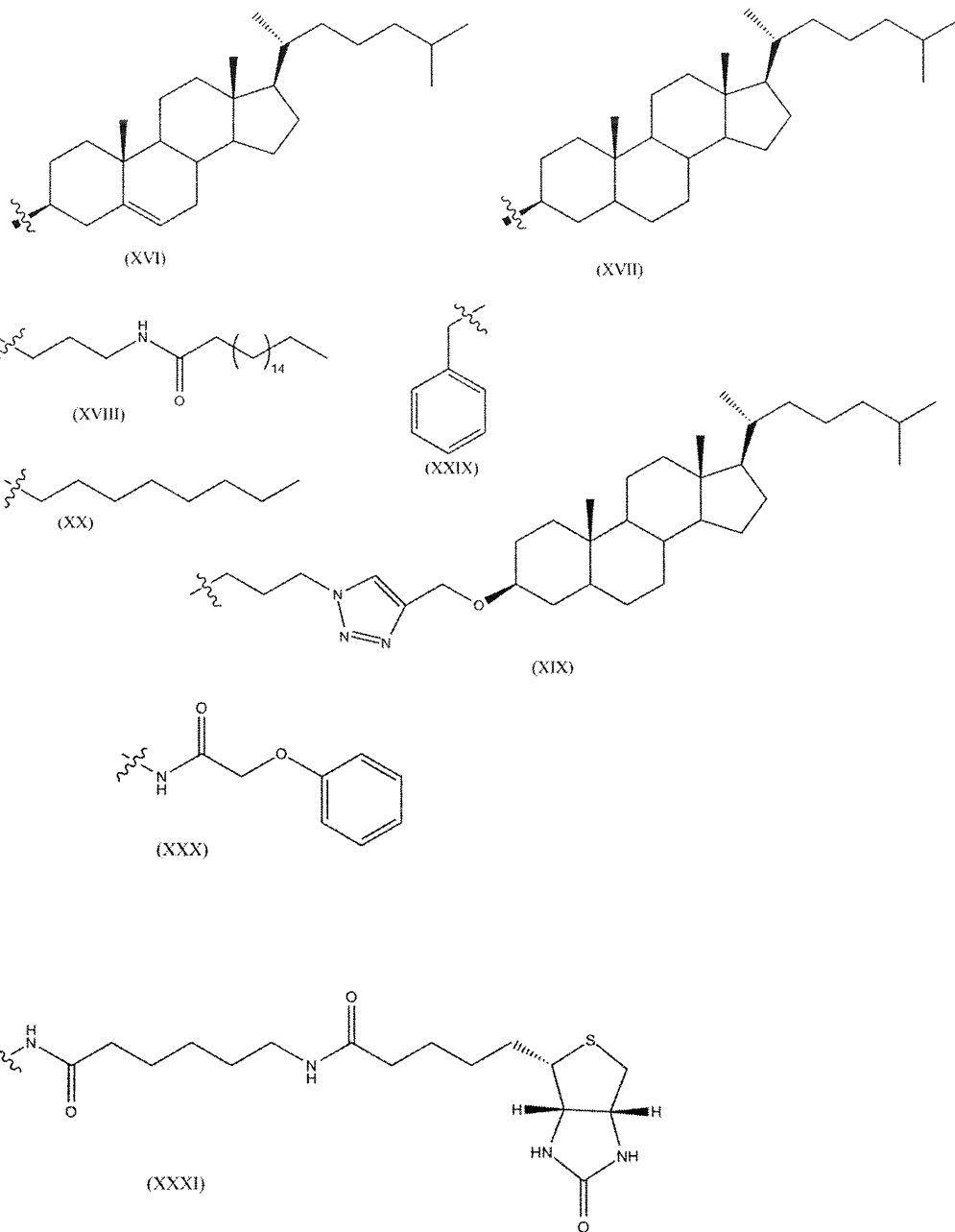
20

30

40

50

【化 6】



【 0 0 4 6 】

別の実施形態では、 R^1 は式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XXIX)、式(XX)、式(XXXIX)、式(XXX)、式(XXXI)、-PEG2000-OMe、および-PEG5000-OMeからなる群から選択される基からなる。

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態では、化合物はヘパリン模倣剤である。当該ヘパリン模倣剤はPI-88をベースとした誘導体であり得る。PI-88(式(XXXIII))、ここで R^8 は $-PO_3^{2-}$ であり、 R^9 は個別に $-SO_3^-$ または $-H$ である、下記参照)は高度に硫酸化され、モノリン酸化されたマンノースオリゴサッカライドの混合物であり、ヘパラーゼ阻害剤であることが知られている。

10

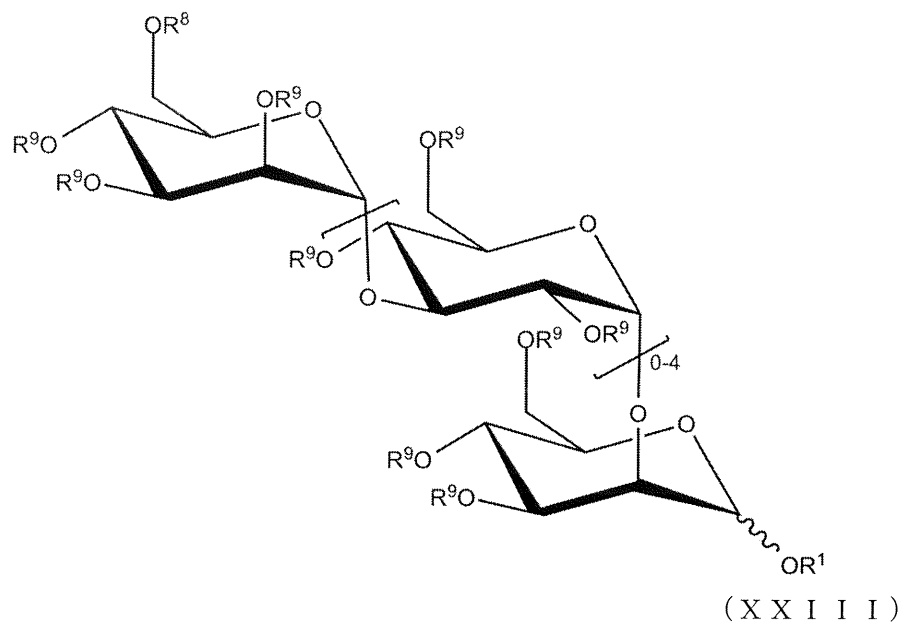
20

30

40

50

【化 7】



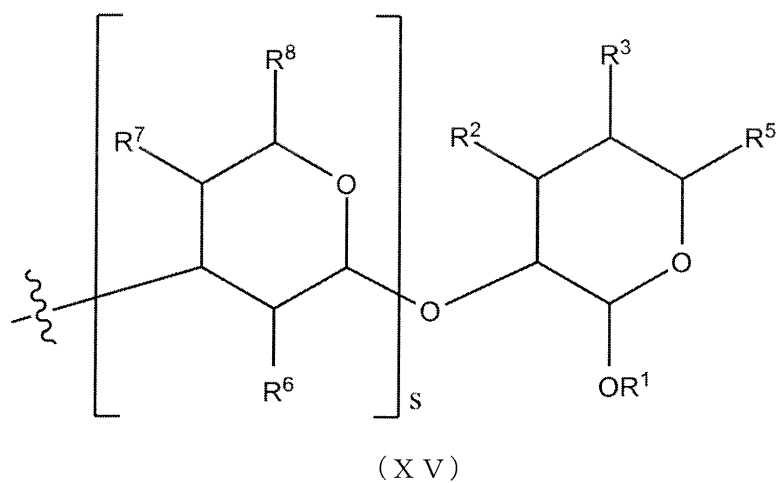
10

【0048】

このため、いくつかの実施形態では、式 (I) 中の n は 1 であり、 R^1 は式 (XV) の基を含み、ここで s は 1 以上の整数である。一つの実施形態では、 s は 1、2 または 3 である。

20

【化 8】



30

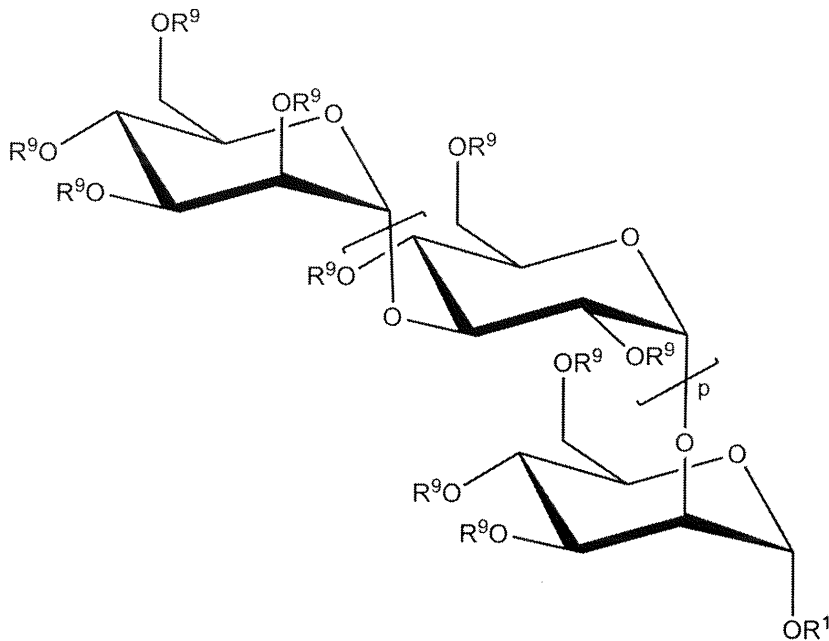
【0049】

一つの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (XXIV) の化合物であり、ここで p は 1 以上の整数である。

40

50

【化 9】



(XXIV)

【0050】

好ましい実施形態では、化合物は、

- A. 式 (XXIV) の化合物であり、ここで p は 2 であり、R¹ は式 (XX) である、
- B. 式 (XXIV) の化合物であり、ここで p は 2 であり、R¹ は式 (XVII) である、
- C. 式 (XXIV) の化合物であり、ここで p は 2 であり、R¹ は式 (XVIII) である、
- D. 式 (XXIV) の化合物であり、ここで p は 3 であり、R¹ は式 (XVII) である、
- E. 式 (XXIV) の化合物であり、ここで p は 0 であり、R¹ は式 (XVII) である、
- F. 式 (XXIV) の化合物であり、ここで p は 1 であり、R¹ は式 (XVII) である、
- G. 式 (XXIV) の化合物であり、ここで p は 1 であり、R¹ は式 (XIX) である、
- H. 式 (XXIV) の化合物であり、ここで p は 3 であり、R¹ は式 (XX) である、または
- I. 式 (XXIV) の化合物であり、ここで p は 3 であり、R¹ は式 (XXIX) である。

【0051】

一つの実施形態では、p は 1 であり、式 (I) の化合物は式 (XV) の化合物である。

10

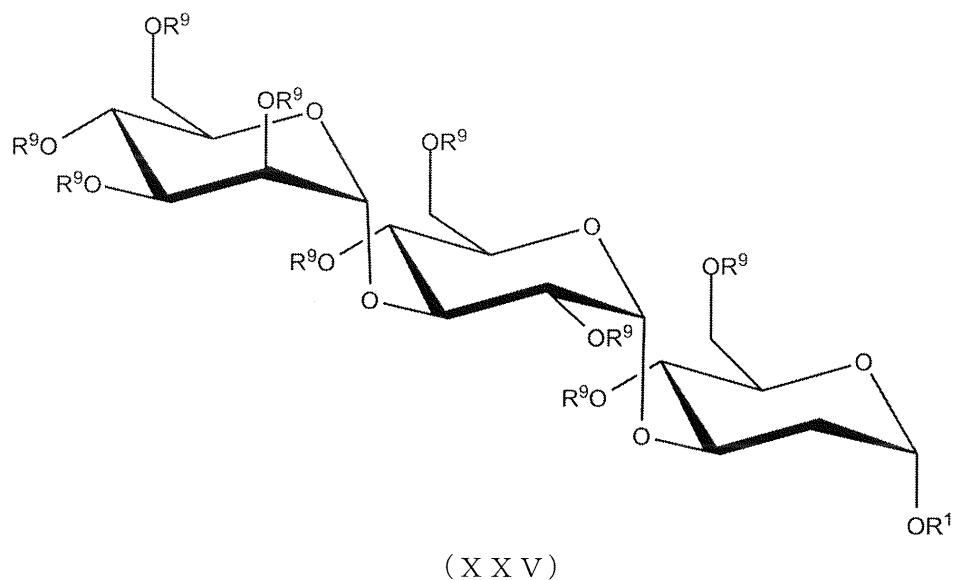
20

30

40

50

【化 1 0】



10

【0052】

好ましい実施形態では、化合物は、

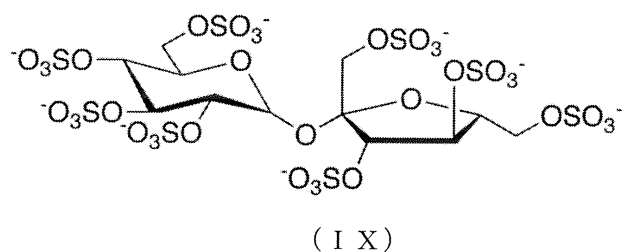
J. 式 (XXV) の化合物であり、ここで R^1 は式 (XVII) である、または
 K. 式 (XXV) の化合物であり、ここで R^1 は式 (XIX) である。

20

【0053】

一つの実施形態では、式 (I) の化合物は構造 (IX) を有する。

【化 1 1】



30

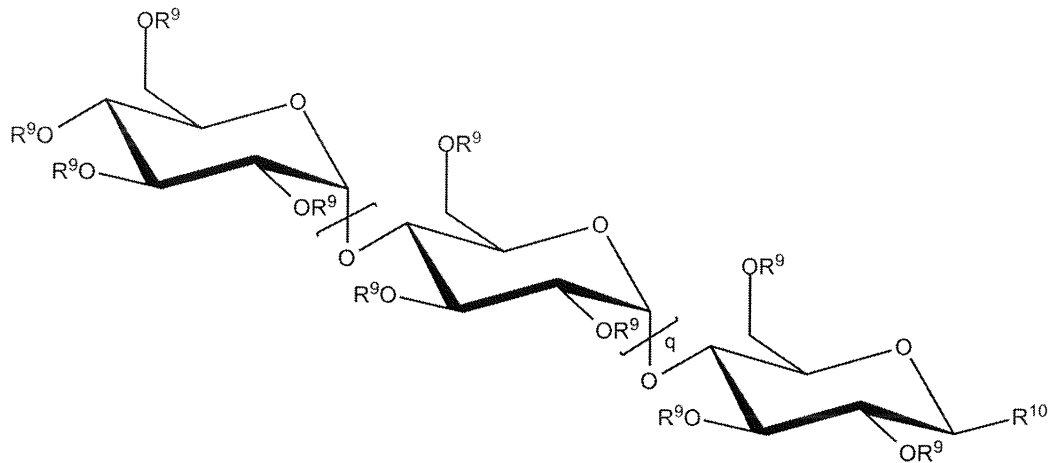
【0054】

一つの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (XXVI) の化合物であり、ここで q は 1 以上の整数である。一つの実施形態では、 q は 1、2 または 3 である。

40

50

【化 1 2】

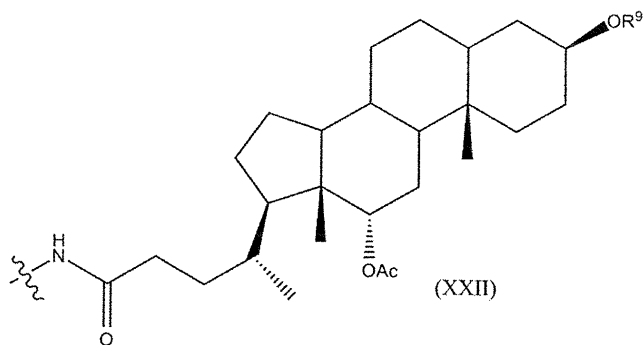


(XXVI)

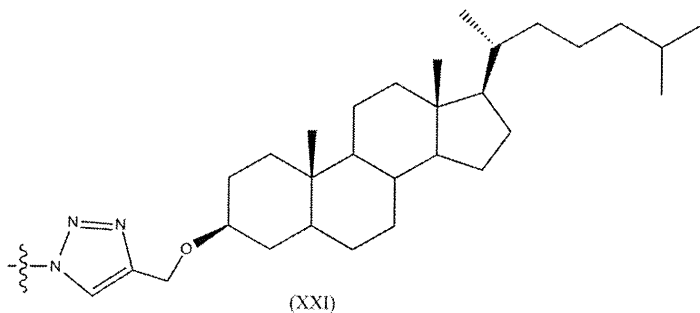
【0055】

一つの実施形態では、 R^{10} は $-O-R^1$ である。別の実施形態では、 R^{10} は式(XXI)、式(XXII)、 $-O-$ 式(XVI)、 $-O-$ 式(XVII)、 $-O-$ 式(XVIII)、 $-O-$ 式(XIX)および $-O-$ 式(XX)からなる群から選択される基を含む。別の実施形態では、 R^{10} は式(XXI)、式(XXII)、 $-O-$ 式(XVI)、 $-O-$ 式(XVII)、 $-O-$ 式(XVIII)、 $-O-$ 式(XIX)、 $-O-$ 式(XX)および $-O-$ 式(XXIX)からなる群から選択される基からなる。

【化 1 3】



(XXII)



(XXI)

【0056】

好ましい実施形態では、化合物は、

L. 式(XXVI)の化合物であり、ここで q は2であり、 R^{10} は $-O-$ 式(XVII)である、

M. 式(XXVI)の化合物であり、ここで q は2であり、 R^{10} は式(XXI)である、

N. 式(XXVI)の化合物であり、ここで q は1であり、 R^{10} は式(XVII)であ

る、

O. 式 (XXVI) の化合物であり、ここで q は 2 であり、 R^{10} は -O- 式 (XXII) である、

P. 式 (XXVI) の化合物であり、ここで q は 1 であり、 R^{10} は -O- 式 (XVII) である、

Q. 式 (XXVI) の化合物であり、ここで q は 2 であり、 R^{10} は -O- 式 (XVII) である、

R. 式 (XXVI) の化合物であり、ここで q は 1 であり、 R^{10} は -O- 式 (XVII) である、

S. 式 (XXVI) の化合物であり、ここで q は 0 であり、 R^{10} は -O- 式 (XVII) である、または

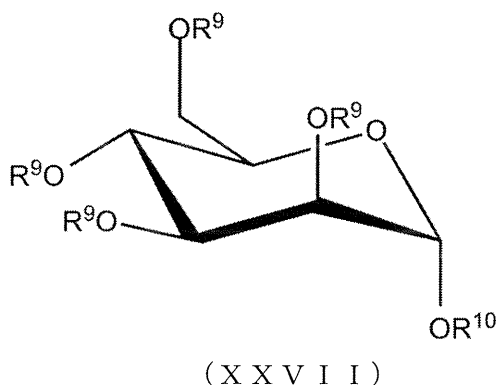
T. 式 (XXVI) の化合物であり、ここで q は 0 であり、 R^{10} は -O- 式 (XXI) である。

10

【0057】

一つの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (XXVII) の化合物である。

【化14】



20

【0058】

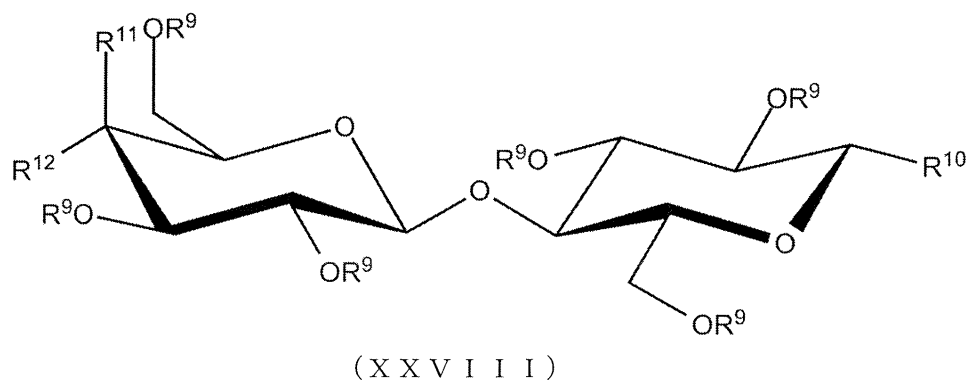
好ましい実施形態では、化合物は式 (XXVII) であり、 R^{10} は式 (XVII) である。

30

【0059】

一つの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (XXVIII) の化合物である。

【化15】



40

【0060】

好ましい実施形態では、化合物は、

U. 式 (XXVIII) の化合物であり、ここで R^{10} は -O- 式 (XVII) であり、 R^{11} は H であり、 R^{12} は OR^9 である、または

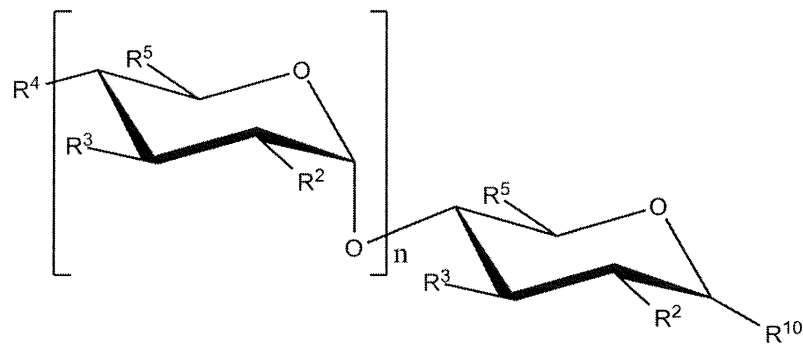
V. 式 (XXVIII) の化合物であり、ここで R^{10} は式 (XXI) であり、 R^{11} は OR^9 であり、 R^{12} は H である。

50

【 0 0 6 1 】

一つの実施形態では、化合物は一般構造式 (X I I) を有する。

【 化 1 6 】



(X I I)

10

【 0 0 6 2 】

一つの実施形態では、 R^2 は $-OSO_3^-$ である。別の実施形態では、 R^3 は $-OSO_3^-$ である。別の実施形態では、 R^4 は $-OSO_3^-$ である。別の実施形態では、 R^5 は $-CH_2OSO_3^-$ である。好ましい実施形態では、 R^2 、 R^3 および R^4 は $-OSO_3^-$ であり、 R^5 は $-CH_2OSO_3^-$ である。一つの実施形態では、 R^9 は $-OSO_3^-$ である。

20

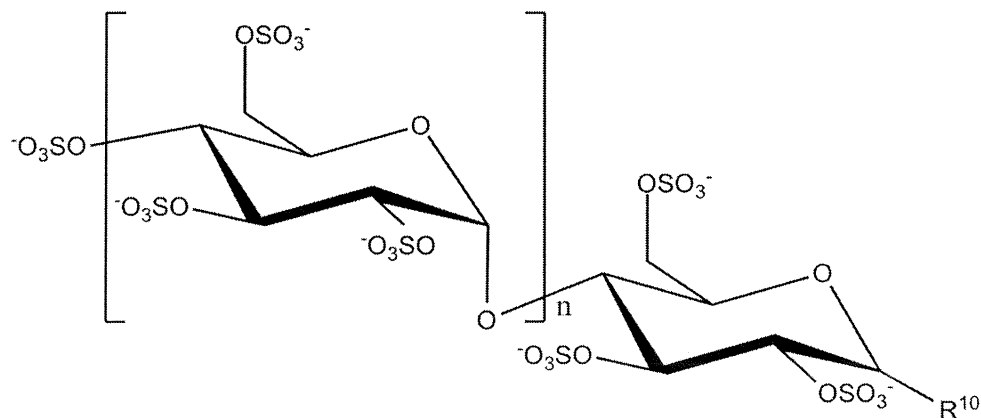
【 0 0 6 3 】

一つの実施形態では、医薬的に許容可能な塩はナトリウム塩である。

【 0 0 6 4 】

一つの実施形態では、化合物は一般構造式 (X I I I) を有する。

【 化 1 7 】



(X I I I)

30

【 0 0 6 5 】

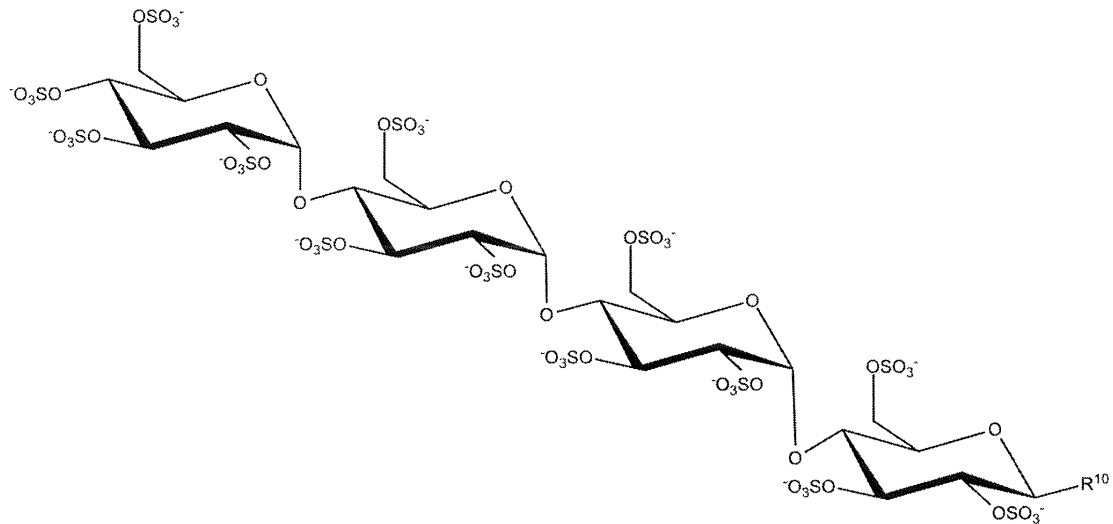
好ましい実施形態では、 n は 2、3 または 4 である。

40

【 0 0 6 6 】

一つの実施形態では、化合物は一般構造式 (X I V) を有する。

【化 1 8】

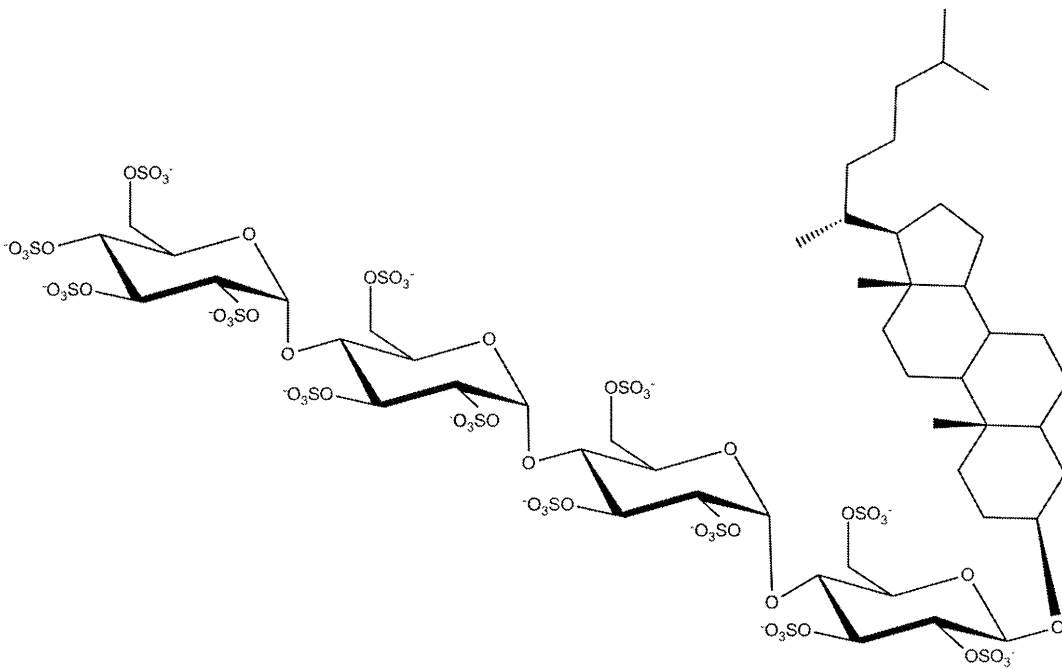


(XIV)

【 0 0 6 7】

好ましい実施形態では、式 (I) の化合物は式 (X) の化合物である。

【化 1 9】



(X)

【 0 0 6 8】

好ましい実施形態では、式 (I) の化合物は、3 - コレスタニル 2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - スルホ - - D - グルコピラノシル - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - スルホ - - D - グルコピラノシル - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - スルホ - - D - グルコピラノシル - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - スルホ - - D - グルコピラノシドトリデカナトリウム塩である。

【 0 0 6 9】

一つの実施形態では、式 (I) の化合物は一般構造 (I I I) を有し、

10

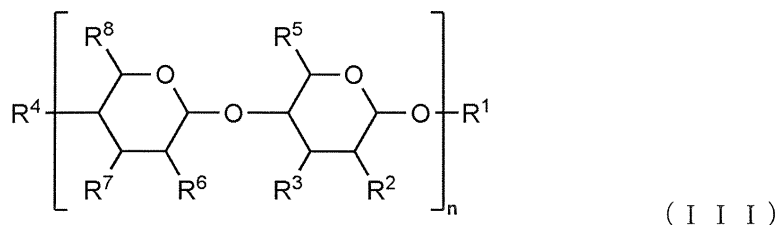
20

30

40

50

【化 2 0】



ここで、

- R¹ はアルキル、置換アルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、アルキルスルホニル、置換アルキルスルホニル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、エステル、アミド、アシル、置換アシル、アミノ、置換アミノ、チオアルキル、置換チオアルキル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、水素、およびハロゲンからなる群から選択され、

- 各 R² および R⁶ は独立して -OSO₃⁻、-OH、-NH₂、-NH₃⁺、-NHCH₃ および -OPO₃²⁻ からなる群から選択され、

- 各 R³ および R⁷ は独立して -OSO₃⁻、-OH および -OPO₃²⁻ からなる群から選択され、

- 各 R⁵ および R⁸ は独立して -CH₂OSO₃⁻、-CH₂OH、-COO⁻ および -CH₂OPO₃²⁻ からなる群から選択され、

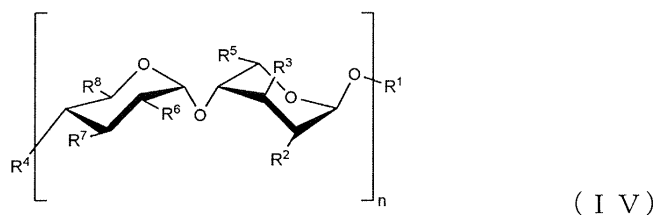
- 各 R⁴ は独立して -OSO₃⁻、-OH、-OPO₃²⁻ および -H からなる群から選択され、

- n は 1 以上の整数である。

【0070】

一つの実施形態では、式 (I) の化合物は一般構造 (IV) を有する。

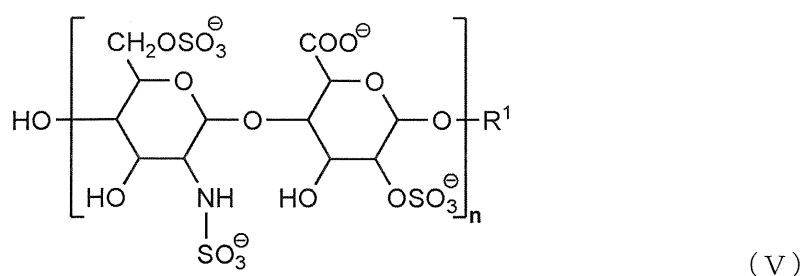
【化 2 1】



【0071】

一つの実施形態では、式 (I) の化合物は一般構造 (V) を有する。

【化 2 2】



【0072】

一つの実施形態では、式 (I) の化合物は一般構造 (VI) を有する。

10

20

30

40

50

Chemical structure of a repeating unit of a sulfated disaccharide derivative. The structure shows two pyranose rings linked by an O-glycosidic bond. The left ring is a 4-sulfated glucose derivative with a hydroxyl group at C2 and a sulfonate group at C4. The right ring is a 2-sulfated galactose derivative with a carboxylate group at C1 and a sulfonate group at C6. The repeating unit is enclosed in brackets with a subscript 'n'.

(V I)

10

ヘパリンおよび硫酸ヘパリンは反復するジサッカライド単位からなる。一つの実施形態では、式(III)~(VI)の化合物における反復単位の数は1である。別の実施形態では、式(III)~(VI)の化合物における反復単位の数は2である。別の実施形態では、式(III)~(VI)の化合物における反復単位の数は3である。別の実施形態では、式(III)~(VI)の化合物における反復単位の数は4である。別の実施形態では、式(III)~(VI)の化合物における反復単位の数は5である。別の実施形態では、式(III)~(VI)の化合物における反復単位の数は6である。別の実施形態では、式(III)~(VI)の化合物における反復単位の数は7である。別の実施形態では、式(III)~(VI)の化合物における反復単位の数は8である。別の実施形態では、式(III)~(VI)の化合物における反復単位の数は9である。別の実施形態では、式(III)~(VI)の化合物における反復単位の数は10である。

20

一つの実施形態では、式 (I) の化合物は一般構造 (V I I) を有する。

The chemical structure shows a disaccharide derivative in its chair conformation. It consists of two pyranose rings linked by an $\alpha(1\rightarrow3)$ glycosidic bond. The left ring is substituted with a hydroxyl group (OH) at C2, a hydroxyl group (OH) at C3, a sulfate group (OSO_3^-) at C4, and a carboxylate group (COO^-) at C6. The right ring is substituted with a sulfate group (OSO_3^-) at C2, a hydroxyl group (OH) at C3, a sulfate group (OSO_3^-) at C4, and a carboxylate group (COO^-) at C6. The terminal group on the right is an OR' group. The structure is highly polar due to the presence of multiple sulfate and carboxylate groups.

(V I I)

30

一つの実施形態では、化合物は一般構造 (VII) を有する。

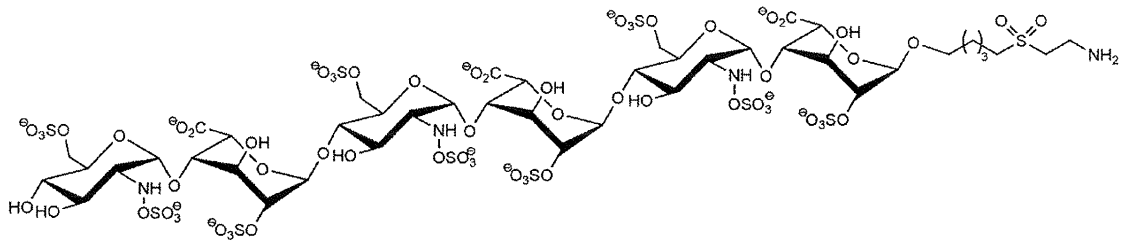
The chemical structure shows a linear chain of five pyranose rings in chair conformations, linked by 1→3 glycosidic bonds. From left to right: the first ring is a glucose derivative with a sulfated amino group at C2 (NHOSO₃⁻) and hydroxyl groups at C3 and C6; the second ring is a pyruvate derivative with a carboxylate group at C5 (COO⁻) and a hydroxyl group at C3; the third ring is a glucose derivative with a sulfated amino group at C2 (NHOSO₃⁻) and a hydroxyl group at C3; the fourth ring is a pyruvate derivative with a carboxylate group at C5 (COO⁻) and a hydroxyl group at C3; the fifth ring is a glucose derivative with a sulfated amino group at C2 (NHOSO₃⁻) and a hydroxyl group at C3. The chain is terminated at the right end by an R group attached to the C1 of the final glucose ring. Sulfate groups (SO₃⁻) are also attached to the C6 of the first, third, and fifth rings.

(V I I I)

40

特定の実施形態では、式 (I) の化合物はヘパリン I であり、次の構造を有する。

【化 2 6】



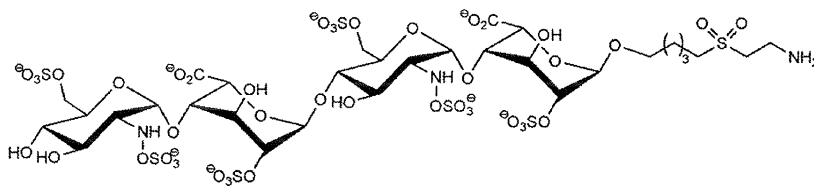
ヘパリン I

10

【 0 0 7 7】

特定の実施形態では、式 (I) の化合物はヘパリン V I I であり、次の構造を有する。

【化 2 7】



ヘパリン V I I

20

【 0 0 7 8】

いくつかの実施形態では、化合物はさらに当該化合物に共役体化されるアルブミン結合部分を含む。一つの実施形態では、アルブミン結合部分は脂肪酸であり、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、セロチン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノエライジン酸、 γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択され得る。

【 0 0 7 9】

いくつかの実施形態では、胆汁酸が式 (I) の化合物に共役体化される。一つの実施形態では、共役体化胆汁酸は、コール酸、タウロコール酸、グリココール酸、タウロケノデオキシコール酸、グリコケノデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、およびリトコール酸からなる群から選択される。

【 0 0 8 0】

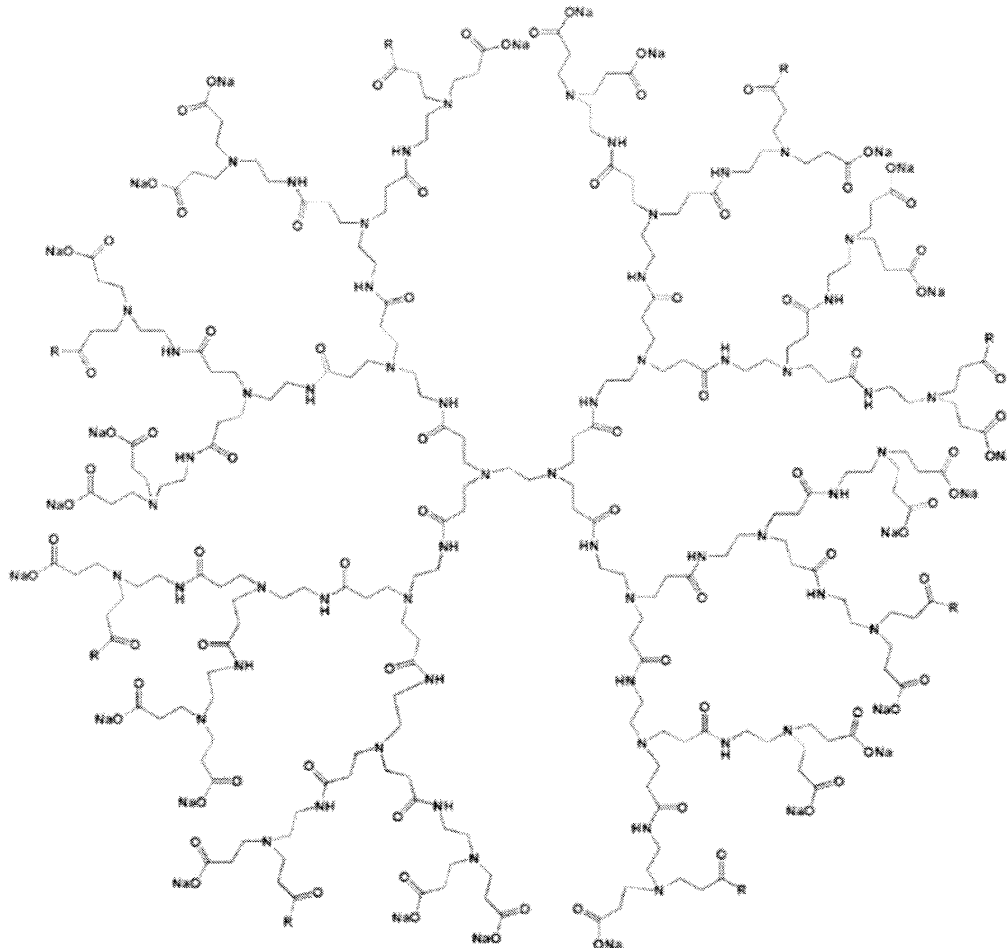
一つの実施形態では、式 (I) の化合物は、式：

30

40

50

【化 2 8】



の樹状構造に末端アミノ基（R）を介して共有結合される。

【0081】

ヘパリンアナログのPCSK9への結合

いくつかの実施形態では、ヘパリンアナログはHSPGのPCSK9への結合を阻害できる。いくつかの実施形態では、ヘパリンアナログは本明細書において後述されるようにPCSK9のアミノ酸残基のいずれかに結合する。HSPGが変異体へのPCSK9の結合を阻害できる化合物も本発明の範囲内であることが、本開示全体を通して理解されるであろう。PCSK9の変異体はSEQ ID NO: 1と本質的に同じ配列を有するポリペプチドと理解され、例えば、変異体はSEQ ID NO: 1のいくつかの残基の保存的置換を有する。

【0082】

いくつかの実施形態では、化合物はPCSK9（SEQ ID NO: 1）のアミノ酸残基78～167位の少なくとも1個、PCSK9（SEQ ID NO: 1）のアミノ酸残基78～92位の少なくとも1個など、アミノ酸残基93～97位の少なくとも1個など、アミノ酸残基98～103位の少なくとも1個など、アミノ酸残基104～105位の少なくとも1個など、アミノ酸残基106～135位の少なくとも1個など、アミノ酸残基136～139位の少なくとも1個など、アミノ酸残基140～164位の少なくとも1個など、アミノ酸残基165～167位の少なくとも1個などを含むPCSK9（SEQ ID NO: 1）のHSPG結合領域内の領域を特異的に認識し結合する。

【0083】

本明細書において、PCSK9（SEQ ID NO: 1）のアミノ酸残基78～167位の少なくとも1個、PCSK9（SEQ ID NO: 1）のアミノ酸残基78～167位

の少なくとも２個など、少なくとも５個など、少なくとも１０個など、少なくとも１５個など、少なくとも２０個など、少なくとも２５個など、少なくとも３０個など、少なくとも３５個など、少なくとも４０個など、少なくとも４５個など、少なくとも５０個など、少なくとも５５個など、少なくとも６０個など、少なくとも６５個など、少なくとも７０個など、少なくとも７５個など、少なくとも８０個など、少なくとも８５個など、すべてなどを含むＰＣＳＫ９（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１）のＨＳＰＧ結合部位内における領域を特異的に認識し結合する化合物が提供される。

【００８４】

いくつかの実施形態では、化合物はＰＣＳＫ９（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１）のアミノ酸残基 78～92 位の少なくとも１個、アミノ酸残基 93～97 位の少なくとも１個など、アミノ酸残基 98～103 位の少なくとも１個など、アミノ酸残基 104～105 位の少なくとも１個など、アミノ酸残基 106～135 位の少なくとも１個など、アミノ酸残基 136～139 位の少なくとも１個など、アミノ酸残基 140～164 位の少なくとも１個など、アミノ酸残基 165～167 位の少なくとも１個など、ＰＣＳＫ９（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１）のアミノ酸残基 78～167 位の少なくとも１個などを含む領域を特異的に認識し結合する。

10

【００８５】

いくつかの実施形態では、化合物はＰＣＳＫ９（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１）のアミノ酸残基 78～92 位、アミノ酸残基 93～97 位など、アミノ酸残基 98～103 位など、アミノ酸残基 104～105 位など、アミノ酸残基 106～135 位など、アミノ酸残基 136～139 位など、アミノ酸残基 140～164 位など、アミノ酸残基 165～167 位などの少なくとも１つを含む領域を特異的に認識し結合する。

20

【００８６】

このため、一つの実施形態では、化合物はアミノ酸残基 78～167 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 78～95 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 96～100 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 101～105 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 106～110 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 111～115 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 116～120 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 121～125 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 126～130 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 131～135 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 136～140 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 141～145 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 146～150 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 151～155 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 156～160 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。別の実施形態では、化合物はアミノ酸残基 161～167 位を含むＰＣＳＫ９のＨＳＰＧ結合部位内の領域を特異的に認識し結合する。

30

40

【００８７】

このため、ＰＣＳＫ９（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１）のＲ 93、Ｒ 96、Ｒ 97、Ｒ 104、

50

R 1 0 5、K 1 3 6、H 1 3 9、R 1 6 5およびR 1 6 7からなる群から選択される1個以上のアミノ酸、P C S K 9のR 9 3、R 9 6、R 9 7、R 1 0 4、R 1 0 5、K 1 3 6、H 1 3 9、R 1 6 5およびR 1 6 7からなる群から選択される1個のアミノ酸など、2個のアミノ酸など、3個のアミノ酸など、4個のアミノ酸など、5個のアミノ酸など、6個のアミノ酸など、7個のアミノ酸など、8個のアミノ酸など、すべてなどに結合する化合物が提供される。

【0088】

このため一つの実施形態では、化合物はP C S K 9のR 9 3に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 9 6に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 9 7に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 1 0 4に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 1 0 5に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のK 1 3 6に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のH 1 3 9に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 1 6 5に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 1 6 7に結合する。

10

【0089】

一つの実施形態では、化合物はP C S K 9のR 9 6におよびR 9 7に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 1 0 4およびR 1 0 5に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のK 1 3 6およびH 1 3 9に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 9 3およびH 1 3 9に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 9 3、R 1 0 4、R 1 0 5およびH 1 3 9に結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 1 6 5およびR 1 6 7と結合する。別の実施形態では、化合物はP C S K 9のR 9 3、R 9 6、R 9 7、R 1 0 4、R 1 0 5およびH 1 3 9に結合する。

20

【0090】

L D L RおよびL D L - C量

本明細書で開示される化合物のP C S K 9への結合は、当該化合物が存在しないときの結合と比べてL D L Rへの低下されたP C S K 9の結合をもたらす。これは次に、当該化合物の存在しないときの量と比べて、肝細胞由来細胞株などのL D L R発現細胞株から派生する細胞の、例えばそれらの表面における、増加されたL D L R量をもたらす。

【0091】

いくつかの実施形態では、化合物は前述で定められるヘパリンアナログであり、そのP C S K 9への結合は、当該ヘパリンアナログが存在しない結合と比べてL D L Rへの低下されたP C S K 9の結合をもたらす。これは次に、当該化合物の存在しないときの量と比べて、肝細胞由来細胞株などのL D L R発現細胞株から派生する細胞の増加されたL D L R量をもたらす。

30

【0092】

いくつかの実施形態では、化合物のP C S K 9への結合は、当該化合物が存在しないときの分解と比べて低下されたL D L Rのリソソーム分解をもたらす。特定の実施形態では、化合物は前述で定められるヘパリンアナログであり、ヘパリンアナログのP C S K 9への結合は、当該ヘパリンアナログが存在しないときの分解と比べて低下されたL D L Rのリソソーム分解をもたらす。

40

【0093】

いくつかの実施形態では、化合物のP C S K 9への結合は、当該化合物が存在しないときと比べて低下されたL D L - Cの血漿中濃度をもたらす。用語「血漿中L D L - C濃度」は、血漿中のL D L - Cの濃度、すなわちL D L - Cタンパク質の量を指すと理解される。特定の実施形態では、化合物は前述で定められるヘパリンアナログであり、ヘパリンアナログのP C S K 9への結合は、当該ヘパリンアナログが存在しないときと比べて低下されたL D L - Cの血漿中濃度をもたらす。

【0094】

L D L - Cの血漿中濃度はインビボまたはインビトロで測定され得る。血漿L D L - Cの血漿中濃度を測定する方法は従来技術で知られており、限定されないが、ウェスタンブロ

50

ット、免疫染色、E L I S A、超遠心分離、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（F P L C）および酵素比色測定が挙げられる。

【 0 0 9 5 】

リポタンパク質代謝の障害

本明細書において、リポタンパク質代謝の障害の治療での使用のための化合物を含む組成物が提供される。従って、本明細書においてリポタンパク質代謝の障害の治療のための医薬品の調製のための、本明細書で定められる化合物の使用も提供される。また、それを必要とする被験体におけるリポタンパク質代謝の障害の治療方法での使用のための、前述で定められる化合物が開示される。P C S K 9の配列は、被験体間で変化し得、例えば、保存的置換をもたらし得る個体特異的S N Pがいくつかの個体で認められ得る。このようなP C S K 9変異体へのH S P Gの結合を阻害する化合物はまた本発明の範囲内であることが、本開示全体を通して理解されるであろう。

10

【 0 0 9 6 】

いくつかの実施形態では、リポタンパク質代謝の障害は異常なP C S K 9血漿中濃度に関連する。他の実施形態では、リポタンパク質代謝の障害は肝細胞などのL D L R発現細胞の表面における異常なL D L R量に関連する。リポタンパク質代謝の障害はまた、異常なP C S K 9血漿中濃度および肝細胞などのL D L R発現細胞の表面における異常なL D L R量に関連し得る。P C S K 9血漿中濃度はヒトでは3 0 ~ 3 0 0 0 n g / m Lで変動する。異常なP C S K 9血漿中濃度は、健常な個体における平均濃度と有意に異なるP C S K 9の血漿中濃度を指す。いくつかの実施形態では、異常なP C S K 9血漿中濃度は、健常な個体における平均濃度よりも有意に高い。同様に、肝細胞などの表面における異常なL D L R量は、健常な個体における平均量と有意に異なるL D L R量を指す。いくつかの実施形態では、肝細胞などのL D L R発現細胞の表面における異常なL D L R量は、健常な個体における平均量よりも有意に低い。

20

【 0 0 9 7 】

いくつかの実施形態では、障害はL D L - Cの異常な量、特にL D L - Cの高い量によって特徴付けられる。

【 0 0 9 8 】

リポタンパク質代謝の障害は、脂質恒常性の障害およびこれと関連する障害であり、例として、高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、脂質異常症、高脂血症、高トリグリセリド血症、シトステロール血症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、メタボリック症候群、急性冠状動脈症候群、黄色腫、高血圧、狭心症、肥満、糖尿病、血管炎症および敗血症を含む。このような障害は、例えば、リポタンパク質粒子の構造的タンパク質における、様々な型のリポタンパク質を認識する細胞受容体における、または脂肪を分解する酵素における欠陥によって生じ得る。このような欠陥の結果として、脂質が血管の壁に沈着されるようになり得る。

30

【 0 0 9 9 】

高コレステロール血症（または脂質異常症）は、血中コレステロールの高い量の存在である。それは高脂血症（血中脂肪の高量）および高リポタンパク質血症（血中リポタンパク質の高量）の形態である。混合脂質異常症は、しばしばH D L コレステロールの低い量を伴うL D L コレステロール量およびトリグリセリド量の上昇である。家族性高コレステロール血症はL D L R遺伝子中の変異によって生じる遺伝性障害であり、血中の高いコレステロール量、特にL D L コレステロールによって特徴付けられる。

40

【 0 1 0 0 】

高トリグリセリド血症は、血中トリグリセリドの高い量を示す。トリグリセリドの高量はアテローム性動脈硬化症と関連し、高コレステロール血症が存在しない場合でさえ、心臓血管疾患に罹り易くする。非常に高いトリグリセリド量はまた、急性膵炎のリスクを増加する。

【 0 1 0 1 】

シトステロール血症またはフィトステローム血症は、例えば高コレステロール血症、腱お

50

よび結節黄色腫、アテローム動脈硬化症の早発をもたらす、食事性ステロールの過吸収および低下した胆汁排泄によって特徴付けられる稀な常染色体劣性遺伝性脂質代謝障害である。

【0102】

アテローム性動脈硬化症（動脈硬化性血管疾患またはASVDとしても知られる）は動脈硬化症の特定の型であり、動脈壁が生きた活性白血球（炎症を生じる）および死んだ細胞の残渣の両方を含む白血球の浸潤および蓄積の結果として肥厚し、コレステロールおよびトリグリセリドを含む。アテローム性動脈硬化症は従って、動脈壁における白血球の慢性炎症応答によって動脈血管に影響を及ぼす症候群である。

【0103】

動脈硬化症は、動脈壁の肥厚化、硬化、および弾性喪失を含む症状である。

【0104】

冠状動脈性心臓病は、アテローム硬化性動脈疾患、アテローム硬化性心臓血管病、冠状動脈心臓病または虚血性心臓病としても知られており、最も一般的なタイプの心臓病であり、心臓発作の原因である。本疾患は心臓の動脈の内壁に沿って蓄積するプラークによって生じ、動脈内腔を狭め心臓への血流を低下する。

【0105】

メタボリック症候群はエネルギーの利用および蓄積の障害であり、腹部（中心性）肥満、血圧の上昇、空腹時グルコースの上昇、高い血清トリグリセリド、および低い高比重コレステロール量の5つの医学的症状のうち3つの同時発生によって診断される。メタボリック症候群は心臓血管疾患、特に心不全、および糖尿病の発症リスクを高める。メタボリック症候群は、メタボリック症候群X、心血管代謝症候群、症候群X、インスリン抵抗性症候群、リーベン症候群、およびCHAOS（オーストラリアで）としても知られている。メタボリック症候群および前糖尿病は、異なる組み合わせのバイオマーカーで診断されるだけで、同じ障害であると考えられる。

【0106】

急性冠状動脈症候群は、冠状動脈における血流低下に起因する症状の一群を指し、心筋の一部が適切に機能できない、または機能しなくなる。

【0107】

黄色腫はリポドーシスの皮膚徴候であり、脂質が皮膚内の大型泡沫細胞に蓄積する。黄色腫は高脂血症と関連する。

【0108】

高血圧症または血圧上昇は、動脈性高血圧と呼ばれることもあり、動脈の血圧が上昇する慢性的な医学的症状である。

【0109】

狭心症（またはアンギナ）は、冠状動脈の閉塞または発作由来の心筋の虚血にしばしば起因する胸痛、圧迫、または圧搾の感覚を指す。狭心症は貧血症、不整脈および心不全から生じ得るが、その主な原因は冠状動脈疾患である。

【0110】

肥満は、過剰な体脂肪が健康に対して負の影響を有し得る程度まで蓄積されている医学的症状であり、平均寿命の短縮および/または健康問題の増加、例えば心臓疾患、2型糖尿病、閉塞性睡眠時無呼吸、ある種の癌、および骨関節炎のリスクの増加などをもたらす。

【0111】

真性糖尿病は、一般的に糖尿病と呼ばれ、長い期間にわたって高い血糖量である代謝疾患の一群である。いくつかの型の糖尿病があり、I型糖尿病、II型糖尿病および妊娠糖尿病が含まれる。1型糖尿病は、膵臓のランゲルハンス島のインスリン産生細胞の喪失によって特徴付けられ、インスリン欠乏をもたらす。2型糖尿病はインスリン抵抗性によって特徴付けられ、比較的低下したインスリン分泌と結び付けられ得る。インスリンに対する体組織の不完全な応答性は、インスリン受容体を含むと考えられる。妊娠糖尿病は2型糖尿病と類似しており、全妊婦の約2～10%で発生する。

10

20

30

40

50

【0112】

敗血症は、感染に対する体の応答がそれ自体の組織および器官を傷害するときに生じる、生命を脅かす可能性がある感染の合併症である。感染の際、LDL受容体も、循環からのリポポリサッカライドなどの細菌性脂質の除去に関与する。PCSK9阻害は、敗血症の患者の治療における病原性脂質排除を増加する有用な戦略であり得る(Wallley et al., 2016)。

【0113】

リポタンパク質代謝障害の治療

リポタンパク質代謝の障害の治療を必要とする個体または被験体は、リポタンパク質代謝の障害を有する、有することが疑われる、または有するリスクのある個体である。いくつかの実施形態では、治療を必要とする個体は哺乳動物、好ましくはヒトである。

10

【0114】

好ましい実施形態では、リポタンパク質代謝の障害は、脂質異常症、高コレステロール血症および冠動脈性心臓病からなる群から選択される。好ましい実施形態では、リポタンパク質代謝の障害は冠動脈性心臓病である。

【0115】

いくつかの実施形態では、治療は予防的である。

【0116】

いくつかの実施形態では、治療は本明細書で開示される化合物を当該被験体に投与するステップを含む。化合物は体重kgあたり0.1~1000mgの1日投与量で投与され得る。このためいくつかの実施形態では、化合物は体重kgあたり0.1~1000mgの1日投与量で投与され、体重kgあたり0.2~900mgなど、体重kgあたり0.3~800mgなど、体重kgあたり0.5~700mgなど、体重kgあたり1.0~500mgなど、体重kgあたり5~400mgなど、体重kgあたり10~300mgなど、体重kgあたり25~250mgなど、体重kgあたり50~200mgなど、体重kgあたり75~150mgなど、体重kgあたり100~125mgなどである。いくつかの実施形態では、化合物は体重kgあたり0.1~1000mgの1日投与量で投与され、体重kgあたり0.1~10mgなど、体重kgあたり10~25mgなど、体重kgあたり25~50mgなど、体重kgあたり50~100mgなど、体重kgあたり100~250mgなど、体重kgあたり250~500mgなど、体重kgあたり500~750mgなど、体重kgあたり750~1000mgなどである。

20

30

【0117】

本発明によって治療される徴候の根底にある病因は、患者の血中LDL-Cの増加された量である。このため、本発明の一つの態様は、LDLRの分解を阻害する方法に関し、それはLDLRに対するLDL-Cの増加された結合をもたらし、このため、患者は一般式(I)で定められる化合物を投与することによって治療される。

【0118】

従って、それを必要とする被験体における血漿LDL-C濃度を低下するための方法が本明細書において提供され、当該方法は本明細書で定められる化合物または医薬組成物を当該被験体に投与するステップを含む。血漿LDL-C濃度は、前述のように、従来技術で知られている任意の方法によってインビボまたはインビトロで測定できる。

40

【0119】

一つの態様では、本発明は、それを必要とする被験体における血漿リポタンパク質濃度を低下するための方法に関し、当該方法は本明細書で定められる化合物または医薬組成物を当該被験体に投与するステップを含む。

【0120】

医薬組成物

本明細書で定められる少なくとも1種類の化合物を含む医薬組成物も本明細書において開示される。いくつかの実施形態では、組成物は本明細書で開示される1種類の化合物を含む。他の実施形態では、組成物は2種類以上の化合物を含み、3種類以上の化合物など、

50

4 種類以上の化合物など、5 種類以上の化合物などを含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、組成物はさらに、

- PCSK9 の LDLR との結合を阻害する抗体、
- スタチン、
- コレスチラミン
- コレステロール吸収阻害剤、例えばエゼチミブ、

の少なくとも 1 種類を含む。

【0122】

いくつかの実施形態では、組成物は、PCSK9 の LDLR 結合部位に結合する抗体などの抗 PCSK9 抗体、またはスタチンなどの別の化合物と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、組成物はロデルシズマブ、ラルパンシズマブ、アリロクマブ、エボロクマブおよびボコシズマブからなる群から選択される抗体とともに投与される。

10

【0123】

このためいくつかの実施形態では、医薬組成物は本明細書で定められる少なくとも 1 種類の化合物、および PCSK9 の LDLR への結合を阻害する抗体、スタチンまたはコレスチラミンからなる群から選択される少なくとも 1 種類の追加化合物を含む。一つの実施形態では、医薬組成物は本明細書で定められる 1 種類の化合物、および PCSK9 の LDLR への結合を阻害する抗体を含む。一つの実施形態では、医薬組成物は本明細書で定められる 1 種類の化合物およびスタチンを含む。一つの実施形態では、医薬組成物は本明細書で定められる 1 種類の化合物およびコレスチラミンを含む。一つの実施形態では、医薬組成物は本明細書で定められる 1 種類の化合物、PCSK9 の LDLR への結合を阻害する抗体およびスタチンを含む。一つの実施形態では、医薬組成物は本明細書で定められる 1 種類の化合物、コレスチラミンおよびスタチンを含む。一つの実施形態では、医薬組成物は本明細書で定められる 1 種類の化合物、PCSK9 の LDLR への結合を阻害する抗体、スタチンおよびコレスチラミンを含む。

20

【0124】

医薬組成物は任意に 1 種類以上の医薬的に許容可能な担体添加剤を含み、例えば Remington: The Science and Practice of Pharmacy (薬学の科学および実践) 1995, edited by E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pa. で報告されているように、従来技術によって調製される。組成物は、例えば、カプセル、錠剤、エアゾール、溶液、懸濁液または局所適用などの標準的な剤形で提供され得る。一般的に、本発明の医薬組成物は、例えば静脈内または皮下注射などによる非経口投与用に製剤化され、アンプル、プレフィルドシリンジ、小容量注入における単位用量剤形、または添加される保存剤とともに多回用量容器で提供され得る。組成物は、油性または水性賦形剤中の懸濁液、溶液、またはエマルションなどの剤形、例えば水性ポリエチレングリコール中の溶液を用い得る。組成物は経口摂取に適したものであり得る。これは特に小分子組成物と関連する。油性または非水性の担体、希釈剤、溶媒または賦形剤の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物オイル (例えば、オリーブオイル)、および注射可能な有機エステル (例えば、オレイン酸エチル) を含み、保存剤、湿潤剤、乳化剤または懸濁剤、安定剤および / または分散剤などの製剤用薬剤を含み得る。あるいは、有効成分は、適切な賦形剤、例えば殺菌したパイロジェンフリー水を用いて使用前に構成するために、殺菌した固体の無菌分離、または溶液からの凍結乾燥によって得られる粉末剤形であり得る。オイルは非経口製剤において有用であり、石油、動物、植物、および合成オイルを含む。このような製剤で有用なオイルの具体的な例は、ピーナッツ、ダイズ、ゴマ、メンミ、コーン、オリーブ、石油、およびミネラルを含む。非経口製剤における使用に適した脂肪酸は、オレイン酸、ステアリン酸、およびイソステアリン

30

40

50

酸を含む。オレイン酸エチルおよびミリスチン酸イソプロピルが適切な脂肪酸エステル
の例である。非経口製剤は一般的に、溶液中に有効成分を重量で約 0.5 ~ 約 25 % 等、
約 0.0001 ~ 約 25 % 含む。保存剤および緩衝剤が使用され得る。注射部位の刺激を
最小限にする、または排除するために、このような組成物は約 12 ~ 約 17 の親水性 - 親
油性バランス (HLB) を有する 1 種類以上の非イオン性界面活性剤を含み得る。このよ
うな製剤における界面活性剤の量は、一般的に重量で約 0.000001 ~ 約 15 % の範
囲であり、重量で約 0.000001 ~ 約 5 % または重量で約 5 ~ 約 15 % などである。
適切な界面活性剤は、ソルビタンモノオレートなどのポリエチレンソルビタン脂肪酸エ
ステル、およびプロピレンオキシドとプロピレングリコールの縮合によって生成される、
疎水性塩基を有するエチレンオキシドの高分子量付加物を含む。非経口製剤は、アンプル
およびバイアルなどの容器に密封された単位用量または多回用量で提供され得、使用直前
に注射のために例えば水などの無菌液体賦形剤の添加のみを必要とするフリーズドライ (凍結乾燥) 状態で保存され得る。

10

【0125】

しかし、本発明による薬剤送達の主な経路は、薬剤を血流に導入して最終的に関連組織を
標的にするために、非経口である。

【0126】

一つの実施形態では、薬剤は、生物学的に活性な物質が与えられる動物のいずれかの粘膜
を通過するように投与され、例えば、鼻腔、膣、眼、口腔、生殖器、肺、胃腸管、または
直腸など、好ましくは鼻腔または口腔で投与される。

20

【0127】

好ましい実施形態では、本発明の薬剤は非経口的、すなわち静脈内、筋肉内、脊髄内、皮
下、鼻腔内、直腸内、膣内または腹腔内投与によって投与される。非経口投与の皮下およ
び筋肉内剤形が一般的に好ましい。このような投与に適した投与剤形は、従来技術によっ
て調製され得る。化合物はまた、吸入によって投与され得、それは鼻腔内および経口吸入
投与による。このような投与に適した投与剤形、エアゾール製剤または計量式吸入器など
は、従来技術によって調製され得る。

【0128】

一つの実施形態では、本発明による医薬組成物は、注射によるなどの非経口投与用に製剤
化される。

30

【0129】

さらなる実施形態では、本発明による医薬組成物は、静脈内、筋肉内、脊髄内、腹腔内、
皮下、ボラスまたは持続投与のために製剤化される。

【0130】

投与の速度および頻度は症例ごとにに基づき医師によって決定され得る。一つの実施形態で
は、投与は 30 分 ~ 24 時間の間隔で行われ、1 ~ 6 時間など、1 日 1 回などである。

【0131】

治療期間は障害の重度に応じて変動し得る。一つの実施形態では、治療期間は 1 ~ 28 日
であり、2 ~ 25 日など、5 ~ 20 日など、7 ~ 15 日などである。慢性症例では、治療
期間は終生であり得る。

40

【0132】

投与量は患者の特性、ならびに投与の手段および方式に基づいて担当の医師によって決定
され得る。本発明の一つの実施形態では、前述で本明細書において定められる医薬組成物
の有効化合物の投与量は、kg 体重あたり 0.1 ~ 1000 mg である。

【0133】

投与量は、ボラス投与として、または持続投与として投与され得る。ボラス投与に関
して、医薬組成物は 1 日 1 回など、30 分 ~ 24 時間の間隔で投与され得る。

【0134】

いくつかの実施形態では、組成物の pH は pH 4 ~ 10 である。

【0135】

50

いくつかの実施形態では、組成物は経口投与用に製剤化される。

【0136】

いくつかの実施形態では、組成物は非経口投与用に製剤化される。特定の実施形態では、非経口投与は注射による。このような非経口は、静脈内、筋肉内、脊髄内、腹腔内、皮下、ボーラスまたは継続投与であり得る。

【0137】

一つの実施形態では、本明細書で開示される組成物は血清中で安定なヘパリンアナログである。

【0138】

また本明細書において、特に投与後に非毒性である、前述で定められる化合物が提供される。いくつかの実施形態では、化合物は投与後に非毒性であるヘパリンアナログである。

【0139】

例

例1：PCSK9中のHSPG結合部位のマッピング。

PCSK9 (PDB: 2PMW) の静電表面を試験し (図2B)、PCSK9プロドメインに位置する6個の表面暴露された塩基性残基からなる推定ヘパリン結合部位を特定した。結合部位は93、96、97、104、および105位のアルギニン (R) 残基および139位のヒスチジン (H) によって形成され、これはヘパリンペンタサッカライド (SANG) の硫酸基と完全な対を示す (Herbertら, 1996) (Herbertら, 1996) (図2Bおよび2C)。この部位はPCSK9の不活性触媒領域に位置するLDLR結合表面の反対側に認められる (図2A)。LDLR (PDB: 3P5B) との複合体におけるPCSK9の共結晶構造へのヘパリンフラグメントの結合は、硫酸ヘパラン結合がその後のPCSK9: LDLR複合体形成を可能にすることを示唆する (図3C)。

【0140】

例2：ヘパリナーゼ処理はインビトロでPCSK9細胞表面会合を阻害しかつインビボでPCSK9誘発性分解に対しLDL受容体を保護する。

本発明者らはHSPGがPCSK9の捕捉に関与し得ると推測した。このため、PCSK9を安定に発現するヒト肝細胞由来HepG2細胞をヘパリナーゼIで処理した。酵素ヘパリナーゼIは硫酸ヘパランGAG鎖をウロン酸とN-アセチル-D-グルコサミンの間の1,4O-結合で切断し、これによって細胞表面硫酸ヘパラン鎖を取り除く。

【0141】

PCSK9で安定にトランスフェクションされたHepG2細胞を、カバーガラスあたり50,000個で播種し一昼夜インキュベーションし、その後PBS中のヘパリナーゼI (シグマアルドリッチ、H2519) (0.0002 UN/mL) またはPBSのみを添加した。細胞を37で1時間インキュベーションしてから4%パラホルムアルデヒドで固定し、非透過細胞を第一および第二抗体によって免疫染色した。核をHoechst色素 (シグマアルドリッチ) で視覚化した。画像をZeiss LSM780で取得した。

【0142】

実際に、処理は表面PCSK9染色の強度の顕著な低下をもたらし、HSPGがPCSK9細胞結合にとって重要であることを示唆した (図2D)。

【0143】

インビボでのPCSK9活性に対する硫酸ヘパランGAGの酵素的除去の効果を試験するため、10~12週齢雄BALB6/cJ Rjマウスに、PCSK9 (10 µg) の注射5分前に、尾静脈カテーテルを通して投与するヘパリナーゼI (30 U) を注入した。コントロールマウスでは、ヘパリナーゼ注射および/またはPCSK9注射を0.9%生理食塩水の注射に代えた。ヘパリナーゼ注入の間、マウスはマスクを通して継続的に投与されるイソフルランによって軽く麻酔された。注射1時間後、マウスを殺し肝細胞サンプルを収集し、タンパク質の抽出およびウェスタンブロットによるLDLR量の評価前に急速凍結した (図10A)。ヘパリナーゼIの注射はPCSK9誘発性分解からLDLRを

10

20

30

40

50

完全に防ぎ、HSPGがインビボでのLDLRのPCSK9誘発性分解において有用であることを示す(図10AおよびB)。

【0144】

PCSK9と硫酸ヘパランGAG鎖の間の直接的な相互作用を確認するため、ヘパリンと共有結合されたセファロースビーズを用いるアフィニティークロマトグラフィーを使用した。

【0145】

精製PCSK9を、PBS中の5mLのHiTrapヘパリンHPカラム(GEヘルスケア)に加えた。カラムをAktaprimeに接続し、5カラム容量の10mMのNaH₂PO₄(pH7.4)で洗浄した。PCSK9を10mMのNaH₂PO₄(pH7.4)と2MのNaClの直線勾配を用いて溶出し、画分をSDS-PAGEによって分析した。測定された導電率に基づき、溶出プロファイルを変換係数0.065mS/mM NaClを用いてNaCl濃度の関数に変換した。精製PCSK9はヘパリンカラムに保持され約500mMのNaCl濃度で溶出され(図2E)、ヘパリンとの強く高い特異的相互作用を示した。

【0146】

別の実験では、目的のPCSK9変異体でトランスフェクションしたHepG2細胞またはCHO細胞からの条件化培地を、10mM NaH₂PO₄(結合緩衝液)中のヘパリンセファロースCL-6Bビーズ(GEヘルスケア)とインキュベーションした。ローター上で4に overnight インキュベーション後に、ビーズを結合緩衝液で洗浄し、その後NaClの濃度を高めてヘパリン結合タンパク質をバッチ溶出した。添加、フロースルー、および溶出画分中のPCSK9をウェスタンブロッティングによって評価した。

【0147】

HepG2細胞の条件化培地由来の内因性PCSK9もヘパリンと結合し、十分確立されているHSPG結合タンパク質であるアポEと同様の溶出プロファイルを示すことを認めた。(図3D)。

【0148】

例3: PCSK9/HSPG相互作用にとって重要な残基の同定。

PCSK9/HSPG相互作用に關与する重要な残基をさらに絞り込むため、HSPG結合モチーフに点変異を有するPCSK9変異体をクローニングし発現させた。変異はPCRによって導入し、3D構造モデル結合によって同定された荷電アミノ酸アルギン(Arg/R)、リジン(Lys/K)、およびヒスチジン(His/H)を、アラニン(Ala/A)などの中性残基によって置換した。

【0149】

ヒト野生型および下記のアラニン置換変異体を分析した。

野生型PCSK9(SEQ ID NO: 1)

変異体R93

変異体R96R97

変異体R104R105

変異体R165R167

変異体R93R104R105H139A

変異体R93R96R97R104R105H139

【0150】

不適切に折り畳まれたPCSK9は一般的に、プロペプチドに切断されず、従って小胞体に留まるため、PCSK9変異体の正しい折り畳みを、それらのプロセッシングおよび分泌をモニタリングすることによって評価できる。プロPCSK9の成熟タンパク質へのプロセッシングおよび成熟PCSK9変異体の分泌を、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞の一時的トランスフェクション、続いて細胞溶解物および周辺培地中のPCSK9のウェスタンブロット分析によって評価した(図3A)。

【0151】

ヘパリンに結合するPCSK9変異体タンパク質の能力を、アフィニティークロマトグラフィー、続いて抗PCSK9抗体によるウェスタンブロットティングによって評価した。目的のPCSK9変異体でトランスフェクションしたCHO細胞からの条件化培地を、10 mM NaH₂PO₄（結合緩衝液）中のヘパリンセファロースCL-6Bビーズ（GEヘルスケア）とインキュベーションした。ローター上で4 にて一昼夜インキュベーション後に、ビーズを結合緩衝液で洗浄し、その後NaClの濃度を高めてヘパリン結合タンパク質をバッチ溶出した。添加、フロースルー、および溶出画分中のPCSK9をウェスタンブロットティングによって評価した。

【0152】

変異体R93、R96R97およびR104R105は野生型PCSK9または変異体R165R167と比べてヘパリンに対して低い親和性を示し、変異体R93R104R105H139およびR93R96R97R104R105H139はヘパリンを結合せず、フロースルーにのみ認められる（図3B）。

10

【0153】

例4：変異されたHSPG結合領域を有するPCSK9変異体はLDL受容体分解を誘発できない。

精製PCSK9変異体を細胞アッセイで試験して、野生型PCSK9と比較してLDLRの分解を誘発するそれらの能力を試験した。LDLR分解の誘発は、野生型PCSK9（WT）または上記PCSK9変異体とのHepG2細胞のインキュベーションによって分析し、LDLR量をウェスタンブロットティングによって評価した。HepG2細胞を12ウェルプレートにウェルあたり250,000個の密度で接種した。一昼夜インキュベーション後、培地をPCSK9WTまたは変異体R93R96R97R104R105H139を含む新鮮な培地と交換した。細胞を収集し18時間インキュベーション後に溶解し、LDLR量をウェスタンブロットティングおよびデンストメトリーによる定量によって評価した。

20

【0154】

変異体R93R96R97R104R105H139とインキュベーションされた細胞中のLDLR量は、WT PCSK9とインキュベーションされた細胞中で測定された量と比べて顕著に高く（約2倍）（図4AおよびB）、HSPG結合領域内の変異がPCSK9誘発性LDLR分解の低下をもたらしたことを示す。

30

【0155】

例5：ヘパリンおよびヘパリンアナログはPCSK9：LDLR複合体形成を妨げる。近接ライゲーションアッセイ（PLA）を用いて、外因的に加えられたヘパリンが内因性PCSK9の結合に対し細胞表面HSPGと競合し、これによってPCSK9：LDLR複合体形成を妨げるかどうか試験した（Soderbergら，2006）。

【0156】

PLA（Duolink（登録商標）II，Olink Bioscience）を、第一抗体として抗PCSK9（R&D systems、AF3888）、および抗LDLR（Abcam、ab52818）を用いて、製造業者のプロトコルに従って実施した。互いに30 nm以内に位置するPCSK9とLDLRを、環状オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションしローリングサイクル増幅を開始させるオリゴヌクレオチド共役体第二抗体によって視覚化する。増幅されたDNAを、相補的な蛍光標識オリゴヌクレオチドの添加によって視覚化する（Soderbergら，2006）。

40

【0157】

このアッセイを非透過処理HepG2細胞中の内因性の細胞表面PCSK9およびLDLRに対して用いて、PCSK9：LDLR複合体の多量なクラスターが観察された（図5D）。これらはヘパリンとのインキュベーションで数および強度の両方が顕著に低下され、HSPGへのPCSK9結合が、その後の細胞表面LDLRとの複合体形成において役に立つことを示唆する。

【0158】

50

Hep G2 細胞のヘパリン (50 U/mL、18 時間) とのインキュベーションは LDL R タンパク質の 2 ~ 3 倍高い量をもたらした (図 5 A ~ 5 B) ことを認め、同様な効果が低分子量ヘパリンの他の 2 種の治療用調製物で観察された (図 8 A)。

【0159】

ヘパリン処理した Hep G2 細胞中の細胞 LDL R の増加は用量依存的であり、培地中の PCSK9 の顕著な増加を伴った (図 6 B)。PCSK9 濃度を R & D Systems から入手したヒト (DPC900) Quantikine ELISA キットを用いて、製造業者のプロトコルに従って測定した。

【0160】

ヘパリンによって誘発された細胞 LDL R および細胞外 PCSK9 の増加は、最も高いヘパリン濃度での PCSK9 以外、mRNA での変化を認めなかったため、翻訳後の段階で生じた (図 6 C)。

【0161】

Hep G2 細胞からの RNA 抽出を NucleoSpin RNA 調製キット (Macherey-Nagel) を用いて行い、続いての 0.5 µg RNA 鋳型からの cDNA 合成を iScript (商標) cDNA 合成キット (BIO RAD) を用いて実施した。リアルタイム PCR を以下のプライマーを用いて iQ SYBR (登録商標) Green スーパーミックスおよび iTaq (商標) ポリメラーゼにより実施して、LDLR (フォワードプライマー 5' ACGGCGTCTCTTCTATGACA3'、リバープライマー 5' CCTTTGGTATCCGCAACAGA3')、PCSK9 (フォワードプライマー 5' CCTGGAGCGGATTAC-CCCT3'、リバープライマー 5' CTGTATGCTGGTGTCTAGGAGA3')、および GAPDH (フォワードプライマー 5' ACAACTTTGGTATCGTGGAAAGG3'、リバープライマー 5' GCCATCACGCCACA-GTTTTC3') の転写物を検出した。

【0162】

25 U/mL ヘパリンが、PCSK9 mRNA の 2 倍増加にも関わらず、LDLR の約 2.5 倍の増加から証明されるように PCSK9 活性と効果的に拮抗することを認めた (図 8 B)。

【0163】

ヘパリン (50 U/mL) と 24 時間インキュベーションされた Hep G2 細胞はウェスタンブロッティングによって評価したとき、LDLR 量の増加を示した (図 5 A)。LDLR 量をデンストメトリーによっても定量した (n = 4) (図 5 B)。ヘパリンとのインキュベーションは、ELISA によって測定されるとき、培地における PCSK9 量の増加ももたらした (図 5 C)。

【0164】

ヘパリンは、製造業者のプロトコルに従い PCSK9 / LDLR 結合アッセイ (BPS Bioscience) によって分析するとき、PCSK9 と LDLR の間の直接的な相互作用に干渉しない (図 6 A)。簡単に説明すると、LDLR 細胞外領域でコーティングされたマイクロタイタープレートウェルを、ヘパリン (5 または 50 U/mL) または PCSK9 の LDLR 結合領域に対する抗 PCSK9 抗体 ((BPS Bioscience No. 71207) の存在下で、ビオチニル化 PCSK9 とインキュベーションした。洗浄後、ウェルをホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識ストレプトアビジンとインキュベーションし、PCSK9 の LDLR 細胞外領域への結合を HRP 基質の添加および化学発光マイクロプレートリーダーを用いるシグナルの測定によって評価した。

【0165】

PCSK9 と LDLR の間の相互作用はヘパリンの添加によって影響されず、ヘパリンの PCSK9 への結合は、PCSK9 と細胞表面 HSPG の相互作用を妨げることによって LDLR 分解の低下をもたらすことが示される。

【0166】

フォンダパリヌクス (アリクストラ) (25、100、または 250 µg/mL) と 24

10

20

30

40

50

時間インキュベーションしたHepG2細胞は、ウェスタンブロッティングによって評価したとき、LDLR量の増加を示した(図7)。これらの結果は、フォンダパリヌクスなどのヘパリンアナログのPCSK9との結合は、PCSK9と細胞表面HSPGの相互作用を妨げることによってLDLR分解の低下をもたらすことを示す。

【0167】

例6：ヘパリン模倣剤はPCSK9：LDLR相互作用を妨げる。

ヘパリンの構造を模倣するいくつかの分子が多くの治療適用のためにここ100年にわたって開発されており、いくつかが現在臨床使用されている。これらはヘパリン模倣剤と称され、様々なオリゴサッカライド、オリゴヌクレオチドおよびナフタレン誘導体を含む、多様な化学系統に属する。ヘパリン模倣剤のサブセットを、HepG2細胞中でPCSK9を結合しLDLRを増加するそれらの能力について試験した(図9)。

【0168】

PCSK9とリガンド(スラミン、硫酸デキストラン5000、デキストラン5000、硫酸ペントサンおよびS-dC-36)の間の平衡結合親和性を、マイクロスケール熱泳動(MST)(Jerabek-Willemsenら, 2011)を用いて評価した。PCSK9をMO-L003 Monolith Blue-NHS標識キット(NanoTemper Technologies)によって標識し、色素に対するタンパク質のモル比1:1の標識効率を達成した。PCSK9を100nMの最終濃度で加えた。非標識結合パートナーを1:1希釈(PBS+0.05%ツイーン20)で用量設定し、最大濃度はスラミンで15.4mM、硫酸デキストラン5000で2.3mM、デキストラン5000で2.3mM、硫酸ペントサンで16.3mM、およびS-dC-36で250μMだった。MST測定を、20%LEDおよび80%MST出力を用いてMonolith NT.115装置(NanoTemper Technologies)によって標準処理したキャピラリー(NanoTemper Technologies)で実施した。レーザーのオンおよびオフ時間はそれぞれ5秒および35秒だった。陰性コントロールは、全16本のキャピラリーでMST緩衝液中の100nMの標識PCSK9を用いて、上記と同一条件で実施した。結合曲線を、スラミン、硫酸デキストラン5000およびS-dC-36について80%MST出力の温度ジャンプ相から、硫酸ペントサンについて80%MST出力の熱拡散+温度ジャンプ相から得た。各結合パートナーについて、シグモイド型用量-応答曲線をGraphPad Prism6によってフィッティングして平均KD値を得た。PCSK9の蛍光消失が高濃度のスラミンの存在下で観察されたため、変性試験を、PCSK9を10%SDSで前処理しサンプルを90°Cで15分間加熱してからMST装置で分析することによって実施した。これは消失効果を排除し、非変性条件下のPCSK9の蛍光消失が実際のリガンド結合事象に起因することを示した。

【0169】

硫酸化オリゴサッカライドである硫酸デキストラン(図9C)および硫酸ペントサン(図9F)はMSTを用いて測定したとき、ともにPCSK9にそれぞれ179.5μMおよび381.3μMの親和性で結合し、細胞LDLRの用量依存的増加をもたらした(図9A~Bおよび図9D~E)、コントロールと比べて約400%のプラトーに達し、このアッセイにおいてスタチンの最大効果よりも著しく優れていた。相互反応は、非硫酸化デキストランがPCSK9に対する親和性を示さなかったように、硫酸基の存在に依存した。硫酸化ナフタレン誘導体であるスラミンは、アフリカ睡眠病の抗寄生虫剤であり、190μMの親和性でPCSK9と結合し(図9H)最大で15倍のLDLRの増加(図9A、9G)をもたらした。蛍光標識LDL粒子の細胞内取り込みの増加を伴った(図12)。さらに36マー一本鎖DNA分子(ホスホロチオアートオリゴデオキシシチジン、S-dC-36)を試験し、それが4.8μMのKDでPCSK9を結合し(図9K)、この濃度範囲で強力な阻害効果を示したことを認めた(図9I~J)。

【0170】

例7：PCSK9は特定の糖組成物および硫酸化パターンに選択性を示す。

PCSK9の負電荷糖との相互作用の特異性および選択性を詳細に調査するため、ヘパリ

10

20

30

40

50

ンの所定の鎖長および硫酸化パターンを含む固定された合成細胞外マトリックスグリカン（図14A）ならびに関連するグリコサミノグリカンである硫酸ケラタンおよび硫酸デルマタンからなるグリカンマイクロアレイへのPCSK9結合を分析した。

【0171】

硫酸ヘパラン/ヘパリンの合成オリゴサッカライド、硫酸ケラタン、硫酸デルマタンおよび5kD天然ヘパリン（Santa Cruz）を含む細胞外マトリックスグリカンマイクロアレイを、250μMスポッティング溶液を用いて既に報告されているように調製した（Hechtら, 2009、de Pazら, 2006）。スポッティング後に、マイクロアレイスライドを湿潤なチャンバー中で一昼夜インキュベーションし、続いて水で3回洗浄し、50mMエタノールアミン溶液、pH9.により50で1時間クエンチングして残存反応基を除いた。スライドを水で3回洗浄し、PBS中の1%（w/v）BSA、pH7.4で室温で1時間ブロッキングし、遠心分離（5分、300×g）により乾燥した。1%（w/v）BSA-PBSで希釈したPCSK9（25μg/mL）を湿潤なチャンバー中で4一昼夜インキュベーションした。0.1%（v/v）ツイーン-PBSによる3回洗浄ステップ後、1%BSA-PBSで希釈されブレインキュベーションされた0.1μg/mLヒト化抗PCSK9mAbおよび5μg/mLヤギ抗ヒトIgG Alexa Fluor 647（Life Technologies）とのインキュベーションを室温で1時間実施した。スライドを0.1%（v/v）ツイーン-PBSで3回洗浄し、水で1回すすぎ遠心分離により乾燥した。データ取得のため、スライドをGenePix 4300マイクロアレイスキャナー（Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, USA）を用いて、Alexa Fluor 647を635nmで励起してスキャンした。光増幅装置（PMT）値を、飽和なしにスキャンを示すように設定した。中央蛍光値をGenePix Pro7ソフトウェア（Molecular Devices）により決定した。

【0172】

PCSK9は、それぞれ3回および2回の反復を含む硫酸ヘパラン/ヘパリン構造IおよびVIIの結合から明らかなように、[4)- - GlcN-6, N-二硫酸(14)- - IdOA-2-硫酸-(1)]からなるヘパランジサッカライド反復に対する選択性を示した（図14B）。1つの反復のみからなる硫酸ヘパラン/ヘパリン下位構造では結合が観察されず、効率的な結合には最小限2回反復が必要とされた。GlcNのアミノ基における硫酸基およびGlcNの炭素6位およびIdOAの炭素2位におけるエステル結合した硫酸基の必要性も、硫酸ヘパラン/ヘパリン下位構造であるヘパランI、ヘパランIIおよびヘパランIIIへの結合を比較することにより明らかだった。

【0173】

これらの結果は、特定の糖組成および硫酸化パターンに対するPCSK9の優先性を実証した（図14B）。

【0174】

例8：低分子量ヘパリンの治療用調製物はLDLRをPCSK9により誘発される分解に対して保護する。

低分子量ヘパリン調製物であるフラグミン（1~100U/mL）またはイノヘップ（1~100U/mL）と一昼夜インキュベーションされたHepG2細胞は、ウェスタンブロッティングで評価したとき、増加したLDLR量を示した（図8A）。フラグミンおよびイノヘップの効果は、ヘパリン（図5A）およびペンタサッカライドであるアリクストラ（図7）の効果に匹敵した。

【0175】

これらの結果は、鋳型としてヘパリン：PCSK9複合体を用いる構造をベースとした薬剤設計が、小分子PCSK9阻害剤の開発に適していることを示す。

【0176】

例9：ヘパリンはインビボでLDLRをPCSK9により誘発される分解から保護する。マウス（BALB6/cJRj）に10μgのヒト組換えPCSK9単独のまたはヘパリ

10

20

30

40

50

ン(50U)と組み合わせた単回静脈投与(尾静脈)を実施した。注射の1時間後、マウスを殺し肝組織を収集した。膜タンパク質調製物でのLDLRのウェスタンブロット分析は、ヘパリンとの共注射を受けたマウスは、PCSK9単独を注射されたマウスと比べて有意に高い肝LDLR量を示した(図8B、図8Cで定量)。

【0177】

これらの結果は、PCSK9：ヘパリン相互作用が小分子PCSK9阻害剤の開発のための枠組みをもたらし得ることを示す。

【0178】

例10：スタチン治療に応答しない患者においてLDLコレステロールを低下する。増加したLDLコレステロールを有する患者はスタチン治療を処方される。患者はスタチン治療に応答しない。患者は次いでヒトPCSK9中のHSPG結合部位をブロックするように設計されるヘパリンアナログを含む組成物の25～500mgの皮下注射による治療を処方される。注射を1～28日の間隔で実施する。LDL-C量の顕著な低下が認められ、ヘパリンアナログの非経口投与がスタチン治療に応答しない患者においてLDL-C量の低下をもたらし得ることを示す。

10

【0179】

例11：PCSK9のHSPG結合部位に対するヘパリンアナログを用いてLDLコレステロールを低下する。

増加したLDLコレステロールを有する患者は、ヒトPCSK9中のHSPG結合部位をブロックするように設計されるヘパリンアナログの投与を処方される。化合物は0.1～30mg/kgの用量にて経口で投与される。LDL-C量の顕著な低下が認められ、ヒトPCSK9中のHSPG結合部位をブロックするように設計されるヘパリンアナログの経口投与が患者においてLDL-C量の低下をもたらし得ることを示す。

20

【0180】

例12：スタチン治療に応答しない患者においてLDLコレステロールを低下する。患者は増加したLDL-C量に対してスタチン治療を受ける。しかし、LDL-Cの最初の低下後に、スタチンにより誘発されたPCSK9の発現増加によって、治療はLDL-C量を有意に低下させることに成功しない。

【0181】

スタチンに加えて、患者はHSPGのPCSK9への結合を阻害する化合物を投与される。投与は毎週、スタチンと組み合わせた化合物の低用量(25～150mg)で行われる。LDL-C量の顕著な低下が認められ、所望のLDL-C量にいたる。

30

【0182】

この例は、スタチンをベースとする治療にヘパリンアナログの投与を補充することによって、LDL-C量をうまく低下し得ることを示す。

【0183】

例13：変異されたHSPG結合部位を有するPCSK9はLDLコレステロール量を増加できない。

野生型PCSK9およびPCSK9のHSPG結合変異体を、CGジヌクレオチドフリー発現プラスミド(In vivo gen)の流体力学尾注射によってマウスの肝臓で過剰発現させ、これらのプラスミドはCG塩基対のメチル化によって不活性化する傾向がある従来のプラスミドと比べて長期の発現を示す。野生型PCSK9の過剰発現は、LDLRの分解の増加を誘発し、血清LDLコレステロールの上昇をもたらす、これによって「機能獲得」変異体として作用する。PCSK9のHSPG変異体は、「機能喪失」変異体として作用し、LDL受容体の分解低下によって血清LDLコレステロール量増加を低く上昇させる。

40

【0184】

結果は、動物におけるLDL受容体の分解におけるPCSK9のHSPG結合領域の重要な役割を実証する。

【0185】

50

例 1 4 : ヘパリンおよびヘパリン模倣剤との P C S K 9 の相互作用に基づいた小分子 P C S K 9 阻害剤の構造をベースとした設計。

小分子量ヘパリンおよびヘパリンアナログの中から選択された候補化合物を、H e p G 2 細胞培養アッセイで P C S K 9 機能を阻害し L D L R 量を増加するそれらの能力について試験する。ヘパリンアナログであるフォンダバリヌクス (商標名アリクストラ) を対照化合物として使用する。得られる構造情報を使用して 3 ~ 5 種のファルマコフォアモデルを導き、それを使用して 3 百万の入手可能な化合物の既存データベースをスクリーニングする。多様性に基づく 5 0 種の化合物のコレクションを、H e p G 2 細胞における機能的試験のために選択する。良好な阻害剤は分子結合モデルの校正および購入可能な化合物の第二スクリーニングを促進する。5 0 種の化合物を、購入およびインビトロ試験のために選択する。3 種の最も有望な候補を引き続きマウスモデルで試験して、肝臓中の L D L R 量および血漿中のコレステロールに対する影響をインビボで評価する。

10

【 0 1 8 6 】

例 1 5 : P C S K 9 阻害剤候補の試験。

P C S K 9 阻害剤候補の前臨床試験を、L D L R についてヘテロ接合 (L D L R + / -) であり、内因性ネズミ P C S K 9 プロモーターの制御下でヒト P C S K 9 の発現を有する冠状動脈疾患マウスモデルを用いて実施する。西洋型食餌で飼育されたマウスを P C S K 9 阻害剤により 6 ~ 8 ヶ月間治療し、解剖した大動脈での脂肪沈着のオイルレッド O 染色後に顕微鏡によりアテローム硬化性プラーク領域を評価する。コレステロールの血漿濃度を実験期間中 2 ヶ月毎に E L I S A により評価する。

20

【 0 1 8 7 】

これらの試験は、血清コレステロールを低下する P C S K 9 阻害剤候補物質の能力評価を可能にする。

【 0 1 8 8 】

例 1 6 : 硫酸デキストランおよびペントサンは L D L R を P C S K 9 誘発性分解から保護する。

修飾ポリサッカライド化合物のヘパリン模倣剤系で、硫酸デキストラン (図 9 A ~ B) およびペントサン (図 9 D ~ E) を、H e p G 2 細胞をベースとしたインビトロ細胞アッセイで試験した。一昼夜インキュベーション後の、L D L R 量をウェスタンブロッティングによって評価し、硫酸デキストラン (0 ~ 2 0 0 μ g / m L) による治療で L D L R の最大で 3 倍の上方調節を伴う L D L R の濃度依存的増加を示した。ペントサン (0 ~ 2 0 0 μ g / m L) インキュベーションは、5 0 μ g / m L からの濃度で 4 倍の L D L R 増加をもたらした。

30

【 0 1 8 9 】

例 1 7 : 肝 L D L R 量に対するペントサンの効果。

ポリ硫酸ペントサンを、ヒト P C S K 9 を発現するマウスに注射して、P C S K 9 誘発性分解に対して L D L R を保護する本物質の能力を評価する。

【 0 1 9 0 】

これらの試験は、ペントサンの投与がインビボで L D L R 量の増加をもたらすことを確認する。

40

【 0 1 9 1 】

例 1 8 : 血清コレステロール量に対するペントサンの効果。

増加した血清コレステロールを有する患者をポリ硫酸ペントサンの経口または皮下注射によって治療して、血清コレステロールを低下させる本物質の能力を評価する。ポリ硫酸ペントサンは、製造業者による経口用量の摂取後 2 時間の中央値で消化管から吸収される。コレステロール量を次いで測定する。

【 0 1 9 2 】

これらの試験は、ペントサンが血清コレステロール量の低下をもたらすことを確認する。

【 0 1 9 3 】

例 1 9 : イノヘップ画分の P C S K 9 阻害効果。

50

イノヘップ（低分子量ヘパリン）は5000～8000 Daのサイズ範囲のヘパリンフラグメントを含み、PCSK9活性の強力な阻害剤である。PCSK9阻害フラグメントをさらに同定するため、イノヘップをサイズ排除クロマトグラフィーにより分画した（図18A）。得られた画分を、PCSK9を阻害し細胞のLDLR量を増加するそれらの能力についてHepG2細胞をベースとしたアッセイで試験した（図18B）。このアッセイでは、多くの画分がサッカライド濃度20 μMとの一昼夜インキュベーション後にLDLR量を増加する（2～5倍）ことが認められた。最も高いLDLR量はサイズ除外画分H6で得られ、これを経て強アニオン交換（SAX）クロマトグラフィーに供した（図19A）。HepG2細胞を得られたSAX画分（500 nM）とインキュベーションし、LDLR量を評価した（図19B）。SAX画分I1、I8、およびI9はPCSK9阻害活性を有するヘパリン画分を含み、試験した濃度（500 nM）でLDLR量を最大で2倍増加する。

【0194】

例20：化合物（X）はピアコアアッセイにおいてヘパリンへのPCSK9の結合を阻害する。

アルブミン（シグマ、A4503）またはヘパリン-アルブミン（シグマ、H0403）のいずれかと結合されたセンサーチップを用いるピアコア分析を使用して、PCSK9とヘパリンの間の相互作用を評価した。分析は、PCSK9が700 pMの親和定数でヘパリン-アルブミンに結合し（図20A）、アルブミンと結合されたコントロールセンサーチップへの結合は認められない（図20B）ことを示した。ピアコア分析を用いる干渉アッセイを実施して化合物（X）とPCSK9の間の結合を評価した。100 nMのPCSK9溶液を増加する濃度（0 nM、10 nM、100 nM、1 μMおよび10 μM）の化合物（X）とインキュベーションし、溶液をついでヘパリン-アルブミンと結合されたセンサーチップに注入した。結合曲線は、化合物（X）が50 nMの推定IC50でヘパリン-アルブミンセンサーチップへのPCSK9の結合を阻害することを示した（図20C）。

【0195】

例21：化合物（X）はヘパリン-セファロースビーズへのPCSK9の結合を阻害する。ヘパリン/硫酸ヘパランへのPCSK9の結合の化合物（X）阻害をヘパリン-セファロース結合アッセイで試験した。ヘパリン-セファロースビーズ（2 μL）を、150 μLの10 mM NaH₂PO₄の全容量中で増加する濃度（0～500 μg/mL）の化合物（X）を加えてPCSK9（1 μg/mL）とインキュベーションした。4で一昼夜回転後に、ビーズをペレット化し上清中の非沈殿化PCSK9（遊離PCSK9）の濃度をELISAによって評価した。各サンプル中の遊離PCSK9の濃度を、ヘパリン-セファロースビーズ無添加サンプル中のPCSK9（添加コントロール）に対して基準化した。陽性コントロールとして、可溶性ヘパリン（5 mg/mL）を含むサンプルを含めた（図16A）。化合物（X）（500～200 μg/mL）は本アッセイにおいて、ヘパリン-セファロースとのPCSK9の相互作用を完全に阻害した。比較として、可溶性ヘパリンの添加は50%阻害をもたらした。これらの結果は、化合物（X）がインビトロでヘパリンへのPCSK9の結合を効率的に阻害することを示す。

【0196】

例22：化合物（X）はインビトロでPCSK9に対してLDLRを保護する。

化合物（X）（0～200 μg/mL）と24時間インキュベーションされたHepG2細胞は、細胞溶解物のウェスタンブロッティングにより評価しデンストメトリーにより定量したときに、濃度依存的に増加するLDLR量を示した（図16B）。コントロール細胞を添加剤無添加（陰性コントロール）または500 μg/mLヘパリン添加（陽性コントロール）とインキュベーションした。LDLR量を添加剤無添加でインキュベーションされたHepG2細胞の溶解物中で認められる量に対して計算した。化合物（X）インキュベーションは、最大で12倍高いLDLR量をもたらした。比較のため、ヘパリン（500 μg/mL）とインキュベーションされた細胞は、約3倍高いLDLRを示した。

10

20

30

40

50

【0197】

これらの実験は、化合物(X)がHepG2細胞中でPCSK9誘発性分解に対してLDLRを保護することを示す。

【0198】

例23：化合物(X)はインビボでLDLRのPCSK9誘発性分解を阻害する。

マウス(BALB/cJ Rj)にPCSK9(10 µg)を注射する60分前に、3.2 µg化合物(X)の単回静脈内(尾静脈)投与を実施した。肝LDLRのPCSK9誘発性分解をPCSK9注射の60分後にウェスタンブロッティングによって評価し、デンストメトリーによって定量した(図16C)。コントロールマウスは、NaClまたは市販のPCSK9阻害モノクローナル抗体(Amg en)であるコントロール阻害剤エボロクマブ(200 µg)を注射された。LDLR量をNaClのみ注射されたマウスでのLDLR量に対して算出した。LDLR量は阻害剤の前注射なしにPCSK9を注射されたマウスで50%低下し、一方、化合物(X)(0.13 mg/kg)またはエボロクマブ(8 mg/kg)を注射されたマウスで低下は認められなかった。これらの試験は、PCSK9注射前の化合物(X)の投与が、非常に低い投与量でエボロクマブと同様に効率よくLDLRを保護することを示す。

10

【0199】

例24：HepG2細胞におけるLDL-コレステロール排除に対する化合物(X)の効果。

96ウェルに接種したHepG2細胞を化合物(X)(200 µg/mL)と一昼夜インキュベーションする。翌日にDiI蛍光色素(Thermo Fisher Scientific)で標識されたLDL粒子(5 µg/mL)を加え、37℃で4時間インキュベーションする。PBSによる細胞の洗浄後に、LDL粒子の細胞取り込みを励起/放出552/573 nmで評価する。-80℃で一昼夜インキュベーション後に、ウェルあたりの細胞数をCyQuant Cell Proliferation Assay(Thermo Fisher Scientific)を用いて定量する。

20

これらの試験は、PCSK9活性の化合物(X)阻害が、インビトロでLDLコレステロールの取り込みを増加することを確認する。

【0200】

例25：ヒトにおける血清LDL-コレステロール量に対する化合物(X)の効果。

30

増加した血清LDL-コレステロール量を有する患者を化合物(X)(適量)の週1回静脈内注射によって6週間治療して、LDL-コレステロール低下治療としての化合物(X)の能力を評価する。LDL-コレステロール(HPLC)を、治療前および治療期間中に週1回サンプリングされる血液で測定する。

これらの試験は、化合物(X)が高コレステロール血症を有するヒトで血清LDL-コレステロールを低下することを確認する。

【0201】

例26：硫酸化ヘキサマーおよび18マーヘパリンはインビトロでPCSK9機能を阻害する。

HepG2細胞を、ジサッカライドあたり平均1.3の硫酸を含む不均一に硫酸化されたヘキサマーまたは18マーのオリゴサッカライドの0~200 µg/mLとインキュベーションした。一昼夜インキュベーション後に、細胞を収集し細胞のLDLR量をウェスタンブロッティングにより分析し(図17A)デンストメトリーにより定量した(図17B)。これらのヘパリンのいずれかとインキュベーションされた細胞は、試験した最高濃度(200 µg/mL)でコントロールと比べて6~8倍増加した細胞LDLR量を示す。さらに、ヘキサマーは10 µg/mLの低い濃度で強力なPCSK9阻害効果を有する。

40

【0202】

例27：スクロースオクタ硫酸はヘパリン-セファロースビーズへのPCSK9の結合を阻害する。

ヘパリン/硫酸ヘパリンへのPCSK9の結合のスクロースオクタ硫酸(図21A)阻害

50

を、ヘパリン - セファロース結合アッセイで試験した。ヘパリン - セファロースビーズ (2 μ L) を、150 μ L の 10 mM NaH_2PO_4 の全容量中で PCSK9 (1 μ g / mL) および増加する濃度 (0 ~ 500 μ g / mL) のスクロースオクタ硫酸とインキュベーションした。4 で一昼夜回転後に、ビーズをペレット化し上清中の非沈殿化 PCSK9 (遊離 PCSK9) の濃度を ELISA によって測定した。遊離 PCSK9 のパーセントは、ヘパリン - セファロースビーズ無添加のサンプル中の PCSK9 濃度 (添加コントロール) に対して計算した (図 21B)。500 ~ 250 μ g / mL 濃度でスクロースオクタ硫酸は、本アッセイにおいてヘパリン - セファロースならびに 5 mg / mL 可溶性ヘパリン (陽性コントロール) による PCSK9 沈殿を阻害した。これらの結果は、スクロースオクタ硫酸がインビトロでヘパリンへの PCSK9 の結合を効率的に阻害することを示す。

10

【0203】

配列

SEQ ID NO: 1: PCSK9 タンパク質 - NCBI 登録番号: NG_009061.1

MGTVSSRRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDDGDYEE
 LVLALRSEEDGLAEAPEHGTATTFHRCADPWRLPGTYVV
 VLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLP
 GFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLER
 ITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRV
 MVTDFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAG
 VAKGASMRSLRVLNCGKGTVSGTLIGLEFIRKSQQLVQPV
 GPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRD
 DACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVD
 LFAPGEDIIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMML
 SAEPELTLAELRQRLIHFS AKDVINEAWFPEDQRVLT PNL
 VAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAVARCAPD
 EELLSCSSF SRSGKRRGERMEAQGGKLV CRAHNAFGGEGV
 YAIARCCLLPQANC SVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLT
 GCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASC
 CHAPGLECKVKEHGIPAPQE QVTVACEEGWTLTGCSALPG
 TSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCR
 SRHLAQASQELQ*

20

30

【0204】

参考

Benimetskaya et al. (1995) Nucleic Acids Res 23: 4239 - 4245
 Bird et al. (1988) Science 242: 423 - 426.
 Chan et al. (2009) Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jun 16; 106 (24): 9820 - 5. doi: 10.1073/pnas.0903849106
 Cunningham et al. (2007) Nat Struct Mol Biol 14 (5): p. 413 - 9.
 de Paz, J. L., Spillmann, D. & Seeberger, P. H., (2006) Chem Commun (Camb), 3116 - 8
 Fisher et al. (2007) J Biol Chem. 282 (28): p. 20502 - 12.
 Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik. (1995) Nature. 374, 168 - 173.

40

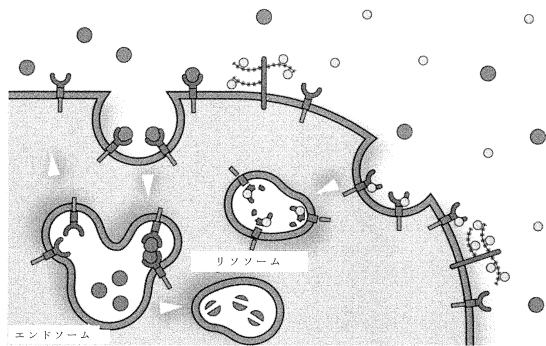
50

- Guns et al., 2009. *British Journal of Pharmacology* (2010), 159, 326 - 336
- Gustafsen et al. (2014) *Cell Metab* 19(2): p. 310 - 8
- Hamers - Casterman C, Atarhouch T, Muylderman S, et al. (1993) *Nature*. 363(6428): 446 - 8.
- Hecht, M.L. et al. (2009) *J Proteome Res* 8, 712 - 20
- Herbert et al., *Circ Res* 79, 590 - 600 (1996).
- Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 90: 6444 - 6448. 10
- Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879 - 5883.
- Jerabek-Willemsen et al. (2011) *Assay Drug Dev Technol*. 9(4): p. 342 - 53.
- Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495.
- Lagace et al. (2006) *J Clin Invest*. 2006 Nov; 116(11): 2995 - 3005
- Lakoski et al. (2009) *J Clin Endocrinol Metab*. 94(7): p. 2537 - 43. 20
- Lima et al., *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun; 1794(6): 873 - 81.
- Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856 - 859.
- Munck Petersen et al (1999) *EMBO J* 18(3): 595 - 604.
- McCoy, A.J., et al., Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity. *J Mol Biol*, 2003. 326(3): p. 823 - 33. 30
- Nour-Eldin HH, Hansen BG et al. (2006) *Nucleic Acids Res*. 34(18): e122.
- Piper et al. (2007). *Structure*, 2007. 15(5): p. 545 - 52.
- Reiter Y, Brinkmann U, et al. (1994) *J. Biol. Chem*. 269(15): 18327 - 31.
- Seidah et al. (2014) *Circ Res*. 2014 Mar 14; 114(6): 1022 - 36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301621
- Sheridan (2013). *Nat Biotechnol*. 2013 Dec; 31(12): 1057 - 8. doi: 10.1038/nbt1213-1057. 40
- Soderberg et al., *Nat Methods* 3, 995 - 1000 (2006).
- Stein et al. (1995) *Nat Med* 1: 1119 - 1121.
- Villiers BR, Stein V, Hollfelder F. (2010) *Protein Eng Des Sel*. 23(1): 1 - 8.
- Walley K.R. et al., *Curr Opin Crit Care*. 2016 Oct; 22(5): 464 - 9
- Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. (1989) *Nature* 341: 544 - 546. 50

Wozniak - Knopp G , Stadlmann J , Ruker F (2 0 1 2)
P L o S O N E 7 (1) : e 3 0 0 8 3 .
Yabukov et al . (1 9 9 3) J B i o l C h e m . 2 6 8 (2 5) : 1
8 8 1 8 - 2 3 .
Xu and Esko (2 0 1 4) A n n u R e v B i o c h e m . 2 0 1 4 ; 8 3
: 1 2 9 - 5 7

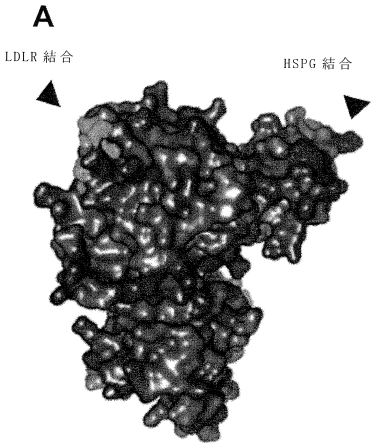
【図面】

【図 1】



○
PCSK9
●
コレステロール
Y
LDLR
X
HSPG

【図 2 - 1】

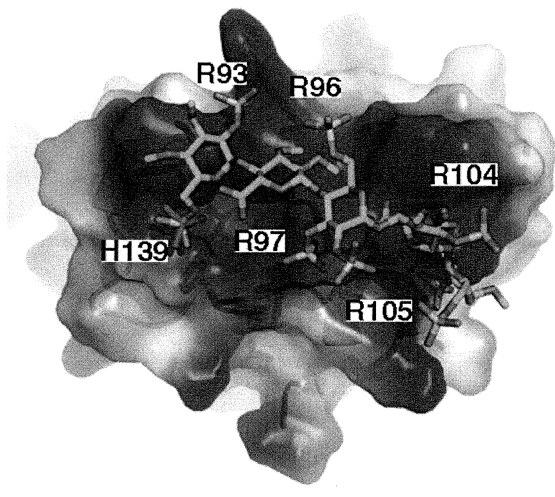


10

20

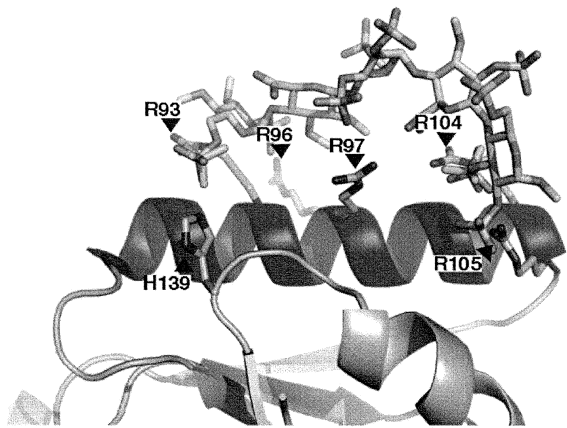
【図 2 - 2】

B



【図 2 - 3】

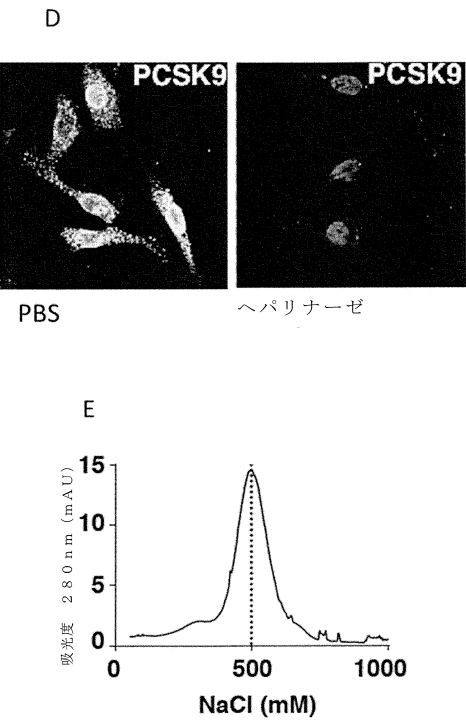
C



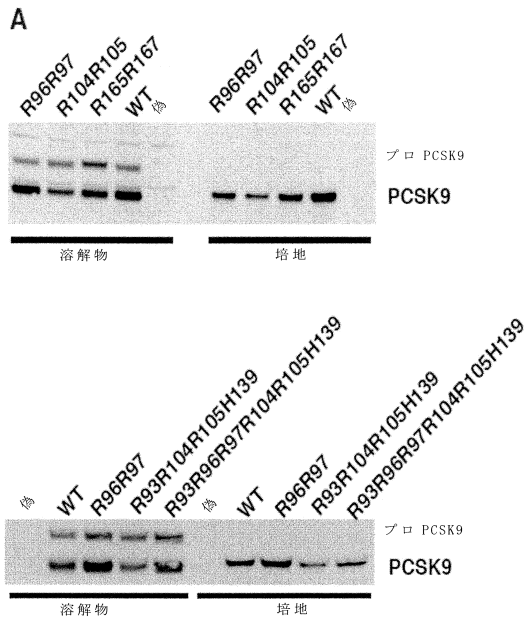
30

40

【図 2 - 4】



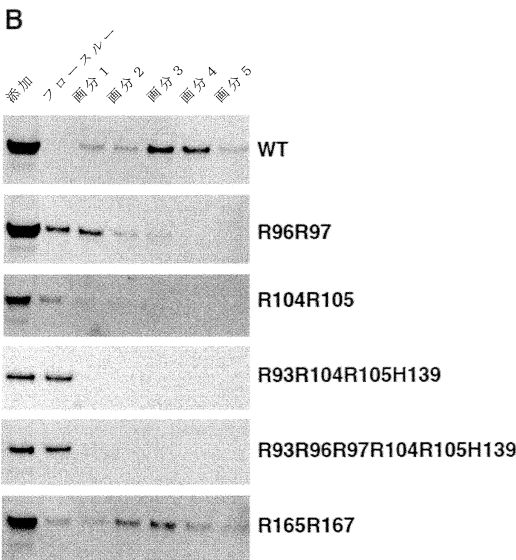
【図 3 - 1】



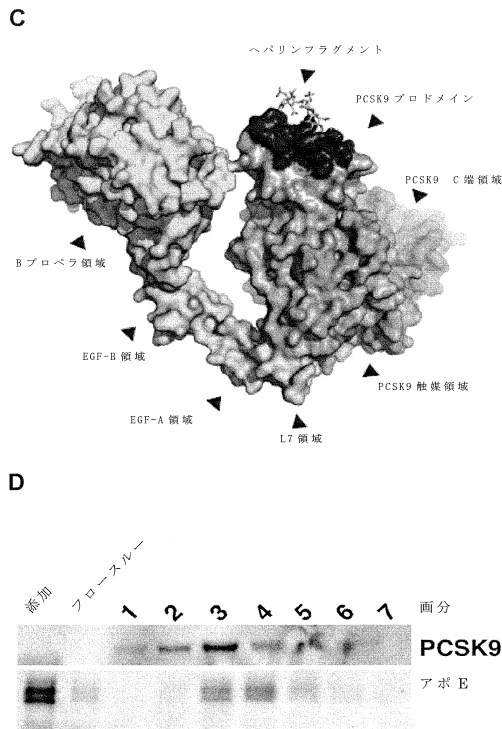
10

20

【図 3 - 2】



【図 3 - 3】

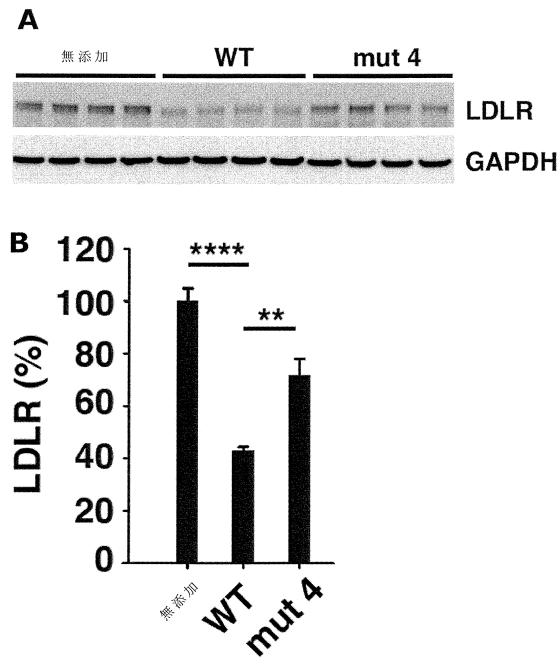


30

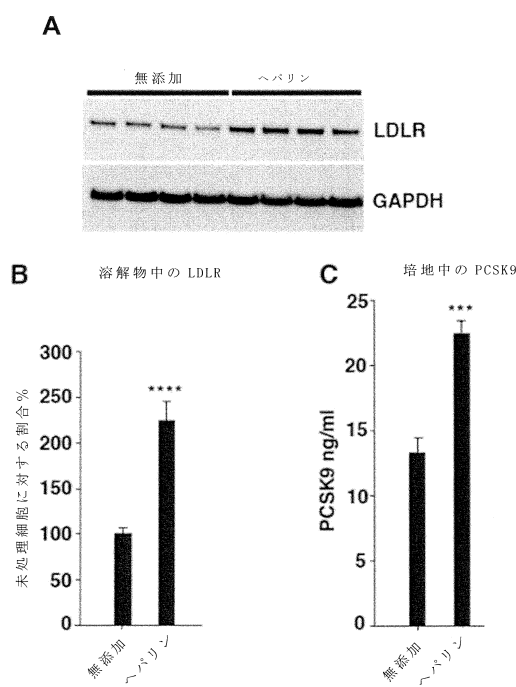
40

50

【図 4】



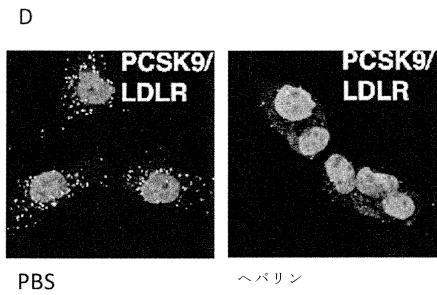
【図 5 - 1】



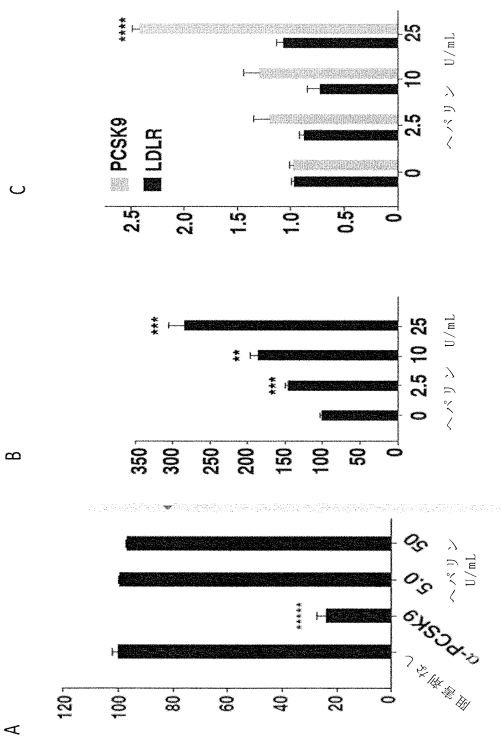
10

20

【図 5 - 2】



【図 6】

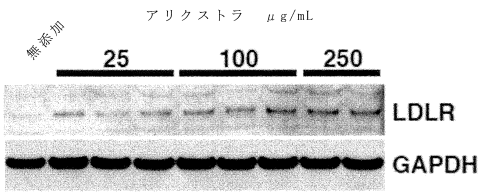


30

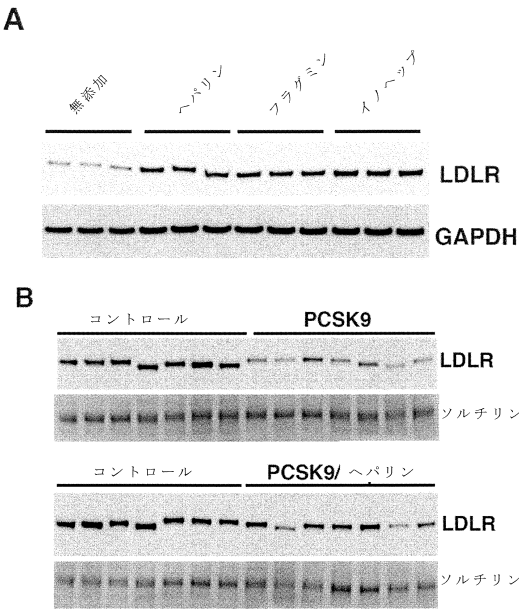
40

50

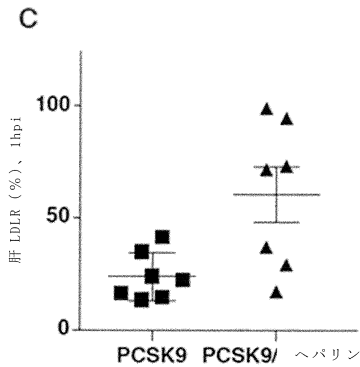
【図 7】



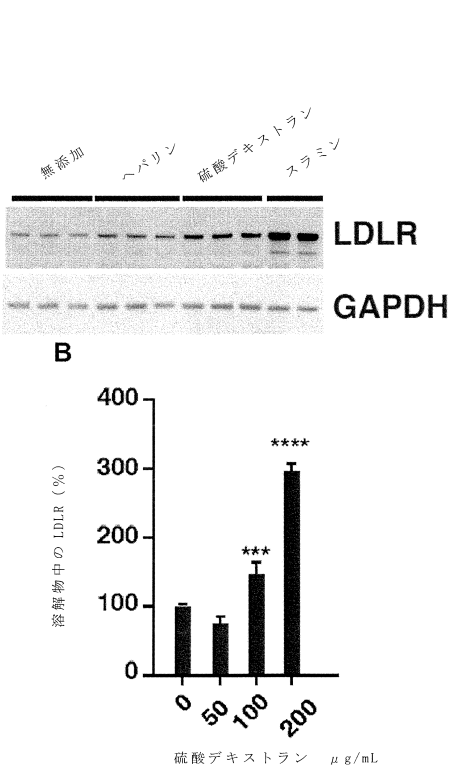
【図 8 - 1】



【図 8 - 2】



【図 9 - 1】



10

20

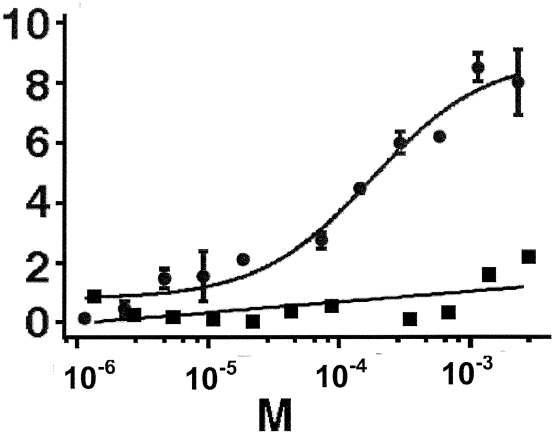
30

40

50

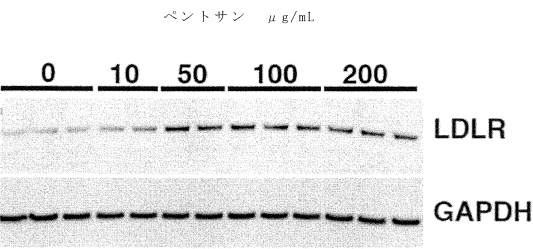
【図 9 - 2】

C

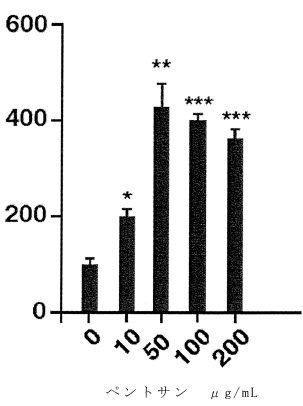


【図 9 - 3】

D

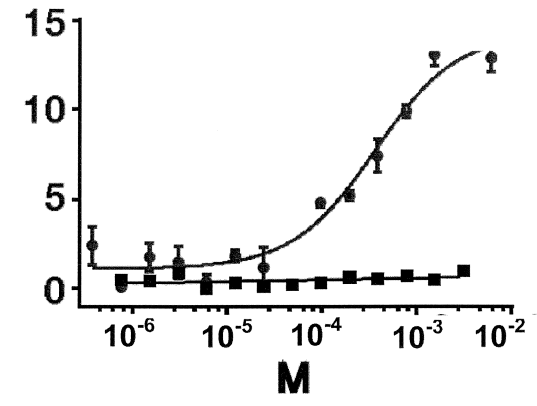


E



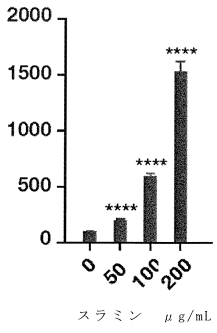
【図 9 - 4】

F

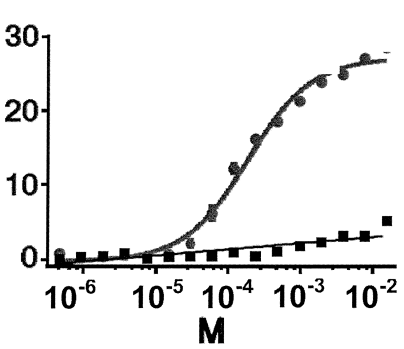


【図 9 - 5】

G



H



10

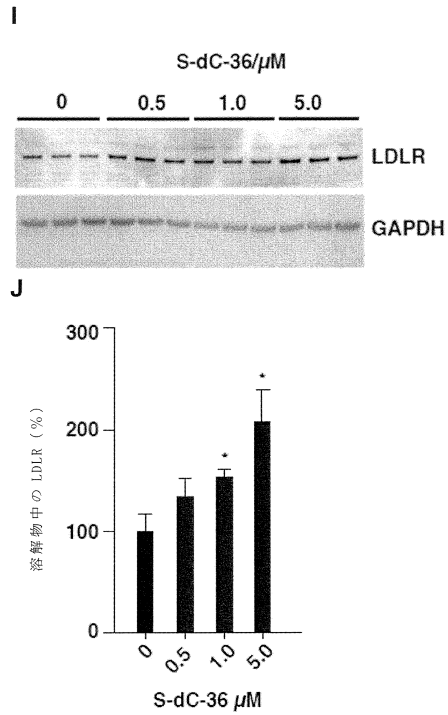
20

30

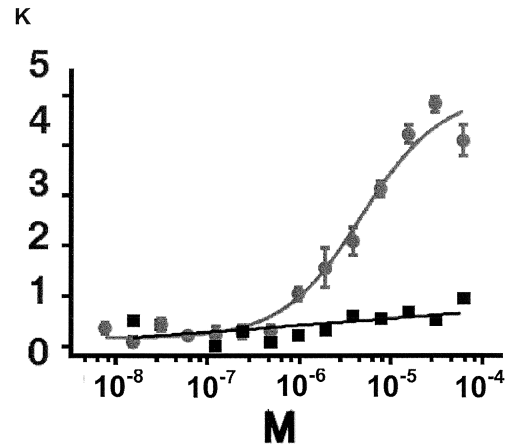
40

50

【図 9 - 6】



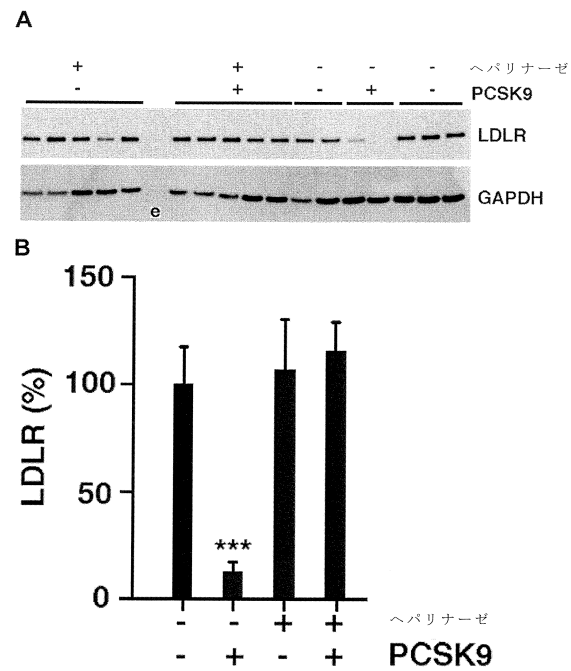
【図 9 - 7】



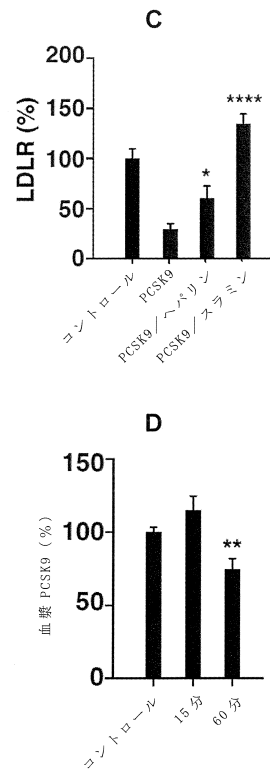
10

20

【図 10 - 1】



【図 10 - 2】



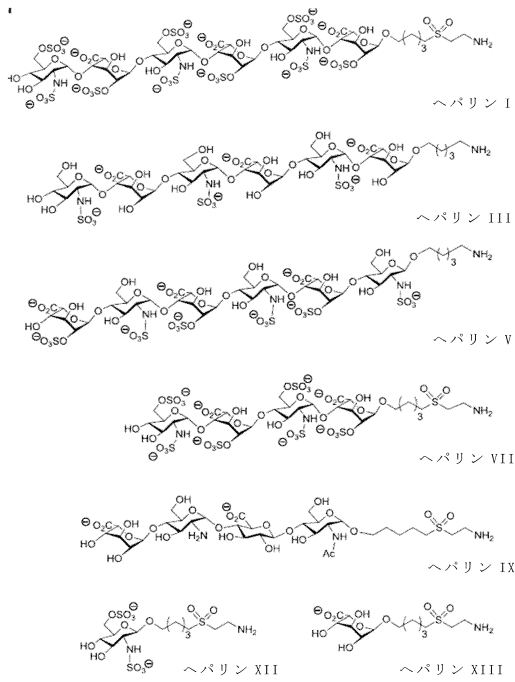
30

40

50

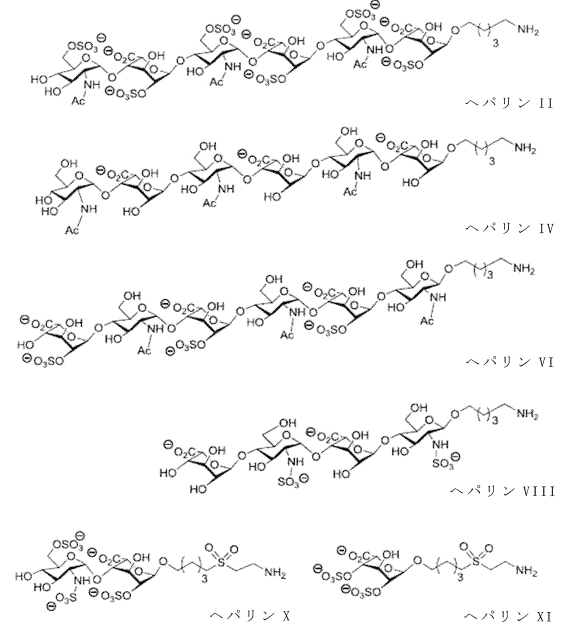
【図 14 - 2】

B



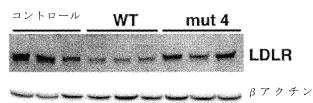
【図 14 - 3】

B (続き)



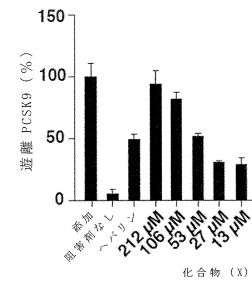
【図 15】

A

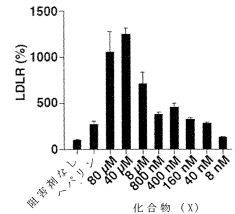
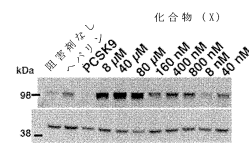
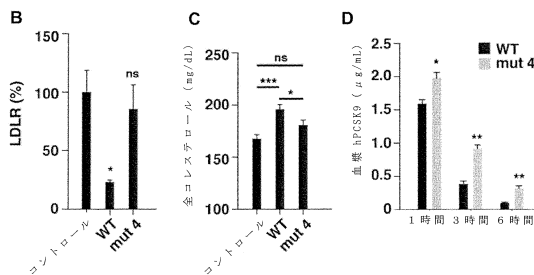


【図 16 - 1】

A) ヘパリンセファロース結合アッセイ



B) HepG2 細胞アッセイ



10

20

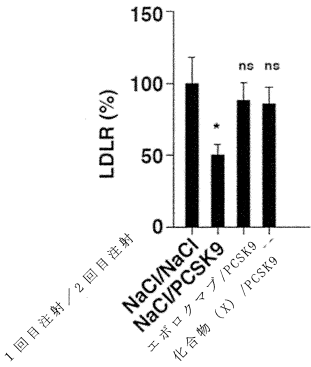
30

40

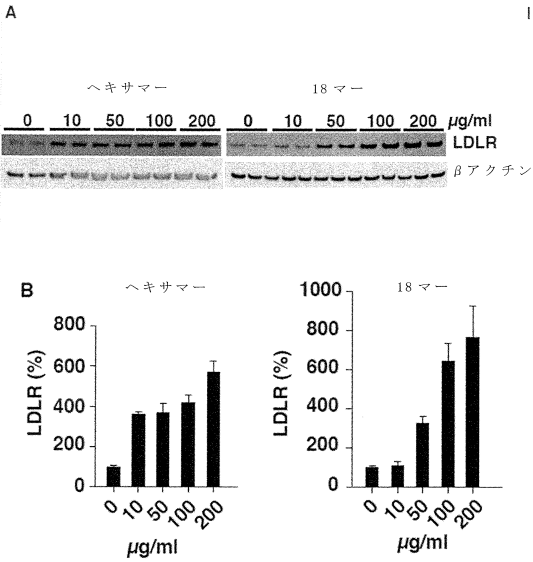
50

【図 16 - 2】

C) PCSK9 インビボ負荷試験

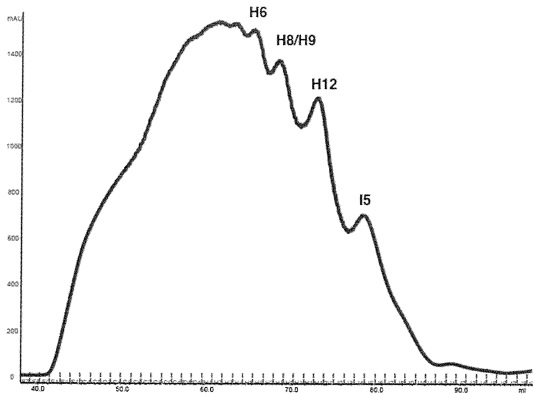


【図 17】



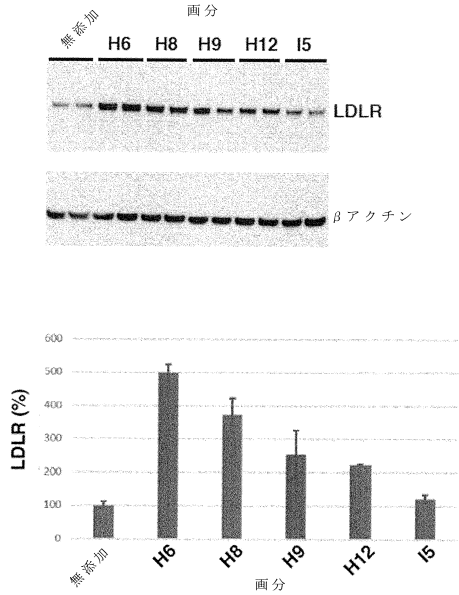
【図 18 - 1】

A) イノヘップのサイズ排除クロマトグラフィー溶出プロファイル



【図 18 - 2】

B)



10

20

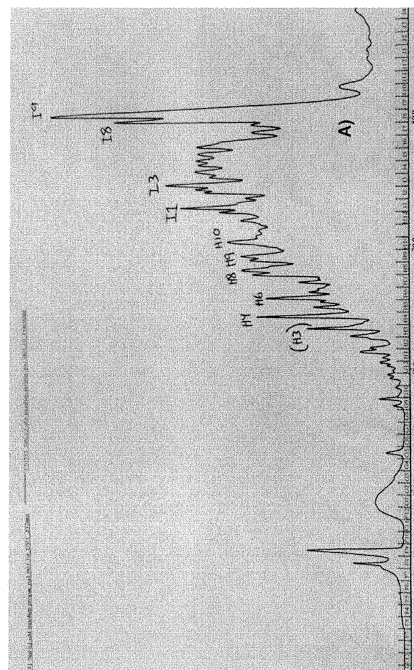
30

40

50

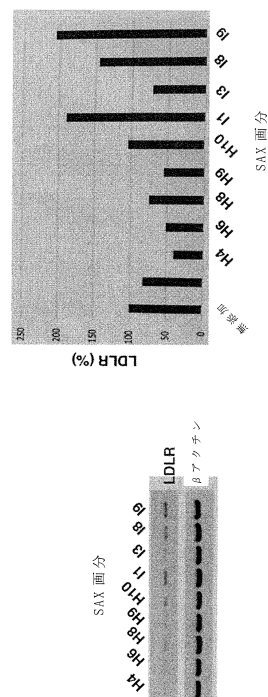
【 図 19 - 1 】

A) サイズ排除クロマトグラフィー/ヘップ画分H6のSAXクロマトグラフィー溶出プロファイル



【圖 19 - 2】

B) サイズ排除クロマトグラフィー画分 H6 の SAX クロマトグラフィー溶出プロファイル

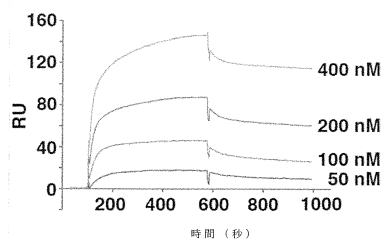


10

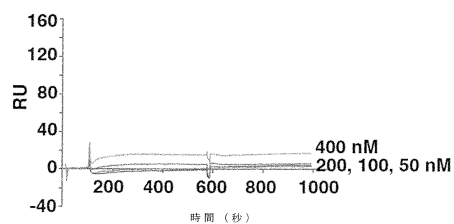
20

【 図 2 0 - 1 】

A) ヘパリン-アルブミンへの PCSK9 結合

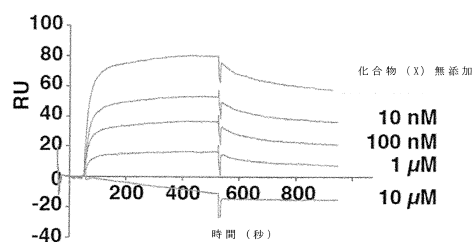


B) アルブミンへの PCSK9 結合



【 図 2 0 - 2 】

C) 化合物 (X) 添加におけるヘパリン-アルブミンへの PCSK9 (100nM) 結合

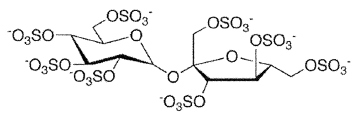


30

40

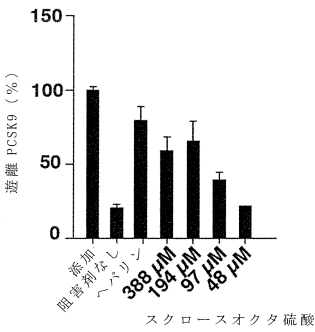
【図 2 1】

A) スクロースオクタ硫酸の構造



10

B) ヘパリンセファロース結合アッセイ



20

【配列表】

0007046381000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/704 (2006.01)	A 6 1 K	31/704	
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	47/59 (2017.01)	A 6 1 K	47/59	
A 6 1 P	3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	3/04 (2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	P
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
		C 0 7 K	14/47	Z N A
		C 0 7 K	14/00	

(72)発明者 マドセン, ソンダーガード, ペーダー
デンマーク国, 8 2 4 0 リスコフ, クロガグレ 9

(72)発明者 ペダーセン, グレロブ, シモン
デンマーク国, 8 2 4 0 リスコフ, ソルシッケベ 8

審査官 鶴見 秀紀

(56)参考文献 特開 2 0 1 5 - 1 6 4 9 4 7 (J P , A)
特開 2 0 1 6 - 0 6 9 3 7 3 (J P , A)
特表 2 0 1 5 - 5 2 4 4 3 9 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
A 6 1 P 3 / 0 6
A 6 1 P 3 / 1 0
A 6 1 P 3 / 0 4
A 6 1 P 3 / 0 0
A 6 1 P 9 / 1 2
A 6 1 P 9 / 1 0
A 6 1 P 9 / 0 0
A 6 1 P 3 1 / 0 4
C 0 7 K 1 4 / 4 7
C 0 7 K 1 4 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)