



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0091191
(43) 공개일자 2010년08월18일

(51) Int. Cl.

C07K 16/40 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7011280

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년10월27일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년05월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/081311

(87) 국제공개번호 WO 2009/055783

국제공개일자 2009년04월30일

(30) 우선권주장

60/982,922 2007년10월26일 미국(US)

(71) 출원인

쉐링 코포레이션

미국 뉴저지주 07033 케슬워어스시 개롭핑 힐 로
드 2000

(72) 발명자

헤드릭 조지프 에이.

미국 뉴저지 08882 사우스 리버 데이비드 스트리
트 6

몬스마 2세 프레드릭 제임스

미국 뉴저지 07901 서밋 마운틴 애비뉴 159

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박병석, 서장찬, 최재철

전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 항-PCSK9, 및 지질 및 콜레스테롤 질환의 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 항-PCSK9 항체 또는 PCSK9의 펩타이드 억제제를 투여하여, 콜레스테롤 및 지질 대사의 장애를 치료하
는 조성물 및 방법을 제공한다.

대표도

카밧에 따른 잔기 번호매김

중쇄

-----CDR-H1-----
11B5 E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V T L S C T A S G F N I K D T Y M H
75B9 E V Q L Q Q S G A D L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y I H
77D10 E V Q L Q Q S G A E L V R S G A S V K L S C T T S G F N I K D Y Y I H
29C10 E V L L Q Q S V A E L V R P G A S V R L S C T A S G F N I K D T Y I H
22D11 E V Q L V D S G G G L V Q P G R S L K L S C A A S G F T F S N H D M A
1F11 E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K V S G Y T F T D Y Y M N
1G11 E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K V S G Y T F T D Y Y M N
1 10 20 26 30 35

-----CDR-H2-----
11B5 W V N Q R P E Q G L V W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q D
75B9 W V K Q R P E Q G L E W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q G
77D10 W V K Q R P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A P K F Q G
29C10 W V R Q R P E Q G L E W F G W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G
22D11 W V R Q A P T K G L E W V A S I T P S G G T T Y Y R D S V E G
1F11 W V K Q S H G K S L E W I G D I N P N N G G A I Y N Q K F K G
1G11 W V K Q S H G K S L E W I G D I N P N N G G A I Y N Q K F K G
40 50 a 60 65

(72) 발명자

추라코바 타티아나

미국 캘리포니아 94086 서니배일 사우스 갈랜드 테
라스 676

홀렌바우흐 다이앤

미국 캘리포니아 94040 마운틴 뷰 포드햄 웨이
1534

특허청구의 범위

청구항 1

- (i) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 11B5 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3;
- (ii) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 75B9 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3;
- (iii) 서열 26의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 77D10 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3;
- (iv) 서열 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 29C10 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3;
- (v) 서열 42의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 22D11 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3;
- (vi) 서열 50의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 1F11/1G11 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3;
- (vii) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 11B5 경쇄 면역글로불린의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3;
- (viii) 서열 22의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 75B9 경쇄 면역글로불린의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3;
- (ix) 서열 30의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 77D10 경쇄 면역글로불린의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3;
- (x) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 29C10 경쇄 면역글로불린의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3;
- (xi) 서열 46의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 22D11 경쇄 면역글로불린의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3; 및
- (xii) 서열 54의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 1F11/1G11 경쇄 면역글로불린의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 구성원을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 추가의 화학치료제와 함께 포함하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 추가의 화학치료제가 심혈관계, 아드레날린 차단제, 항고혈압제, 안지오텐신 시스템 억제제, 안지오텐신-전환 효소 억제제, 관상혈관확장제, 이뇨제, 아드레날린 자극제 또는 HMG-CoA 리덕타제 억제제인 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 추가의 화학치료제가 에제티미베, 로바스타틴, 아토바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴, 리바스타틴, 심바스타틴, 아제티디논, 부놀롤 하이드로클로라이드, 아세부톨롤, 알프레놀롤 하이드로클로라이드, 아테놀롤, 카테올롤 하이드로클로라이드, 셀리프롤롤 하이드로클로라이드; 세타몰롤 하이드로클로라이드, 라베탈롤 하이드로클로라이드, 에스몰롤 하이드로클로라이드, 레보베타솔롤 하이드로클로라이드, 레보부놀롤 하이드로클로라이드, 나돌롤, 프락톨롤, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 소탈롤 하이드로클로라이드, 티몰롤, 티몰롤 말레에이트, 비소프롤롤; 비소프롤롤 푸마레이트, 네비발롤, 시클로프롤롤 하이드로클로라이드, 텍스프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 디아세톨롤 하이드로클로라이드, 딜레발롤 하이드로클로라이드, 엑사프롤롤 하이드로클로라이드, 플레스톨롤 설페이트, 메탈롤 하이드로클로라이드, 메토프롤롤 2-프로판올, 메토프롤롤 타르트레이트, 파마톨롤 설페이트, 펜부톨롤 설페이트, 프락톨롤, 티프레놀롤 하이드로클로라이드 또는 톨라몰롤인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 추가의 화학치료제가 임의로 심바스타틴과 조합된 에제티미베인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 사람화된 항체인 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체, 표지된 항체, 2가 항체, 폴리클로날 항체, 이특이적 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 항-개체특이형(anti-idiotypic) 항체, 사람화된 항체 또는 이특이적 항체인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, 항원-결합 단편이 카멜화된(camelized) 단일 도메인 항체, 디아바디, scfv, scfv 이량체, dsfv, (dsfv)₂, dsFv-dsfv', 이특이적 ds 디아바디, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, 또는 도메인 항체인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

제1항에 있어서, 면역글로불린 고정 영역에 연결된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 10

제9항에 있어서, 고정 영역이 κ 경쇄, γ 1 중쇄, γ 2 중쇄, γ 3 중쇄 또는 γ 4 중쇄인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 11

제1항의 항체 또는 단편을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 12

(i) 아미노산 서열 **G F N I K D T Y M H** (서열 11)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 **R I D P A N G H T E Y D P K F Q D** (서열 12)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 **S Y F G S I F A Y** (서열 13)을 포함하는 HCDR3;

(ii) 아미노산 서열 **G F N I K D T Y I H** (서열 19)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 **R I D P A N G H T E Y D P K F Q G** (서열 20)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 **S Y Y G S I F A Y** (서열 21)을 포함하는 HCDR3;

(iii) 아미노산 서열 **G F N I K D Y Y I H** (서열 27)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 **W I D P E N G D T E Y A P K F Q G** (서열 28)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 **Y Y R Y D D G T W F P Y** (서열 29)를 포함하는 HCDR3;

(iv) 아미노산 서열 **G F N I K D T Y I H** (서열 35)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 **W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G** (서열 36)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 **G Y Y R Y Y S L D Y** (서열 37)을 포함하는 HCDR3;

(v) 아미노산 서열 **G F T F S N H D M A** (서열 43)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 **S I T P S G G T T Y Y R D S V E G** (서열 44)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 **Q N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y** (서열 45)를 포함하는 HCDR3;

(vi) 아미노산 서열 **G Y T F T D Y Y M M** (서열 51)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 **D I N P N N G G A I Y N Q K F K G** (서열 52)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 **G I I T E I A E D F** (서열 53)을 포함하는 HCDR3;

(vii) 아미노산 서열 **S A S S S V S Y L Y** (서열 15)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열

R S S H R A S (서열 16)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 H Q Y Q S Y P P T (서열 17)을 포함하는 LCDR3;

(viii) 아미노산 서열 S A S S S V S Y L F (서열 23)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 R T S Y L A S (서열 24)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 H Q Y R T Y P P T (서열 25)을 포함하는 LCDR3;

(ix) 아미노산 서열 R A S G N I H S Y L A (서열 31)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 N A K T L P D (서열 32)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 Q H F W N T P W T (서열 33)을 포함하는 LCDR3;

(x) 아미노산 서열 R A S Q D I S N Y L N (서열 39)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 Y S S R L H S (서열 40)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 Q Q G K T L P L T (서열 41)을 포함하는 LCDR3;

(xi) 아미노산 서열 R S S Q S L V Y S D G N T Y L H (서열 47)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 R V S N R F S (서열 48)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 L Q S T H F P P T (서열 49)을 포함하는 LCDR3; 및

(xii) 아미노산 서열 K A S Q N V G T N V V (서열 55)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 S A S Y R Y S (서열 56)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 Q Q Y K T Y P Y T (서열 57)을 포함하는 LCDR3으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 구성원을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 13

제12항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 추가의 화학치료제와 함께 포함하는 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 추가의 화학치료제가 심혈관계, 아드레날린 차단제, 항고혈압제, 안지오텐신 시스템 억제제, 안지오텐신-전환 효소 억제제, 관상혈관확장제, 이노제, 아드레날린 자극제 또는 HMG-CoA 리덕타제 억제제인 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 추가의 화학치료제가 에제티미베, 로바스타틴, 아토바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴, 리바스타틴, 심바스타틴, 아제티디논, 부놀롤 하이드로클로라이드, 아세부톨롤, 알프레놀롤 하이드로클로라이드, 아테놀롤, 카테올롤 하이드로클로라이드, 셀리프롤롤 하이드로클로라이드; 세타몰롤 하이드로클로라이드, 라베탈롤 하이드로클로라이드, 에스몰롤 하이드로클로라이드, 레보베탁솔롤 하이드로클로라이드, 레보부놀롤 하이드로클로라이드, 나돌롤, 프락톨롤, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 소탈롤 하이드로클로라이드, 티몰롤, 티몰롤 말레에이트, 비소프롤롤; 비소프롤롤 푸마레이트, 네비발롤, 시클로프롤롤 하이드로클로라이드, 텍스프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 디아세톨롤 하이드로클로라이드, 딜레발롤 하이드로클로라이드, 엑사프롤롤 하이드로클로라이드, 플레스톨롤 설페이트, 메탈롤 하이드로클로라이드, 메토프롤롤 2-프로판올, 메토프롤롤 타르트레이트, 파마톨롤 설페이트, 펜부톨롤 설페이트, 프락톨롤, 티프레놀롤 하이드로클로라이드, 톨라몰롤 펜스피리드 하이드로클로라이드, 프로록산, 알푸조신 하이드로클로라이드, 라베탈롤 하이드로클로라이드, 브레틸륨 토실레이트, 디하이드로에르그타민 메실레이트, 카베딜롤, 라베탈롤, 브레틸륨 토실레이트, 펜톨아민 메실레이트, 솔리퍼딘 타르트레이트, 졸레틴 하이드로클로라이드, 칸데사르탄 실렉세틸, 텔미사르탄, 칸데사르탄; 로잘탄 칼륨, 베나제프릴 하이드로클로라이드, 캡토프릴, 포시노프릴, 모엑시프릴 하이드로클로라이드, 페린도프릴 에르부민, 퀴나프릴, 라미프릴, 에날라프릴 말레에이트, 리시노프릴, 텔라프릴, 스피라프릴, 텔라프릴 하이드로클로라이드, 리벤자프릴, 펜토프릴, 페린도프릴 1H-인돌-2-카복실산, 퀴나프릴라트, 스피라프릴 하이드로클로라이드, 스피라프릴라트, 테프로티드, 조페노프릴, 암로디핀 베실레이트, 클렌티아젠크 말레에이트, 이스라디핀, 니모디핀, 펠로디핀, 닐바디핀; 딜티아젠크 하이드로클로라이드, 베라파밀 하이드로

클로라이드, 텔루디핀 하이드로클로라이드, 벨포스딜, 포스테딜, 라놀라진, 부토프로진 하이드로클로라이드, 토시펜, 몰시도민, 라놀라진 하이드로클로라이드, 토시펜, 딜티아젠펜 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 소소르비드 모노니트레이트, 니트로글리세린, 베라파밀 하이드로클로라이드, 크로모나, 클로니테이트, 드로프레닐아민, 리도플라진, 프레닐아민, 프로파틸 니트레이트, 미오플라진 하이드로클로라이드, 믹시딘, 몰시도민, 이소소르비드 모노니트레이트, 에리스리틸 테트라니트레이트, 클로니테이트, 디피리다몰; 니코란딜, 피리딘 카복사미드, 니페디핀; 퍼헥실린 말레에이트; 옥스프레놀롤, 펜트리니트롤, 베라파밀, 알티아지드, 벤즈티아지드, 부티아지드, 클로로티아지드, 스피로놀락톤, 트리암테렌, 구안파신 하이드로클로라이드, 하이드로클로로티아지드와 조합된 메틸도파-하이드로클로로티아지드, 메틸도파-클로로티아지드, 클로니딘 하이드로클로라이드, 클로르탈리돈, 클로니딘 하이드로클로라이드, 클로니딘, 알티아지드, 벤즈티아지드, 캡토프릴, 카베딜롤, 클로로티아지드, 클로니딘 하이드로클로라이드, 사이클로티아지드, 델라프릴 하이드로클로라이드, 딜레발롤 하이드로클로라이드, 델라프릴 하이드로클로라이드, 독사조신 메실레이트, 포시노프릴 나트륨, 모엑시프릴 하이드로클로라이드, 모나테필 말레에이트, 메토프롤롤 석시네이트, 구안파신 하이드로클로라이드, 메틸도파, 퀴나프릴라트, 퀴나프릴 하이드로클로라이드, 프리미돌롤, 프라조신 하이드로클로라이드, 펠란세린 하이드로클로라이드, 페녹시벤자민 하이드로클로라이드, 칸데사르탄 실렉세틸, 텔미사르탄, 칸데사르탄, 암로디핀 말레에이트, 테라조신 하이드로클로라이드, 베반톨롤 하이드로클로라이드 또는 라미프릴인 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 추가의 화학치료제가 임의로 심바스타틴과 조합된 에제티미베인 조성물.

청구항 17

제12항에 있어서, 사람화된 항체인 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 18

제12항에 있어서, 사람화된 항체인 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 19

제12항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체, 표지된 항체, 2가 항체, 폴리클로날 항체, 이특이적 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 항-개체특이형 항체, 사람화된 항체 또는 이특이적 항체인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 20

제12항에 있어서, 항원-결합 단편이 카멜화된 단일 도메인 항체, 디아바디, scfv, scfv 이량체, dsfv, (dsfv)₂, dsFv-dsfv', 이특이적 ds 디아바디, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, 또는 도메인 항체인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 21

제12항에 있어서, 면역글로불린 고정 영역에 연결된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 22

제21항에 있어서, 고정 영역이 κ 경쇄, γ 1 중쇄, γ 2 중쇄, γ 3 중쇄 또는 γ 4 중쇄인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 23

제12항의 항체 또는 단편을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 24

제12항에 있어서,

(a) 아미노산 서열:

EVQLQQSGAELVKPGASVTLSCITASGFNIKDTY
MHWVNQRPEQGLVWIGRIDPANGHTEYDPKFQD
KATITTDTSSENTAYLHLSSLTSGDTAVYYCARS
YFGSIFAYWGQGTLVTVSA

(서열 10)을 포함하는 면역글로불린 중쇄;

(b) 아미노산 서열:

QIVLTQSPAIMASAPGEEKVTISCSASSSVSYLY
WYQQKPGSSPKPWIFRSSHRA SGVPARFSGSGS
GTSYSLTISSMEEAEDAATYYCHQYQSYPTTFGG
GTKLEIKRA

(서열 14)을 포함하는 면역글로불린 경쇄;

(c) 아미노산 서열:

EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNIKDTY
IHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGHTEYDPKFQG
RATLTDTDTSSNTAYLQLFSLTSEDSAVYFCARS
YYGSI FAYWGQGTLVTVSA

(서열 18)을 포함하는 면역글로불린 중쇄;

(d) 아미노산 서열:

QIVLTQSPAIMASAPGEEKVTISCSASSSVSYLF
WYQQKPGSSPKPWIFRTSYLASGVPARFSGSGS
GTSFSLTISSMEEAEDAATYYCHQYHTYPTTFGG
GTKLEIKRA

(서열 22)을 포함하는 면역글로불린 경쇄;

(e) 아미노산 서열:

EVQLQQSGAELVRS GASVKLSCTTS GFNIKDY
IHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT EYAPKFQG
KATMTADTSSNTAYLQLSSLTSA DTAVYYCNA
YYRYDDGTWFPYWGQGTLVTVSA

(서열 26)을 포함하는 면역글로불린 중쇄;

(f) 아미노산 서열:

DIQLTQSPASLSASVGETVTITCRASGN IHSYL
AWYQQKQKSPQFLVDNAKTL PDGVPSRFSVSG
SGTQYSLKINS LQPEDFGTIY CQHFWNTPTTFG
GGTKLEIKRA

(서열 30)을 포함하는 면역글로불린 경쇄;

(g) 아미노산 서열:

E V L L Q Q S V A E L V R P G A S V R L S C T A S G F N I K D T Y
I H W V R Q R P E Q G L E W F G W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G
K A T L T T D T S S N T A V L H L S S L T S E D S A I Y Y C A R G
Y Y R Y Y S L D Y W G Q G T S V T V S S

(서열 34)을 포함하는 면역글로불린 중쇄;

(h) 아미노산 서열:

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S N Y L
N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y Y S S R L H S G V P S R F S G R G
S G T D Y S L T I S T L E Q E D I A T Y F C Q Q G K T L P L T F G
A S T K L E L K R A

(서열 38)을 포함하는 면역글로불린 경쇄;

(i) 아미노산 서열:

E V Q L V D S G G G L V Q F G R S L K L S C A A S G F T F S N H D
M A W V R Q A P T K G L E W V A S I T P S G G T T Y Y R D S V E G
R F T V S R D N V K S S L H L Q M D S L T S E D T A T Y Y C A R Q
N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y W G Q G V M V T V S S

(서열 42)을 포함하는 면역글로불린 중쇄;

(j) 아미노산 서열:

D V L M T Q T P V S L P V S L G G Q V S I S C R S S Q S L V Y S D
G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y R V S N R F S G V P D R
F S G S G S G T D F T L K I S R V E P E D L G L Y Y C L Q S T H F
P P T F G S G T K L E I K R A

(서열 46)을 포함하는 면역글로불린 경쇄;

(k) 아미노산 서열:

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K V S G Y T F T D Y Y
M N W V K Q S H G K S L E W I G D I N P N N G G A I Y N Q K P K G
K A T L T V D K S S S I A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T S G
I I T E I A E D F W G Q G T T L T V S S

(서열 50)을 포함하는 면역글로불린 중쇄; 및

(l) 아미노산 서열:

D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N V G T N V
V W Y Q Q K P G Q S P K A L I H S A S Y R Y S G V P D R P K G S G
S G T D F T L T I T N V Q S E D L A S F F C Q Q Y K T Y P Y T F G
G S T Q L E I K R A

(서열 54)을 포함하는 면역글로불린 경쇄로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 구성원을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 25

제24항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 추가의 화학치료제와 함께 포함하는 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 추가의 화학치료제가 심혈관계, 아드레날린 차단제, 항고혈압제, 안지오텐신 시스템 억제제, 안지오텐신-전환 효소 억제제, 관상혈관확장제, 이뇨제, 아드레날린 자극제 또는 HMG-CoA 리덕타제 억제제인 조성물.

청구항 27

제25항에 있어서, 추가의 화학치료제가 에제티미베, 로바스타틴, 아토바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴, 리바스타틴, 심바스타틴, 아제티디논, 부놀롤 하이드로클로라이드, 아세부톨롤, 알프레놀롤 하이드로클로라이드, 아테놀롤, 카테올롤 하이드로클로라이드, 셀리프롤롤 하이드로클로라이드; 세타몰롤 하이드로클로라이드, 라베탈롤 하이드로클로라이드, 에스몰롤 하이드로클로라이드, 레보베탁솔롤 하이드로클로라이드, 레보부놀롤 하이드로클로라이드, 나돌롤, 프락톨롤, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 소탈롤 하이드로클로라이드, 티몰롤, 티몰롤 말레에이트, 비소프롤롤; 비소프롤롤 푸마레이트, 네비발롤, 시클로프롤롤 하이드로클로라이드, 텍스프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 디아세톨롤 하이드로클로라이드, 딜레발롤 하이드로클로라이드, 엑사프롤롤 하이드로클로라이드, 플레스톨롤 설페이트, 메탈롤 하이드로클로라이드, 메토프롤롤 2-프로판올, 메토프롤롤 타르트레이트, 파마톨롤 설페이트, 펜부톨롤 설페이트, 프락톨롤, 티프레놀롤 하이드로클로라이드, 톨라몰롤 펜스피리드 하이드로클로라이드, 프로록산, 알푸조신 하이드로클로라이드, 라베탈롤 하이드로클로라이드, 브레틸륨 토실레이트, 디하이드로에그타민 메실레이트, 카베딜롤, 라베탈롤, 브레틸륨 토실레이트, 펜톨아민 메실레이트, 솔리퍼딘 타르트레이트, 줄레틴 하이드로클로라이드, 칸데사르탄 실렉세틸, 텔미사르탄, 칸데사르탄; 로잘탄 칼륨, 베나제프릴 하이드로클로라이드, 캅토프릴, 포시노프릴, 모엑시프릴 하이드로클로라이드, 페린도프릴 에르부민, 퀴나프릴, 라미프릴, 에날라프릴 말레에이트, 리시노프릴, 텔라프릴, 스피라프릴, 텔라프릴 하이드로클로라이드, 리벤자프릴, 펜토프릴, 페린도프릴 1H-인돌-2-카복실산, 퀴나프릴라트, 스피라프릴 하이드로클로라이드, 스피라프릴라트, 테프로티드, 조페노프릴, 암로디핀 베실레이트, 클렌티아젬 말레에이트, 이소라디핀, 니모디핀, 펠로디핀, 닐바디핀; 딜티아젬 하이드로클로라이드, 베라파밀 하이드로클로라이드, 텔루디핀 하이드로클로라이드, 벨포스틸, 포스테틸, 라놀라진, 부토프로진 하이드로클로라이드, 토시펜, 몰시도민, 라놀라진 하이드로클로라이드, 토시펜, 딜티아젬 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 소소르비드 모노니트레이트, 니트로글리세린, 베라파밀 하이드로클로라이드, 크로모나, 클로니데이트, 드로프레닐아민, 리도플라진, 프레닐아민, 프로파틸 니트레이트, 미오플라진 하이드로클로라이드, 믹시딘, 몰시도민, 이소소르비드 모노니트레이트, 에리스리틸 테트라니트레이트, 클로니데이트, 디피리다몰; 니코란딜, 피리딘 카복사미드, 니페디핀; 퍼헥실린 말레에이트; 옥스프레놀롤, 펜트리니트롤, 베라파밀, 알티아지드, 벤즈티아지드, 부티아지드, 클로로티아지드, 스피로놀락톤, 트리아메텐, 구안파신 하이드로클로라이드, 하이드로클로로티아지드와 조합된 메틸도파-하이드로클로로티아지드, 메틸도파-클로로티아지드, 클로니딘 하이드로클로라이드, 클로르탈리돈, 클로니딘 하이드로클로라이드, 클로니딘, 알티아지드, 벤즈티아지드, 캅토프릴, 카베딜롤, 클로로티아지드, 클로니딘 하이드로클로라이드, 사이클로티아지드, 텔라프릴 하이드로클로라이드, 딜레발롤 하이드로클로라이드, 텔라프릴 하이드로클로라이드, 독사조신 메실레이트, 포시노프릴 나트륨, 모엑시프릴 하이드로클로라이드, 모나테필 말레에이트, 메토프롤롤 석시네이트, 구안파신 하이드로클로라이드, 메틸도파, 퀴나프릴라트, 퀴나프릴 하이드로클로라이드, 프리미돌롤, 프라조신 하이드로클로라이드, 펠란세린 하이드로클로라이드, 페녹시벤자민 하이드로클로라이드, 칸데사르탄 실렉세틸, 텔미사르탄, 칸데사르탄, 암로디핀 말레에이트, 테라조신 하이드로클로라이드, 베반톨롤 하이드로클로라이드 또는 라미프릴인 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 추가의 화학치료제가 임의로 심바스타틴과 조합된 에제티미베인 조성물.

청구항 29

제24항에 있어서, 사람화된 항체인 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 30

제24항에 있어서, 사람화된 항체인 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 31

제24항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체, 표지된 항체, 2가 항체, 폴리클로날 항체, 이특이적 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 항-개체특이형 항체, 사람화된 항체 또는 이특이적 항체인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 32

제24항에 있어서, 항원-결합 단편이 카멜화된 단일 도메인 항체, 디아바디, scfv, scfv 이량체, dsfv, (dsfv)₂, dsFv-dsfv', 이특이적 ds 디아바디, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, 또는 도메인 항체인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 33

제24항에 있어서, 면역글로불린 고정 영역에 연결된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 34

제33항에 있어서, 고정 영역이 κ 경쇄, γ 1 중쇄, γ 2 중쇄, γ 3 중쇄 또는 γ 4 중쇄인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 35

제24항의 항체 또는 단편을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 36

PCSK9 및 LDL 수용체 사이의 결합을 억제하는, PCSK9에 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 분리된 EGF-A 폴리펩타이드; 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 항체가 LDL 수용체 EGF-A 도메인과 상호작용하는 PCSK9의 도메인 또는 PCSK9 촉매적 도메인에 특이적으로 결합하는, 약제학적 조성물.

청구항 38

사람 LDL 수용체의 약 314번 아미노산 위치에서 시작하고, 약 355번 아미노산 위치에서 끝나는 아미노산으로 이루어진 단편인 사람 LDL 수용체의 단편에 대해 약 90% 이상의 아미노산 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하고;

- (i) PCSK9에 결합하고;
- (ii) LDL 수용체 또는 항-PCSK9 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 PCSK9에 결합하기 위해 경쟁하고;
- (iii) 동물에게 투여시 총 콜레스테롤 수준을 감소시키고;
- (iv) 동물에게 투여시 저밀도 지단백질 콜레스테롤을 감소시키고;
- (v) 동물에게 투여시 아포지단백질 B 수준을 감소시키고;
- (vi) 동물에게 투여시 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율을 감소시키며;
- (vii) 동물에게 투여시, 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소시키는 특성으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 특성을 임의로 포함하는, 분리된 폴리펩타이드, 또는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 이의 약제학적 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 서열 3의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드, 또는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 이의 약제학적 조성물.

청구항 40

치료학적 유효량의, PCSK9 및 LDL 수용체 사이의 결합을 억제하는 PCSK9 길항제 EGF-A 폴리펩타이드; 또는 PCSK9에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 임의로 추가의 화학치료제와 함께 대상체에게 투여함을 포함하여, 대상체에서 총 콜레스테롤 수준; 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수준; 아포지단백질 B 수준; 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율; 또는 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소시키는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 항체 또는 단편이 LDL 수용체 EGF-A 도메인과 상호작용하는 PCSK9의 도메인 또는 PCSK9 촉매적 도메인에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 42

치료학적 유효량의, PCSK9 및 LDL 수용체 사이의 결합을 억제하는 PCSK9에 특이적으로 결합하는 EGF-A 폴리펩타이드 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 임의로 추가의 화학치료제와 함께 대상체에게 투여함을 포함하여, 대상체에서 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 고중성지방혈증(hypertriglyceridaemia), 시토스테롤혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상심질환, 혈관 염증 및 황색종을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 항체가 LDL 수용체 EGF-A 도메인과 상호작용하는 PCSK9의 도메인 또는 PCSK9 촉매적 도메인에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 44

치료학적 유효량의 제1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여함을 포함하여, 대상체에서 총 콜레스테롤 수준; 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수준; 아포지단백질 B 수준; 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율; 또는 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소시키거나; 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 고중성지방혈증, 시토스테롤혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상심질환, 혈관 염증 또는 황색종을 치료하는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 제1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 추가의 화학치료제와 함께 투여되는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 추가의 화학치료제가 심혈관계, 아드레날린 차단제, 항고혈압제, 안지오텐신 시스템 억제제, 안지오텐신-전환 효소 억제제, 관상혈관확장제, 이뇨제, 아드레날린 자극제 또는 HMG-CoA 리덕타제 억제제인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 추가의 화학치료제가 에세티미베, 로바스타틴, 아토바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴, 리바스타틴, 심바스타틴, 아제티디논, 부놀롤 하이드로클로라이드, 아세부톨롤, 알프레놀롤 하이드로클로라이드, 아테놀롤, 카데올롤 하이드로클로라이드, 셀리프롤롤 하이드로클로라이드; 세타몰롤 하이드로클로라이드, 라베탈롤 하이드로클로라이드, 에스몰롤 하이드로클로라이드, 레보베탁솔롤 하이드로클로라이드, 레보부놀롤 하이드로클로라이드, 나돌롤, 프락톨롤, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 소탈롤 하이드로클로라이드, 티몰롤, 티몰롤 말레에이트, 비소프롤롤; 비소프롤롤 푸마레이트, 네비발롤, 시클로프로롤롤 하이드로클로라이드, 텍스프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 디아세톨롤 하이드로클로라이드, 딜레발롤 하이드로클로라이드, 엑사프로롤롤 하이드로클로라이드, 플레스톨롤 설페이트, 메탈롤 하이드로클로라이드, 메토프롤롤 2-프로판올, 메토프롤롤 타르트레이트, 과마톨롤 설페이트, 펜부톨롤 설페이트, 프락톨롤, 티프레놀롤 하이드로클로라이드, 톨라몰롤 펜스피리드 하이드로클로라이드, 프로록산, 알푸조신 하이드로클로라이드, 라베탈롤 하이드로클로라이드, 브레틸륨 토실레이트, 디하이드로에그타민 메실레이트, 카베딜롤, 라베탈롤, 브레틸륨 토실레이트, 펜타미민 메실레이트, 솔리퍼딘 타르트레이트, 줄레틴 하이드로클로라이드, 칸데사르탄 실렉세틸, 텔미사르탄, 칸데사르탄; 로잘탄 칼륨, 베나제프릴 하이드로클로라이드, 캅토프릴, 포시노프릴, 모엑시프릴 하이드로클로라이드, 페린도프릴 에르부민, 퀴나프릴, 라미프릴, 에날라프릴 말레에이트, 리시노프릴, 텔라프릴, 스피라프릴, 텔라프릴 하이드로클로라이드, 리벤자프릴, 펜토프릴, 페린도프릴 1H-인돌-2-카복실산, 퀴나프릴라트, 스피라프릴 하이드로클로라이드, 스피라프릴라트, 테프로티드, 조페노프릴, 암로디핀 베실레이트, 클렌티아

젬 말레에이트, 이스라디핀, 니모디핀, 펠로디핀, 닐바디핀; 딜티아젬 하이드로클로라이드, 베라파밀 하이드로클로라이드, 텔루디핀 하이드로클로라이드, 벨포스딜, 포스테딜, 라놀라진, 부토프로진 하이드로클로라이드, 토시펜, 몰시도민, 라놀라진 하이드로클로라이드, 토시펜, 딜티아젬 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 소소르비드 모노니트레이트, 니트로글리세린, 베라파밀 하이드로클로라이드, 크로모나, 클로니테이트, 드로프렌일아민, 리도플라진, 프레닐아민, 프로파틸 니트레이트, 미오플라진 하이드로클로라이드, 믹시딘, 몰시도민, 이소소르비드 모노니트레이트, 에리스리틸 테트라니트레이트, 클로니테이트, 디피리다몰; 니코란딜, 피리딘 카복사미드, 니페디핀; 퍼헥실린 말레에이트; 옥스프레놀롤, 펜트리니트롤, 베라파밀, 알티아지드, 벤즈티아지드, 부티아지드, 클로로티아지드, 스피로놀락톤, 트리암테렌, 구안파신 하이드로클로라이드, 하이드로클로로티아지드와 조합된 메틸도파-하이드로클로로티아지드, 메틸도파-클로로티아지드, 클로니딘 하이드로클로라이드, 클로르탈리돈, 클로니딘 하이드로클로라이드, 클로니딘, 알티아지드, 벤즈티아지드, 캅토프릴, 카베딜롤, 클로로티아지드, 클로니딘 하이드로클로라이드, 사이클로티아지드, 텔라프릴 하이드로클로라이드, 딜레발롤 하이드로클로라이드, 텔라프릴 하이드로클로라이드, 독사조신 메실레이트, 포시노프릴 나트륨, 모엑시프릴 하이드로클로라이드, 모나테필 말레에이트, 메토프롤롤 석시네이트, 구안파신 하이드로클로라이드, 메틸도파, 퀴나프릴라트, 퀴나프릴 하이드로클로라이드, 프리미돌롤, 프라조신 하이드로클로라이드, 펠란세린 하이드로클로라이드, 페녹시벤자민 하이드로클로라이드, 칸데사르탄 실렉세틸, 텔미사르탄, 칸데사르탄, 암로디핀 말레에이트, 테라조신 하이드로클로라이드, 베반톨롤 하이드로클로라이드 또는 라미프릴인, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 추가의 화학치료제가 에제티미베 및 임의로, 심바스타틴인, 방법.

청구항 49

제44항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 사람화된 항체인, 방법.

청구항 50

치료학적 유효량의 제24항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여함을 포함하여, 대상체에서 총 콜레스테롤 수준; 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수준; 아포지단백질 B 수준; 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율; 또는 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소시키거나; 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 고중성지방혈증, 시토스테롤혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상심질환, 혈관 염증 또는 황색종을 치료하는 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 제1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 추가의 화학치료제와 함께 투여되는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 추가의 화학치료제가 심혈관계, 아드레날린 차단제, 항고혈압제, 안지오텐신 시스템 억제제, 안지오텐신-전환 효소 억제제, 관상혈관확장제, 이뇨제, 아드레날린 자극제 또는 HMG-CoA 리덕타제 억제제인 방법.

청구항 53

제51항에 있어서, 추가의 화학치료제가 에제티미베, 로바스타틴, 아토바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴, 리바스타틴, 심바스타틴, 아제티디논, 부놀롤 하이드로클로라이드, 아세부톨롤, 알프레놀롤 하이드로클로라이드, 아테놀롤, 카테올롤 하이드로클로라이드, 셀리프롤롤 하이드로클로라이드; 세타몰롤 하이드로클로라이드, 라베탈롤 하이드로클로라이드, 에스몰롤 하이드로클로라이드, 레보베탁솔롤 하이드로클로라이드, 레보부놀롤 하이드로클로라이드, 나돌롤, 프라톨롤, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 소탈롤 하이드로클로라이드, 티몰롤, 티몰롤 말레에이트, 비소프롤롤; 비소프롤롤 푸마레이트, 네비발롤, 시클로프로롤롤 하이드로클로라이드, 텍스프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 디아세톨롤 하이드로클로라이드, 딜레발롤 하이드로클로라이드, 엑사프로롤롤 하이드로클로라이드, 플레스톨롤 설페이트, 메탈롤 하이드로클로라이드, 메토프롤롤 2-프로판올, 메토프롤롤 타르트레이트, 파마톨롤 설페이트, 펜부톨롤 설페이트, 프라톨롤, 티프레놀롤 하이드로클로라이드, 톨라몰롤 펜스피리드 하이드로클로라이드, 프로록산, 알푸조신 하이드로클로라이드, 라베탈롤 하이드로클로라이드, 브레틸륨 토실레이트, 디하이드로에르그타민 메실레이트, 카베딜롤, 라베탈롤, 브레틸륨 토실레이트, 펜톨아민 메실레이트, 솔리퍼딘 타르트레이트, 졸레틴 하이드로클로라이드, 칸데사르탄 실렉세틸,

텔미사르탄, 칸데사르탄; 로잘탄 칼륨, 베나제프릴 하이드로클로라이드, 캡토프릴, 포시노프릴, 모엑시프릴 하이드로클로라이드, 페린도프릴 에르부민, 퀴나프릴, 라미프릴, 에날라프릴 말레에이트, 리시노프릴, 텔라프릴, 스피라프릴, 텔라프릴 하이드로클로라이드, 리벤자프릴, 펜토프릴, 페린도프릴 1H-인돌-2-카복실산, 퀴나프릴라트, 스피라프릴 하이드로클로라이드, 스피라프릴라트, 테프로티드, 조페노프릴, 암로디핀 베실레이트, 클렌티아젬 말레에이트, 이스라디핀, 니모디핀, 펠로디핀, 닐바디핀; 딜티아젬 하이드로클로라이드, 베라파밀 하이드로클로라이드, 텔루디핀 하이드로클로라이드, 벨포스딜, 포스테딜, 라놀라진, 부토프로진 하이드로클로라이드, 토시펜, 몰시도민, 라놀라진 하이드로클로라이드, 토시펜, 딜티아젬 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 소소르비드 모노니트레이트, 니트로글리세린, 베라파밀 하이드로클로라이드, 크로모나, 클로니테이트, 드로프레닐아민, 리도플라진, 프레닐아민, 프로파틸 니트레이트, 미오플라진 하이드로클로라이드, 믹시딘, 몰시도민, 이소소르비드 모노니트레이트, 에리스리틸 테트라니트레이트, 클로니테이트, 디피리다몰; 니코란딜, 피리딘 카복사미드, 니페디핀; 피렉실린 말레에이트; 옥스프레놀롤, 펜트리니트롤, 베라파밀, 알티아지드, 벤즈티아지드, 부티아지드, 클로로티아지드, 스피로놀락톤, 트리암테렌, 구안파신 하이드로클로라이드, 하이드로클로로티아지드와 조합된 메틸도파-하이드로클로로티아지드, 메틸도파-클로로티아지드, 클로니딘 하이드로클로라이드, 클로르탈리돈, 클로니딘 하이드로클로라이드, 클로니딘, 알티아지드, 벤즈티아지드, 캡토프릴, 카베딜롤, 클로로티아지드, 클로니딘 하이드로클로라이드, 사이클로티아지드, 텔라프릴 하이드로클로라이드, 딜레발롤 하이드로클로라이드, 텔라프릴 하이드로클로라이드, 독사조신 베실레이트, 포시노프릴 나트륨, 모엑시프릴 하이드로클로라이드, 모나테필 말레에이트, 메토프롤롤 석시네이트, 구안파신 하이드로클로라이드, 메틸도파, 퀴나프릴라트, 퀴나프릴 하이드로클로라이드, 프리미돌롤, 프라조신 하이드로클로라이드, 펠란세린 하이드로클로라이드, 페녹시벤자민 하이드로클로라이드, 칸데사르탄 실렉세틸, 텔미사르탄, 칸데사르탄, 암로디핀 말레에이트, 테라조신 하이드로클로라이드, 베반톨롤 하이드로클로라이드 또는 라미프릴인, 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 추가의 화학치료제가 에제티미베 및 임의로, 심바스타틴인, 방법.

청구항 55

제50항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 사람화된 항체인, 방법.

청구항 56

중쇄 및/또는 경쇄 면역글로불린을 암호화하고 이의 발현을 지시하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상의 숙주 세포 내로 도입시키고; 중쇄 및 경쇄 면역글로불린이 발현되는 조건하에 상기 숙주 세포를 성장시킴을 포함하여, 제1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 경쇄를 암호화하고 이의 발현을 지시하는 폴리뉴클레오타이드, 및 중쇄를 암호화하고 이의 발현을 지시하는 폴리뉴클레오타이드가 별개의 숙주 세포내에 존재하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 2007년 10월 26일자로 출원된 미국 특허원 제60/982,922호의 이익을 청구하고 있고, 이는 전문이 본원에 참조로 인용되어 있다.

[0002] 본 발명의 분야는 항-PCSK9 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 투여함으로써 콜레스테롤 항상성의 장애를 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 죽상경화성 관상동맥심질환(CHD)은 서구 세계에서 사망 및 심혈관 이환율에 대한 주요한 원인을 나타낸다. 죽상경화성 관상동맥심질환에 대한 위험 요소들은 고혈압, 당뇨병, 가족력, 남성성, 흡연, 고혈청 콜레스테롤, 높은 저밀도 지단백질(LDL) 콜레스테롤 수준 및 낮은 고밀도 지단백질(HDL) 콜레스테롤 수준을 포함한다. 일반적인

으로, 약 225 내지 250 mg/dl을 초과하는 총 콜레스테롤 수준은 CHD의 상당한 수준의 위험과 관련되어 있다.

[0004] 다수의 임상 연구는, 총 콜레스테롤 또는 LDL 콜레스테롤의 상승된 수준이 사람 죽상경화증을 조장함을 입증하였다. 역학 조사들은, 심혈관 이환율 및 사망율이 총 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤의 수준에 의해 직접적으로 변화됨을 확립하였다.

[0005] LDL 콜레스테롤 수준을 낮추기 위한 하나의 방법은 HMG-CoA 리덕타제 억제 약물을 투여하는 것이다. 이들 약물은 간에서 HMG-CoA 리덕타제 및 콜레스테롤 합성을 길항시키고, 세포 표면 위의 간 LDL 수용체의 수를 증가시켜 LDL의 흡수 및 분해대사(catabolism)를 향상시킨다. 이러한 시도의 단점은, 이들 약물이 일반적으로 예를 들면, 간 독성을 포함하는 유해한 부작용 프로파일을 경험한다는 것이다. 대안적 시도는 LDL 수용체 경로를 직접적으로 조절하는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] PCSK9[프로단백질 전환효소 쉐틸리신/켁신 유형 9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)]는 세포의 표면 위에서 LDL 수용체에 결합하여, LDL 수용체 발현을 조절하는 세린 프로테아제 계열 구성원이다. LDL 수용체-PCSK9 상호작용의 억제는 콜레스테롤 장애의 치료에 대한 매력적인 시도이다. 그러나, 항체 또는 소분자 억제제의 사용에 의한 큰 단백질들 사이의 상호작용(즉, 단백질-단백질 상호작용 또는 PPI)의 억제는 일반적으로 상당한 난제 및 도전으로 간주된다. 큰 단백질, 예를 들면, 약 74 KDa의 분자량을 갖는 PCSK9, 및 약 160 KDa (세포 표면 상에서 글리코실화된 상태에서; 미성숙 형태에서는 115 KDa)의 분자량을 갖는 LDLR은 넓은 표면에 걸쳐 광범위한 분자간의 접촉을 나타내기 쉽다. 광범위한 접촉의 존재는, 주어진 항체 또는 소분자 억제제가 이들의 결합을 성공적으로 차단하기 어렵게 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 발명의 요약

[0008] 본 발명은 놀랍게도 큰 단백질들 사이에 분자간 상호작용의 차단과 관련된 기술적 어려움을 극복하고, 항체 또는 펩타이드와 PCSK9-LDLR의 상호작용의 차단이 가능함을 입증하였다. 본원에 상세히 논의된 바와 같이, 본 발명은 콜레스테롤 장애를 치료하는 신규한 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 부분적으로 PCSK9에 특이적으로 결합하여 PCSK9 및 LDL 수용체 사이의 결합을 억제하는, 치료학적 유효량의 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예를 들면, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 재조합 항체) 또는 EGF-A 폴리펩타이드를, 임의로 추가의 화학치료제(예를 들면, 에제티미베 및/또는 심바스타틴)와 함께 대상체에게 투여함을 포함하여, 대상체(예를 들면, 사람)에서 총 콜레스테롤 수준, 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수준, 아포지단백질 B 수준, 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율 또는 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 항체 또는 단편 또는 EGF-A 폴리펩타이드는 LDL 수용체 EGF-A 도메인과 상호작용하는 PCSK9의 도메인 또는 PCSK9 촉매적 도메인에 특이적으로 결합한다.

[0010] 본 발명은 또한 부분적으로, PCSK9에 특이적으로 결합하여 PCSK9 및 LDL 수용체 사이의 결합을 억제하는, 치료학적 유효량의 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예를 들면, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 재조합 항체) 또는 EGF-A 폴리펩타이드를, 임의로 추가의 치료제(예를 들면, 에제티미베 및/또는 심바스타틴)와 함께 대상체에게 투여함을 포함하여, 대상체에서 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 고중성지방혈증(hypertriglyceridaemia), 시토스테롤혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상심질환, 혈관 염증 또는 황색종을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 항체 또는 단편 또는 EGF-A 폴리펩타이드는 LDL 수용체 EGF-A 도메인과 상호작용하는 PCSK9의 도메인 또는 PCSK9 촉매적 도메인에 특이적으로 결합한다.

[0011] 또한, 본 발명은 부분적으로, PCSK9에 특이적으로 결합하여, PCSK9 및 LDL 수용체 사이의 결합을 억제하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예를 들면, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 재조합 항체) 또는 EGF-A 폴리펩타이드, 및 약제학적으로 허용되는 담체를, 임의로 추가의 화학치료제(예를 들면, 에제티미베 및/또는 심바스타틴)와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 사람 LDL 수용체의 약 314번 아미노산 위치에서 시작하여 약 355번 아미노산 위치에서 끝나는 아미노산으로 이루어진, 상기 수용체의 단편에 대해 약 90% 이상의 아미노산 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드; 또는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 이의 약제학적 조성물을

제공하며, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 임의로 (i) PCSK9에 결합하고; (ii) PCSK9에 결합하기 위해 LDL 수용체 또는 항-PCSK9 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 경쟁하고; (iii) 동물에게 투여시 총 콜레스테롤 수준을 감소시키고; (iv) 동물에게 투여시 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수준을 감소시키고; (v) 동물에게 투여시 아포지단백질 B 수준을 감소시키고; (vi) 동물에게 투여시 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율을 감소시키며; (vii) 동물에게 투여시 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소시키는 것으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 특성을 포함한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 서열 3의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드; 또는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 이의 약제학적 조성물이 제공된다.

[0013]

본 발명은 (i) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 11B5 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; (ii) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 75B9 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; (iii) 서열 26의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 77D10 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; (iv) 서열 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 29C10 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; (v) 서열 42의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역의 22D11 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; (vi) 서열 50의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 1F11/1G11 중쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; (vii) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 11B5 경쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; (viii) 서열 22의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 75B9 경쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; (ix) 서열 30의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 77D10 경쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; (x) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 29C10 경쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; (xi) 서열 46의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 22D11 경쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및 (xii) 서열 54의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 1F11/1G11 경쇄 면역글로불린의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 구성원을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 또한, 본 발명은 (i) 아미노산 서열 G F N I K D T Y M H (서열 11)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 R I D P A N G H T E Y D P K F Q D (서열 12)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 S Y F G S I F A Y (서열 13)을 포함하는 HCDR3; (ii) 아미노산 서열 G F N I K D T Y I H (서열 19)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 R I D P A N G H T E Y D P K F Q G (서열 20)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 S Y Y G S I F A Y (서열 21)을 포함하는 HCDR3; (iii) 아미노산 서열 G F N I K D Y Y I H (서열 27)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 W I D P E N G D T E Y A P K F Q G (서열 28)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 Y Y R Y D D G T W F P Y (서열 29)를 포함하는 HCDR3; (iv) 아미노산 서열 G F N I K D T Y I H (서열 35)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G (서열 36)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 G Y Y R Y Y S L D Y (서열 37)을 포함하는 HCDR3; (v) 아미노산 서열 G F T F S N H D M A (서열 43)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 S I T P S G G T T Y Y R D S V E G (서열 44)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 Q N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y (서열 45)를 포함하는 HCDR3; (vi) 아미노산 서열 G Y T F T D Y Y M N (서열 51)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 D I N P N N G G A I Y N Q K F K G (서열 52)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 G I I T E I A E D F (서열 53)을 포함하는 HCDR3; (vii) 아미노산 서열 S A S S S V S Y L Y (서열 15)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 R S S H R A S (서열 16)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 H Q Y Q S Y P P T (서열 17)을 포함하는 LCDR3; (viii) 아미노산 서열 S A S S S V S Y L F (서열 23)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 R T S Y L A S (서열 24)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 H Q Y H T Y P P T (서열 25)을 포함하는 LCDR3; (ix) 아미노산 서열 R A S G N I H S Y L A (서열 31)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 N A K T L P D (서열 32)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 Q H F W N T P W T (서열 33)을 포함하는 LCDR3; (x) 아미노산 서열 R A S Q D I S N Y L N (서열 39)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 Y S S R L H S (서열 40)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서

열 Q Q G K T L P L T (서열 41)을 포함하는 LCDR3; (xi) 아미노산 서열 R S S Q S L V Y S D G N T Y L H (서열 47)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 R V S N R F S (서열 48)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 L Q S T H F P P T (서열 49)을 포함하는 LCDR3; 및 (xii) 아미노산 서열 K A S Q N V G T N V V (서열 55)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 S A S Y R Y S (서열 56)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 Q Q Y K T Y P Y T (서열 57)을 포함하는 LCDR3로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 구성원을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0014]

추가로, 본 발명은 (a) 아미노산 서열:
 E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V T L S C T A S G F N I K D T Y
 M H W V N Q R P E Q G L V W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q D
 K A T I T T D T S S N T A Y L H L S S L T S G D T A V Y Y C A R S
 Y F G S I F A Y W G Q G T L V T V S A (서열 10)을
 포함하는 면역글로불린 중쇄; (b) 아미노산 서열:
 Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S S S V S Y L Y
 W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P A R F S G S G S
 G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y Q S Y P P T F G G
 G T K L E I K R A (서열 14)을
 포함하는 면역글로불린 경쇄; (c) 아미노산 서열:
 E V Q L Q Q S G A D L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y
 I H W V K Q R P E Q G L E W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q G
 R A T L T T D T S S N T A Y L Q L F S L T S E D S A V Y F C A R S
 Y Y G S I F A Y W G Q G T L V T V S A (서열 18)을
 포함하는 면역글로불린 중쇄; (d) 아미노산 서열:
 Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S S S V S Y L F
 W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S Y L A S G V P A R F S G S G S
 G T S F S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y H T Y P P T F G G
 G T K L E I K R A (서열 22)을
 포함하는 면역글로불린 경쇄; (e) 아미노산 서열:
 E V Q L Q Q S G A E L V R S G A S V K L S C T T S G F N I K D Y Y
 I H W V K Q R P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A P K F Q G
 K A T M T A D T S S N T A Y L Q L S S L T S A D T A V Y Y C N A Y
 Y R Y D D G T W F P Y W G Q G T L V T V S A (서열 26)을
 포함하는 면역글로불린 중쇄; (f) 아미노산 서열:
 D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G N I H S Y L
 A W Y Q Q K Q G K S P Q F L V D N A K T L P D G V P S R F S V S G
 S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G T Y Y C Q H F W N T P W T F G
 G G T K L E I K R A (서열 30)을
 포함하는 면역글로불린 경쇄; (g) 아미노산 서열:
 E V L L Q Q S V A E L V R P G A S V R L S C T A S G F N I K D T Y
 I H W V R Q R P E Q G L E W F G W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G
 K A T L T T D T S S N T A Y L H L S S L T S E D S A I Y Y C A R G
 Y Y R Y Y S L D Y W G Q G T S V T V S S (서열 34)을
 포함하는 면역글로불린 중쇄; (h) 아미노산 서열:

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S N Y L
N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y Y S S R L H S G V P S R F S G R G
S G T D Y S L T I S T L E Q E D I A T Y F C Q Q G K T L P L T F G
A G T K L E L K R A

포함하는 번역글로불린 경쇄; (i) 아미노산 서열: (서열 38)을

E V Q L V D S G G G L V Q P G R S L K L S C A A S G F T F S N H D
M A W V R Q A P T K G L E W V A S I T P S G G T T Y Y R D S V E G
R F T V S R D N V K S S L H L Q M D S L T S E D T A T Y Y C A R Q
N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y W G Q G V M V T V S S

42)을 포함하는 번역글로불린 중쇄; (j) 아미노산 서열: (서열

D V L M T Q T P V S L P V S L G G Q V S I S C R S S Q S L V Y S D
G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y R V S N R F S G V P D R
F S G S G S G T D F T L K I S R V E P E D L G L Y Y C L Q S T H F
P P T F G S G T K L E I K R A

포함하는 번역글로불린 경쇄; (k) 아미노산 서열: (서열 46)을

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K V S G Y T F T D Y Y
M N W V K Q S H G K S L E W I G D I N P N N G G A I Y N Q K F K G
K A T L T V D K S S S I A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T S G
I I T E I A E D F W G Q G T T L T V S S

50)을 포함하는 번역글로불린 중쇄; 및 (l) 아미노산 서열: (서열

D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N V G T N V
V W Y Q Q K P G Q S P K A L I H S A S Y R Y S G V P D R F K G S G
S G T D F T L T I T N V Q S E D L A G F F C Q Q Y K T Y P Y T F G
G G T Q L E I K R A

(서열 54)을 포함하는 번역글로불린 경쇄로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 구성원을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 본 발명의 양태들은 예를 들면, 추가의 화학치료제, 예를 들면, 심혈관계, 아드레날린 차단제, 항고혈압제, 안지오텐신 시스템 억제제, 안지오텐신-전환 효소(ACE) 억제제, 관상혈관확장제, 이노제, 아드레날린 자극제 또는 HMG-CoA 리덕타제 억제제와 함께 본 발명의 어떠한 항체 또는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 포함한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 추가의 화학치료제는 에세티미베, 로바스타틴, 아토바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴, 리바스타틴, 심바스타틴, 아제티디논, 부놀롤 하이드로클로라이드, 아세부톨롤, 알프레놀롤 하이드로클로라이드, 아테놀롤, 카테올롤 하이드로클로라이드, 셀리프롤롤 하이드로클로라이드, 세타몰롤 하이드로클로라이드, 라베탈롤 하이드로클로라이드, 에스몰롤 하이드로클로라이드, 레보베타솔롤 하이드로클로라이드, 레보부놀롤 하이드로클로라이드, 나돌롤, 프락톨롤, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 소탈롤 하이드로클로라이드, 티몰롤, 티몰롤 말레에이트, 비소프롤롤, 비소프롤롤 푸마레이트, 네비발롤, 시클로프롤롤 하이드로클로라이드, 텍스프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 디아세톨롤 하이드로클로라이드, 딜레발롤 하이드로클로라이드, 엑사프로롤 하이드로클로라이드, 플레스톨롤 설페이트, 메탈롤 하이드로클로라이드, 메토프롤롤 2-프로판올, 메토프롤롤 타르트레이트, 파마톨롤 설페이트, 펜부톨롤 설페이트, 프락톨롤, 티프레놀롤 하이드로클로라이드 또는 톨라몰롤이다. 또한, 본 발명의 양태들은, 항체 또는 단편이 사람화된 항체, 모노클로날 항체, 표지된 항체, 2가 항체, 폴리클로날 항체, 이특이적 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 항-개체특이형(anti-idiotypic) 항체, 사람화된 항체, 이특이적 항체, 카멜화된(camelized) 단일 도메인 항체, 디아바디(diabody), scfv, scfv 이량체, dsfv, (dsfv)₂, dsFv-dsfv', 이특이적 ds 디아바디, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, 또는 도메인 항체인 것을 포함한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 번역글로불린 고정 영역, 예를 들면, κ 경쇄, γ1 중쇄, γ2 중쇄, γ3 중쇄 또는 γ4 중쇄에 연결된다. 또한, 본 발명은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 또한, 본 발명은 치료학적 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 어떠한 폴리펩타이드 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 또는 이의 약제학적 조성물을; 임의로, 예를 들면, 본원에 기재된 바와 같은 추가의 화학 치료제와 함께 대상체에게 투여함을 포함하여, 대상체에서 총 콜레스테롤 수준; 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수준; 아포지단백질 B 수준; 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율; 또는 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소시키거나; 또는 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 고중성지방혈증, 시토스테롤혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상심질환, 혈관 염증 또는 황색종을 치료하는 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 하나 이상의 숙주 세포 내로 상기 중쇄 및/또는 경쇄 면역글로불린을 암호화하고 이의 발현을 지시하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 도입하는 단계; 및 상기 중쇄 및 경쇄 면역글로불린이 발현되는 조건하에 상기 숙주 세포를 배양시키는 단계를 포함하여, 제1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법을 제공하며; 예를 들면, 여기서, 상기 경쇄를 암호화하고 이의 발현을 지시하는 상기 폴리뉴클레오타이드 및 상기 중쇄를 암호화하고 이의 발현을 지시하는 상기 폴리뉴클레오타이드는 별개의 숙주 세포 내에 존재한다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1a 내지 도 1d. 마우스 항-사람 PCSK9 항체의 성숙한 가변 영역 아미노산 서열. CDR은 밑줄그어져 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 콜레스테롤 장애를 치료하는 혁신적인 방법을 위한 방법 및 조성물을 포함한다. 본 발명의 방법 및 조성물은 LDL 수용체 경로를 조절함으로써 콜레스테롤 장애를 치료하는데 유용하다. 특히적으로, 본 발명의 방법 및 조성물은 PCSK9 및 LDLR 사이의 상호작용을 길항시킴으로써 혈류로부터의 LDL의 증가된 청소(clearance)를 유도한다. PPI 차단과 관련된 상당한 기술적 난제에도 불구하고, 본 발명은 이러한 상호작용을 표적하고 차단하기 위한 방법을 제공하고, 이로써, 혈액 콜레스테롤 수준과 관련된 유익한 효과를 유도한다.

[0019] 용어 저밀도 지단백질 수용체(LDLR)는 어떠한 이러한 수용체, 예를 들면, 사람 LDLR과 함께 이의 어떠한 대립유전자 변이체를 포함한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 전장 LDLR은 다음의 아미노산 서열(참조: 예를 들면, 진뱅크(GenBank) NM_000527.2):

```
MGFWGKLRWTVALLAAAGTAVGDR CERNEFQCQDGKCI SYKWVCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCG
GRVNRCI PQFWRCDCGVDCDNGSDEQGCPPKTC SQDEFRC HDGKCI SRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTGCPAS
FQCNSSTCIPQLWACDNDPDCEDGSEWPQRCRGLYVFQGDSSPCSAFEFHCLSGECIHSSWRCDGGPDCKDKSDE
ENCAVATCRPDEFQCS DGNCHGSRQC DREYDCKDMSDEVGCVNVTLC EGPKNFKCHSGECITL DKVCNMARDCRD
WSDEPIKECGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLV AQRRCEDIDECQDPDTC S QLCVNLEGGYKCQCE
EGFQ LDPHTKACKAVGSIAYLFFTNRHEVRKMTLDRSEYTS LI PNLNRNVVALDTEVASNRIYWSDL SQRMICSTQL
DRAHGVSSYD TVISRDIQAPDGLAVDWIHSNIYWTDSVLGT VSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPVHGFM Y
WTDWGT PAKIKKGG LNVVDIYSLVTENIQWPNGITL D LLSGRLYWVDSKLHSISSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHP
FSLAVFEDKVFWDI INEAI F SANRLTGSDVNLLAENLLSPEDMVL FHNLTQPRGVNWCERTT LSNGGCQYLCLPA
PQINPHSPKFTCACP DGM L LARDMR SCLTEAEAAVATQETSTVRLKVSSTAVRTQHTTTRPV P DTSRLPGATPGLT
TVEIVTMSHQALGDVAGRGNEKKPSSVRALSIVLP I VLLVFLCLGVFLLWKNWRLKNINSINFDN P VYQKTTEDEV
RICHNQDGYSPSRQMVSL EDDVA
```

[0020] (서열 1)을 포함한다.

[0022] 본 발명의 하나의 양태에서, 가용성 LDLR 단편은 다음의 아미노산 서열[참조: Yamamoto et al., Cell (1984) 39:27 - 38]:

```
AVGDR CERNEFQCQDGKCI SYKWVCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRVNRCI PQFWRCDCGVDCD
NGSDEQGCPPKTC SQDEFRC HDGKCI SRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTGCPAS FQCNSSTCIPQLWACDNDPDC
EDGSEWPQRCRGLYVFQGDSSPCSAFEFHCLSGECIHSSWRCDGGPDCKDKSDEENCAVATCRPDEFQCS DGNCH
HGSRQC DREYDCKDMSDEVGCVNVTLC EGPKNFKCHSGECITL DKVCNMARDCRDWSDEPIKECGTNECLDNNGGC
SHVCNDLKIGYECLCPDGFQLV AQRRCEDIDECQDPDTC S QLCVNLEGGYKCQCEEGFQ LDPHTKACKAVGSIAYL
FFTNRHEVRKMTLDRSEYTS LI PNLNRNVVALDTEVASNRIYWSDL SQRMICSTQLDRAHGVSSYD TVISRDIQAPD
GLAVDWIHSNIYWTDSVLGT VSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPVHGFM YWTDWGT PAKIKKGG LNVVDIY
SLVTENIQWPNGITL D LLSGRLYWVDSKLHSISSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHPFSLAVFEDKVFWDI INEAI F
SANRLTGSDVNLLAENLLSPEDMVL FHNLTQPRGVNWCERTT LSNGGCQYLCLPA PQINPHSPKFTCACP DGM L L
RDMR SCLTEAEAAVATQETSTVRLKVSSTAVRTQHTTTRPV P DTSRLPGATPGLT TVEIVTMSHQALGDVAGRGNE
KNPSSVR
```

[0023] (서열 2)를 포함한다.

[0025] 본 발명의 하나의 양태에서, LDL 수용체의 EGF-A 도메인은 아미노산 서열: GTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLV AQRRCEDI (서열 3)을 포함한다.

[0026] 용어 "대상체"는 임의의 동물, 예를 들면, 사람과 같은 포유동물을 포함한다.

[0027] PCSK9

[0028] 본 발명은 PCSK9, 예를 들면, 사람 PCSK9에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물 및 방법을 포함한다. 본 발명의 일부 양태에서, 아래 기재된 다양한 종으로부터 특이적 PCSK9 폴리펩타이드 서열 또는 이의 항원성 단편은 항원으로서 사용될 수 있다:

사람 [gi|31317307|ref|NP_777596.2](#) 프로단백질 전환요소 설파리신/ 렉신 유형 9
프레프로단백질 [호모 사피엔스]

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDGDYEEVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCAKD
PWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELALKLPHV
DYIEEDSSVFAQSI PWNLERITPPRYRADEYQPPDGSSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDENVPE
EDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQVLVQPV
GPLVVLPLLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGT
LGTNFGRCVDLFAPGEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELT LAELRQRLIHFS
AKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFS
FSGKRGRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAAEASMGTRVHCHQGHVLT
GCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQT VACEEGW
TLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQ

[0029]

(서열 4)

침팬지 [gi|114556790|ref|XP_001154126.1](#) 예상됨 : 프로단백질 전환요소
설파리신/ 렉신 유형 9 [판 트로글로다이테스]

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDGDYEEVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVLKEE
THLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIP
WNLERITPPRYRADEYQPPDGSSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDENVPEEDGTRFHRQASKCDS
HGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQVLVQPVGPLVVLPLLAGGYSR
VLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTGTNFGRCVDLFAPG
EDTIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELT LAELRQRLIHFS AKDVINEAWFPEDQRV
LTENLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRGRGERMEAQGG
KLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSIHNTAPPAAEAGMTRVHCHQGHVLTGCSSHWEVEDLGTHK
PFWLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQT VACEEGWTLTGCSALPGTSHVL
GAYAVDNTCVVRSRDVSTAGSTSEEAAVAVAICCRSRHLAQASQELQ

[0031]

(서열 5)

마우스 [gi|23956352|ref|NP_705793.1](#) 프로단백질 전환요소 설파리신/ 렉신 유형 9
[무스 무스쿨러스]

MGTBCSAWLRWPLPLPLPLLLLLLLLLLCPGAGAQEDGDYEEMLALPSQEDGLADEAAHVATATFRRC
LFEAWRLPGTYIVVLMEETQRLQIEQT AHRUQTRAARRGYVIKVLHIFYDLFPGLVKMSSDLGLALKL
PHVEYIEEDSFVFAQSI PWNLERIIPAWHQTEEDRSPDGSSQVEVYLLDTSIQGAHREIEGRVTITDFNS
VPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGTSLSLRLVNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQLI
QPSGPLVVLPLLAGGYSRILNAACRHLARTGVVLVAAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPV
LGTGTNFGRCVDLFAPGKDIIGASSDCSTCFMSQSGTSQAAAHVAGTVARMLSREPTLT LAELRQRLIH
FSTKDVINMAWFPEDQVLT PNLVATLPPSTHETGGQLLCRTVWSAHSGPTRTATATARCAPDEELLSCS
SFSKSGRRRGDWIEAIGGQVQCKALNAFGGEGVYAVARCCLVPRANCSIHNTPAARAGLETHVHCHQKDH
VLITGCSFHWEDLSVRRQPALRSRRQPGQCVGHQAASVYASCCHAPGLECKIKEHGISGPSEQVT VACE
AGWTLTGCVNLPGASLTIGAYSVDNLCVARVHDTARADRTSGEATVAAAICCRSRPSAKASWVQ

[0033]

[0034] (서열 6)

랫트 [gij77020250|ref|NP_954862.2|](#) 프로단백질 전환요소 셉틸리신/ 렉신 유형 9
[랫터스 노르베지쿠스]

MGIRCSTWLRWPLSPQLLLLLLLCPTGSRAQDEGDYEELMLALPSQEDSLVDEASHVATATFRRCSCKEA
WRLPGTYVWVLMEEETQRLQVEQTAHRLQTWAARRGYVIKVLHVFDLFPGLVKMSSDLLGLALKLPHVE
YIEEDSLVFAQSIIPWNLRIIPAWQQTEEDSSPDGSSQVEVYLLDTSIQSGHREIEGRVTITDFNSVPPEE
DUTFRHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGTSLSLRLVLCNQKGKTVSGTLIGLEFIRKSQLIQPSG
PLVLLPLAGGYSRILNTACQRLARTGVVLVAAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLQTL
GTNFGRCVDLFAFGKDIIGASSDCSTCYMSQSGTSQAAAHVAGIVAMMLNRDPALTLAELRQRLILFSTK
DVINMAWPPEDQRLVTPNRVATLPPSTQETGGQLLCRTVWSAHSGPTRTATATARCAPEEELLSCSSFSR
SGRRRGDRIEAIGGQQVCKALNAFGGEGVYAVARCCLLPRVNCSTHNTPAARAGPQTPVHCHQKDHVLTG
CSFHWEVENLRAQQPPLRSRHPGQCQVGHQEASVHASCCCHAPGLECKIKEHGIAGFAEQTVACEAGWT
LTGCNVLPGLASLPLGAYSVDNVCVARIRDAGRADRTSEEATVAAAICCRSRPSAKASWVHQ

[0035]

[0036] (서열 7)

[0037] EGF-A

[0038] 또한, 본 발명은 LDL 수용체 EGF-A 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 임의로 추가의 화학치료제(예를 들면, 본원에 기재된 바와 같은)와 함께 또는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 이의 약제학적 조성물을 대상체에 투여함을 포함하여, 대상체에서, 총 콜레스테롤 수준, 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수준, 아포지단백질 B 수준, 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율 또는 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소시키는 방법을 제공한다. LDL 수용체의 EGF-A 도메인은 PCSK9에 결합하고, 임의의 특정 이론 또는 메커니즘에 의해 얽매이지 않고, PCSK9에 결합하기 위해 전장의, 내인성 LDL 수용체와 경쟁함으로써 PCSK9의 활성을 감소시킬 수 있다.

[0039] 예를 들면, 본 발명의 하나의 양태에서, EGF-A 도메인은 다음의 아미노산 서열을 포함하거나 다음의 아미노산 서열로 이루어진다: QTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRCEDE (서열 3).

[0040] 본 발명의 하나의 양태에서, 사람 LDL 수용체는 다음의 아미노산 서열:

1 mgpwgwkirw tvaillaaag tavgdrcern efqcqdgkci sykwvcdgsa ecqdgdsesq
61 etclsvtcks gdfscggrvn rcipqfwred gqvdcngsd eqgcppktes gdefrchdggk
121 cisrqfvcds drdcldgsde ascpvltcgp asfqnsstc ipqlwacdnd pdcedgsdew
181 pqrorglyvf qgdaspesaf efhcisgeci hsswrcdggp dckdksdeen cavatorpde
241 fqcsgdnci hgsrqcdreyd ckdmssdevgc vnvltcegnp kfkchsgeci tldkvcnmar
301 dcrdwsdepi kecgtnecl d nnggcs hvcn dlkigyec lc pdgfgqlvaqr rcedidecqd
361 pdtcsqlcwn leggykqce egfqlphtk ackavgslay lfftnrhevr kmtldrseyt
421 slipnlrnrv aldtvasnr iywsdlsqrm icstqldrah gvssydtvis rdiqapdgla
481 vdwihsnryw tdsvlgtvsv adtkgvkrkt lfrenskpr aivvdpvhgf mywtawgtpa
541 kikkgglingv diyslvteni qwpngitldl lsgrylwvds klhssidiv nggnrktilc
601 dekrlahpfs lavfedkvfw tdiineaifs anrltgsdvn llaenllspe dmvlfnltq
661 prgvnwcert tlnsggcqyl clpapqinph spkftcacpd gmlardmrs clteaavaa
721 tqetstvrk vsstavrtqh ttrpvpdts rlpqatpgit tveivtmshq algdvagrqn
781 ekkpssvral sivilpivllv flclgvfllw knwrlknins infdnpyqk ttedevhich
841 nqdgyspsr qmvsieddva

[0041]

[0042] (서열 1)을 포함한다.

[0043] EGF-A 도메인은 밑줄그어져 있고, 굵게 표시되어있다. 또한, 진뱅크 수탁 번호(Genbank accession nos.): NP_000518, EAW84170, BAD92646.1 또는 AAF24515.1을 참조한다.

[0044] 또한, 본 발명은 예를 들면, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물 속에 EGF-A 폴리펩타이드를 포함하거나 EGF-A 폴리펩타이드로 이루어진 분리된 폴리펩타이드를 포함한다. 또한, 본 발명은 예를 들면, 기타, 거의 인접한 LDL 수용체 서열과 자연적으로 근접하지 않은 어떠한 다른 이중 폴리펩타이드에 임의로 융합된 폴리펩타이드, 및 예를 들면, 본원에 논의된 바와 같은 융합된 폴리펩타이드의 투여를 포함하는 치료 방법을

제공한다. 어떠한 당해 폴리펩타이드도 "EGF-A 폴리펩타이드"로서 본원에서 언급될 수 있고, EGF-A 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 "EGF-A 폴리뉴클레오타이드"로서 언급될 수 있다.

[0045] 예를 들면, 본 발명의 하나의 양태에서, EGF-A 폴리뉴클레오타이드는 다음의 뉴클레오타이드 서열:

GGTACTAATGAATGCTCTTCATAATAATCGTGGTTGTTCTCATGTTTGTAAATGATCTTAAA
ATTTGGTTTATGAATGCTCTTTGTCCTGATGGTTTTCAACTTGTTCCTCAACGTCGTTGTGAAGATATT

[0046]

(서열 9)을 포함한다.

[0047]

[0048]

앞서 논의된 바와 같이, 본 발명은 또한, 본 발명의 EGF-A 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 융합체, 및 "태그(tag)"로서 지칭될 수 있는 제2 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 잔기를 포함한다. 본 발명의 융합된 폴리펩타이드는 예를 들면, 발현 벡터 내로 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 단편을 삽입함으로써 편리하게 작제할 수 있다. 본 발명의 융합체는 정제 또는 검출을 용이하게하는 태그를 포함할 수 있다. 이러한 태그는 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 핵사히스티딘(His6) 태그, 말토오스 결합 단백질(MBP) 태그, 해마글루티닌(haemagglutinin: HA) 태그, 셀룰로스 결합 단백질(CBP) 태그 및 myc 태그를 포함한다. 검출 가능한 태그, 예를 들면, ³²P, ³⁵S, ³H, ¹⁴C, ¹⁸F, ¹²⁵I, ¹³¹I, ^{113m}In, ⁷⁶Br, ⁶⁷Ga, ^{99m}Tc, ¹²³I, ¹¹¹In 및 ⁶⁸Ga는 또한, 본 발명의 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 표지하는데 사용될 수 있다. 이러한 융합체를 작제하고 사용하는 방법은 매우 통상적이며 당해 분야에 잘 공지되어 있다.

[0049]

또한, 본 발명의 이러한 EGF-A 폴리펩타이드를 암호화하는 임의의 분리된 폴리뉴클레오타이드는 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 어떠한 벡터 및 이러한 벡터를 포함하는 숙주 세포(예를 들면, 세균 숙주 세포 또는 진핵 세포)와 함께 본 발명의 일부를 형성한다. 또한, 발현 조절 서열(예를 들면, 프로모터)과 작동적으로 연합된 당해 폴리뉴클레오타이드가 본 발명의 일부를 형성한다.

[0050]

일반적으로, "프로모터" 또는 "프로모터 서열"은 세포내에서(예를 들면, 직접 또는 다른 프로모터-결합된 단백질 또는 물질을 통해) RNA 폴리머라제를 결합시킬 수 있고 암호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역이다. 일반적으로, 프로모터 서열은 전사 개시 부위에 의해 3' 말단에서 결합되고 상부(5' 방향)로 연장되어 어떠한 수준으로든 전사를 개시하는데 필요한 소수의 염기 또는 성분을 포함한다. 프로모터 서열내에서는 전사 개시 부위(예를 들면, 뉴클레아제 S1으로 맵핑함으로써 편리하게 정의됨), 및 RNA 폴리머라제의 결합에 관여하는 단백질 결합 도메인(켄센수스 서열)을 찾을 수 있다. 프로모터는 인헨서 및 리프레서 서열을 포함하는 다른 발현 조절 서열 또는 본 발명의 핵산과 작동적으로 연합될 수 있다. 유전자 발현을 조절하기 위해 사용될 수 있는 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터(참조: 미국 특허 제5,385,839호 및 제5,168,062호), SV40 얼리 프로모터 영역[참조: Benoist, et al., (1981) Nature 290:304-310], 로우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus)의 3' 긴 말단 반복부내에 함유된 프로모터[참조: Yamamoto, et al., (1980) Cell 22:787-797], 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터[참조: Wagner, et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445], 메탈로티오네인 유전자의 조절 서열[참조: Brinster, et al., (1982) Nature 296:39-42]; β-락타마제 프로모터와 같은 원핵세포 발현 벡터[참조: Villa-Komaroff, et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731], 또는 tac 프로모터[참조: DeBoer, et al., (1983) proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25; 또한 참조: "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American (1980) 242:74-94]; 및 Gal 4 프로모터, ADC (알코올 탈수소효소) 프로모터, PGK(포스포글리세롤 키나제) 프로모터 또는 알칼린 포스파타제 프로모터와 같은 효모 또는 기타 진균으로부터의 프로모터 성분을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0051]

암호화 서열은, 서열이 RNA, 바람직하게는 mRNA(이는 이후 RNA 스플라이싱(RNA가 인트론을 함유하는 경우)되고, 임의로 암호화 서열에 의해 암호화된 단백질로 해독된다) 내로 암호화 서열의 RNA 폴리머라제 매개된 전사를 지시하는 경우에 세포 또는 다른 발현 시스템 속에서 전사 및 해독 조절 서열의 "조절하에" 있거나, 이와 "기능적으로 연합"되어 있거나 또는 "작동적으로 연합"되어 있다.

[0052]

용어 "발현하다" 및 "발현"은, 유전자, RNA 또는 DNA 서열내 정보가 실현되도록, 예를 들면, 상응하는 유전자의 전사 및 해독에 관여하는 세포내 작용을 활성화시킴으로써 단백질을 생산하는 것을 허용하거나 유발시킴을 의미한다. DNA 서열은 세포 내에서 또는 세포에 의해 발현되어 "발현 산물", 예를 들면, RNA(예를 들면, mRNA) 또는 단백질을 형성한다. 또한, 발현 산물 자체는 세포에 의해 "발현되는" 것으로 일컬어질 수 있다.

[0053]

용어 "벡터"는 DNA 또는 RNA 서열이 숙주 세포 내로 도입됨으로써 숙주를 형질전환시키고, 임의로 도입된 서열의 발현 및/또는 복제를 촉진할 수 있는 비히클(예를 들면, 플라스미드)을 포함한다.

- [0054] 본 발명에 사용될 수 있는 벡터들은 플라스미드, 바이러스, 박테리오파지, 통합가능한 DNA 단편, 및 숙주의 게놈 내로 핵산의 도입을 용이하게 할 수 있는 기타 비히클을 포함한다. 플라스미드는 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태이지만, 유사한 기능을 제공하고, 당해 분야에 공지되어 있거나 공지되는 모든 다른 형태의 벡터도 본원에서 사용하기에 적합하다. 예를 들면 문헌[참조: Pouwels, et al, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985 및 Supplements, Elsevier, N. Y., 및 Rodriguez et al. (eds.), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, 1988, Buttersworth, Boston, MA]을 참조한다.
- [0055] 용어 "발현 시스템"은 예를 들면, 벡터에 의해 운반되어 숙주 세포로 도입된 단백질 또는 핵산을 적합한 조건 하에 발현할 수 있는 숙주 세포 및 상용성 벡터를 포함한다. 통상의 발현 시스템은 이. 콜라이(E. coli) 숙주 세포 및 플라스미드 벡터, 곤충 숙주 세포 및 바쿨로바이러스 벡터, 및 포유동물 숙주 세포 및 벡터를 포함한다.
- [0056] 원핵세포 숙주-벡터 시스템은 많은 상이한 종들에 대한 다양한 벡터를 포함한다. DNA를 증폭하기 위한 대표적인 벡터는 pBR322 또는 이의 많은 유도체(예를 들면, pUC18 또는 19)이다. EGF-A 폴리펩타이드를 발현하는데 사용될 수 있는 벡터들은 lac 프로모터(pUC-계열); trp 프로모터(pBR322-trp); lpp 프로모터(pIN-계열); 람다-pP 또는 pR 프로모터(pOTS); 또는 하이브리드 프로모터, 예를 들면, ptac(pDR540)를 함유하는 벡터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 문헌[참조: Brosius et al., "Expression Vectors Employing Lambda-, trp-, lac-, and lpp-derived Promoters", in Rodriguez and Denhardt (eds.) Vectors. A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, 1988, Buttersworth, Boston, pp. 205-236]을 참조한다. 많은 폴리펩타이드가 미국 특허 제4,952,496호, 제5,693,489호 및 제5,869,320호, 및 문헌[참조: Davanloo, P., et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2035-2039; Studier, F. W., et al., (1986) J. Mol. Biol. 189: 113-130; Rosenberg, A. H., et al., (1987) Gene 56: 125-135; 및 Dunn, J. J., et al., (1988) Gene 68: 259]에 기재된 바와 같은 이.콜라이/T7 발현 시스템 내에서 높은 수준으로 발현될 수 있다.
- [0057] 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터(예를 들면, 발현 조절 서열, 예를 들면, 프로모터와 작동적으로 연합된)를 적합한 숙주 세포 내로 도입하고, 벡터 내 폴리뉴클레오타이드로부터 폴리펩타이드를 발현하기에 적합한 조건 하에 숙주 세포를 증식(예를 들면, 적합한 액체 성장 배지속에서 성장시킴)시킴을 포함하는, 본 발명의 EGF-A 폴리펩타이드의 발현 방법을 포함한다.
- [0058] 또한, 본 발명의 일부는 서열 3의 아미노산에 대해 약 90% 이상의 아미노산 서열 유사성 또는 상동성을 갖는 임의의 분리된 폴리펩타이드이다. 본 발명의 하나의 양태에서, 이러한 폴리펩타이드는 PCSK9 또는 이의 작용성 단편에 결합해야 하거나; 또는 PCSK9 및 LDL 수용체 또는 이종의 어떠한 작용성 단편의 결합을 억제해야 하거나; 또는 대상체, 예를 들면, 허용가능한 동물 모델(예를 들면, 포유동물, 예를 들면, 개, 영장류, 토끼, 마우스 또는 랫트) 또는 사람에서 총 콜레스테롤 수준, 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수준, 아포지단백질 B 수준, 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율 또는 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소시키는 능력을 나타내어야 한다.
- [0059] 본 발명에 따르면, 당해 분야의 기술 내에 통상적인 분자 생물학, 미생물, 및 재조합 DNA 기술을 사용할 수 있다. 이러한 기술은 문헌에서 충분히 설명되어 있다. 예를 들면, 문헌[참조: 예를 들면, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(본원에는 "Sambrook, et al., 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1986)); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel, et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)]을 참조한다.
- [0060] 용어 "숙주 세포"는 세포에 의한 물질의 생산, 예를 들면, 세포에 의한 유전자, DNA 또는 RNA 서열 또는 단백질의 발현 또는 복제를 위해 어떠한 방식으로든 선택되거나, 변형되거나, 형질감염되거나, 형질전환되거나, 성장되거나 사용되거나, 또는 조작된 모든 유기체의 모든 세포를 포함한다.
- [0061] 용어 "분리된 폴리뉴클레오타이드" 또는 "분리된 폴리펩타이드"는 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, RNA 또는 DNA 분자, 또는 혼합된 중합체) 또는 폴리펩타이드를 각각 포함하고, 이는 세포내 또는 재조합체 DNA 발현 시스템 내에서 정상적으로 발견되는 기타 성분으로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된다. 이들 성분들은 세포막, 세

포벽, 리보솜, 폴리머라제, 혈청 성분 및 세포의 게놈 서열을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0062] 본 발명의 하나의 양태에서, 분리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 분자의 본질적으로 균질한 성분이지만 일부 이질성 성분을 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명은 본 발명의 EGF-A 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드에 상응하는 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열에 대한 어떠한 표면적인 또는 약간의 변형도 고려한다. 특히, 본 발명은 본 발명의 EGF-A 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 서열 보전적 변이체를 고려한다. EGF-A 폴리펩타이드 서열의 "서열-보전적 변이체"는, 제공된 코돈내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 변화가 당해 위치에서 암호화된 아미노산에 있어서의 변형을 가져오지 않는 변이체이다. 본 발명의 EGF-A 폴리펩타이드의 작용-보전적 변이체가 또한 본 발명에 의해 고려된다. "작용-보전적 변이체"는, 하나의 아미노산이 유사한 특성을 가지는 아미노산으로 치환됨을 포함하나, 이에 한정되는 의미를 갖지 않는, 폴리펩타이드의 전체적인 구조 및/또는 작용(예를 들면, PCSK9에 결합하거나 PCSK9 및 LDL 수용체 또는 이의 단편의 결합을 억제하는 능력)을 변화시키지 않고 EGF-A 폴리펩타이드 내 하나 이상의 아미노산 잔기가 변화된 변이체이다. 유사한 특성을 갖는 아미노산은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 상호교환 가능한 극성/친수성 아미노산은 아스파라긴, 글루타민, 세린, 시스테인, 트레오닌, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하고; 상호교환 가능한 비극성/소수성 아미노산은 글라이신, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 프롤린, 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 포함하며; 상호교환 가능한 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하고; 상호교환 가능한 염기성 아미노산은 히스티딘, 라이신 및 아르기닌을 포함한다.

[0064] 본 발명은 EGF-A(예를 들면, 서열 9) 및 이의 작용적 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 뿐만 아니라 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 핵산을 포함한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 핵산을 낮은 스트링젠시 조건(stringency condition) 하에, 중간 스트링젠시 조건 하에 또는 높은 스트링젠시 조건 하에서 하이브리드화한다. 핵산 분자는, 핵산 분자의 일본쇄 형태가 온도 및 용액 이온 강도의 적절한 조건(참조: Sambrook, et al., 상기) 하에 기타 핵산 분자에 아닐링(annealing)할 수 있는 경우, 다른 핵산 분자, 예를 들면, cDNA, 게놈성 DNA, 또는 RNA에 "하이브리드화 가능"하다. 온도 및 이온 강도의 조건은 하이브리드화의 "스트링젠시"를 결정한다. 전형적인 낮은 스트링젠시 하이브리드화 조건은 55℃, 5X SSC, 0.1% SDS, 0.25% 우유, 및 42℃에서의 포름아미드 무함유; 또는 30% 포름아미드, 5X SSC, 0.5% SDS, 42℃이다. 전형적인 중간 스트링젠시 하이브리드화 조건은 40% 포름아미드, 5X 또는 6X SSC, 42℃에서 수행되는 것을 제외하고 낮은 스트링젠시 조건과 유사하다. 높은 스트링젠시 하이브리드화 조건은 50% 포름아미드, 5X 또는 6X SSC 및, 임의로 더 높은 온도(예를 들면, 42℃: 57℃, 59℃, 60℃, 62℃, 63℃, 65℃ 또는 68℃보다 높은 온도)에서 수행되는 것을 제외하고는 낮은 스트링젠시 조건과 유사하다. 일반적으로, SSC는 0.15M NaCl 및 0.015M Na-시트레이트이다. 하이브리드화는, 비록 하이브리드화의 스트링젠시에 의존하여 염기들 사이의 불일치가 가능하다고 해도, 2개의 핵산이 상보성 서열을 함유하는 것이 요구된다. 핵산을 하이브리드화하기 위한 적절한 스트링젠시는 당업자에게 잘 알려진 변수인 핵산의 길이 및 상보성의 정도에 좌우된다. 2개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 유사성 또는 상동성의 정도가 클수록, 핵산이 하이브리드화할 수 있는 스트링젠시가 높아진다. 길이가 100개 이상인 뉴클레오타이드의 하이브리드에 대해서는, 용융온도를 계산하는 등식이 유도되었다(참조: Sambrook, et al., 상기 참조, 9.50-9.51). 보다 짧은 핵산, 즉, 올리고뉴클레오타이드로 하이브리드화하는 경우, 불일치의 위치는 보다 중요하게 되었고, 올리고뉴클레오타이드의 길이는 이의 특이성을 결정한다(참조: Sambrook, et al., 상기 참조). 본 발명의 하나의 양태에서, 당해 폴리뉴클레오타이드는 PCSK9 또는 이의 작용성 단편에 결합해야 하거나; 또는 PCSK9 및 LDL 수용체 또는 이 중의 어떠한 작용성 단편의 결합을 억제해야 하거나; 또는 대상체, 예를 들면, 허용가능한 동물 모델(예를 들면, 포유동물, 예를 들면, 개, 영장류, 토끼, 마우스 또는 랫트) 또는 사람에서 총 콜레스테롤 수준, 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수준, 아포지단백질 B 수준, 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율 또는 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소시키는 능력을 나타내야 하는 폴리펩타이드를 암호화한다.

[0065] 또한, 본 발명은 BLAST 알고리즘에 의한 비교가 수행되는 경우, 참조 뉴클레오타이드 서열(서열 9) 또는 참조 아미노산 서열(서열 3)에 대해 약 70% 이상의 동일성, 바람직하게는 약 80% 이상의 동일성, 보다 바람직하게는 약 90% 이상의 동일성, 및 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 동일성(예를 들면, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서, 알고리즘의 매개변수는 각각의 참조 서열의 전장에 걸쳐서 각각의 서열들 사이의 최대 일치치를 수득하도록 선택된다. BLAST 알고리즘에 의한 비교가 수행되는 경우, 서열 3의 참조 EGF-A 아미노산 서열에 대해 약 70% 이상의 유사성, 바람직하게는 약 80% 이상의 유사성, 보다 바람직하게는 약 90% 이상의 유사성, 및 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 유사성(예를 들면, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%)을 갖는 아미노산 서

열을 포함하는 폴리펩타이드가 또한 본원에 포함되고, 여기서, 알고리즘의 매개변수는 각각의 참조 서열의 전장에 걸쳐 각각의 서열들 사이에 최대 일치율을 수득하도록 선택된다.

[0066] 서열 동일성은 비교하는 2개의 서열들의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 사이의 정확한 일치율을 말한다. 서열 유사성은 비교하는 2개의 폴리펩타이드의 아미노산들 사이의 정확한 일치 및 동일하지 않고, 생화학적으로 관련된 아미노산들 사이의 일치 둘 다를 나타낸다. 유사한 특성을 공유하고 상호교환가능한 생화학적으로 관련된 아미노산은 상기 논의되어 있다.

[0067] BLAST 알고리즘에 관한 다음의 문헌은 본원에 참조로 인용되어 있다: **BLAST ALGORITHMS**: Altschul, S.F., et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., et al., (1993) Nature Genet 3:266-272; Madden, T.L., et al., (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., et al., (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J. C, et al., (1993) Comput Chem, 17:149-163; Hancock, J.M., et al., (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; **ALIGNMENT SCORING SYSTEMS**: Dayhoff, M.O., et al., "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3, M.O. Dayhoff (ed.), PP-345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R. M., et al., "Matrices for detecting distant relationships." in Atlas of protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3." M.O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., et al., (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., et al., (1992) Proc. Natl Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S. F., et al., (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; **ALIGNMENT STATISTICS**: Karlin, S., et al., (1990) Proc. Natl, Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., et al., (1993) Proc. Natl, Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., et al., (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; 및 Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York,

[0068] **항체**

[0069] 본 발명은 항-PCSK9 항체 및 이의 항원-결합 단편을 포함하는 방법 및 조성물을 포함한다. 용어 항-PCSK9 항체 또는 유사어는 PCSK9(예를 들면, 사람 PCSK9)에 특이적으로 결합하는 임의의 항체를 포함한다. 본 발명에 사용된 항-PCSK9 항체 및 이의 항원-결합 단편은 총 PCSK9 단백질에 대해 생성되거나 이에 결합하는 항체 및 단편, 및 PCSK9내 특수한 짧은 에피토프, 예를 들면, PCSK9 촉매적 도메인 또는 이의 일부(예를 들면, **VFAQSIPWNLER** 에피토프(서열 8)에 결합하는) 또는 아미노산 **SRSQKRRGERMEA** (서열 4의 아미노산 490번 내지 502번)를 갖는 PCSK9의 C-말단 도메인(즉, PCSK9의 촉매적 도메인에 대한 C-말단)에 대해 생성되거나 이에 결합하는 항체를 포함한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 항-PCSK9 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 LDL 수용체의 EGF-A 도메인과 상호작용하는 PCSK9의 도메인에 결합한다.

[0070] 본 발명의 특이적인 분리된 마우스 항-사람 PCSK9 항체 면역글로불린 서열을 아래 나타낸다. 각각의 면역글로불린쇄에 대한 CDR 서열은 밑줄그어져 있다.

[0071] **11B5 면역글로불린 중쇄**

E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V T L S C T A S G F N I K D T Y
M H W V N Q R P E Q G L V W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q D
 K A T I T T D T S S N T A Y L H L S S L T S G D T A V Y Y C A R S S
Y F G S I F A Y W G Q G T L V T V S A

[0072]
 [0073] (서열 10)

[0074] HCDR1: G F N I K D T Y M H (서열 11)

[0075] HCDR2: R I D P A N G H T E Y D P K F Q D (서열 12)

[0076] HCDR3: S Y F G S I F A Y (서열 13)

[0077] 11B5 번역글로블린 경쇄

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S S S V S Y L Y
W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P A R F S G S G S
G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y Q S Y P P T F G G
G T K L E I K R A

[0078]
[0079] (서열 14)

[0080] LCDR1: S A S S S V S Y L Y (서열 15)

[0081] LCDR2: R S S H R A S (서열 16)

[0082] LCDR3: H Q Y Q S Y P P T (서열 17)

[0083] 75B9 번역글로블린 중쇄

E V Q L Q Q S G A D L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y
I H W V K Q R P E Q G L E W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q G
R A T L T T D T S S N T A Y L Q L F S L T S E D S A V Y F C A R S Y
Y Y G S I F A Y W G Q G T L V T V S A

[0084]
[0085] (서열 18)
[0086] HCDR1: G F N I K D T Y I H (서열 19)
[0087] HCDR2: R I D P A N G H T E Y D P K F Q G (서열 20)
[0088] HCDR3: S Y Y G S I F A Y (서열 21)

[0089] 75B9 번역글로블린 경쇄

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S S S V S Y L F
W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S Y L A S G V P A R F S G S G S
G T S F S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y H T Y P P T F G G
G T K L E I K R A

[0090]
[0091] (서열 22)
[0092] LCDR1: S A S S S V S Y L F (서열 23)
[0093] LCDR2: R T S Y L A S (서열 24)
[0094] LCDR3: H Q Y H T Y P P T (서열 25)

[0095] 77D10 번역글로블린 중쇄

E V Q L Q Q S G A E L V R S G A S V K L S C T T S G F N I K D Y Y
I H W V K Q R P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A P K F Q G
K A T M T A D T S S N T A Y L Q L S S L T S A D T A V Y Y C N A
Y Y R Y D D G T W F P Y W G Q G T L V T V S A

[0096]
[0097] (서열 26)

- [0098] HCDR1: G F N I K D Y Y I H (서열 27)
- [0099] HCDR2: W I D P E N G D T E Y A P K F Q G (서열 28)
- [0100] HCDR3: Y Y R Y D D G T W F P Y (서열 29)
- [0101] **77D10 면역글로불린 경쇄**
- D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G N I H S Y L
A W Y Q Q K Q G K S P Q F L V D N A K T L P D G V P S R F S V S G
S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G T Y Y C Q H F W N T P W T F G
G G T K L E I K R A
- [0102] (서열 30)
- [0103] LCDR1: R A S G N I H S Y L A (서열 31)
- [0104] LCDR2: N A K T L P D (서열 32)
- [0105] LCDR3: Q H F W N T P W T (서열 33)
- [0107] **29C10 면역글로불린 중쇄**
- E V L L Q Q S V A E L V R P G A S V R L S C T A S G F N I K D T Y
I H W V R Q R P E Q G L E W F G W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G
K A T L T T D T S S N T A Y L H L S S L T S E D S A I Y Y C A R G
Y Y R Y Y S L D Y W G Q G T S V T V S S
- [0108] (서열 34)
- [0109] HCDR1: G F N I K D T Y I H (서열 35)
- [0110] HCDR2: W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G (서열 36)
- [0111] HCDR3: G Y Y R Y Y S L D Y (서열 37)
- [0113] **29C10 면역글로불린 경쇄**
- D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S N Y L
N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y Y S S R L H S G V P S R F S G R G
S G T D Y S L T I S T L E Q E D I A T Y F C Q Q G K T L P L T F G
A G T K L E L K R A
- [0114] (서열 38)
- [0115] LCDR1: R A S Q D I S N Y L N (서열 39)
- [0116] LCDR2: Y S S R L H S (서열 40)
- [0117] LCDR3: Q Q G K T L P L T (서열 41)

- [0119] 22D11 면역글로불린 중쇄
- E V Q L V D S G G G L V Q P G R S L K L S C A A S G F T F S N H D
M A W V R Q A P T K G L E W V A S I T P S G G T T Y Y R D S V E G
R F T V S R D N V K S S L H L Q M D S L T S E D T A T Y Y C A R Q
N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y W G Q G V M V T V S S
- [0120]
- [0121] (서열 42)
- [0122] HCDR1: G F T F S N H D M A (서열 43)
- [0123] HCDR2: S I T P S G G T T Y Y R D S V E G (서열 44)
- [0124] HCDR3: Q N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y (서열 45)
- [0125] 22D11 면역글로불린 경쇄
- D V L M T Q T P V S L P V S L G G Q V S I S C R S S Q S L V Y S D
G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y R V S N R F S G V P D R
F S G S G S G T D F T L K I S R V E P E D L G L Y Y C L Q S T H F
P P T F G S G T K L E I K R A
- [0126]
- [0127] (서열 46)
- [0128] LCDR1: R S S Q S L V Y S D G N T Y L H (서열 47)
- [0129] LCDR2: R V S N R F S (서열 48)
- [0130] LCDR3: L Q S T H F P P T (서열 49)
- [0131] 1F11/1G11 면역글로불린 중쇄
- E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K V S G Y T F T D Y Y
M N W V K Q S H G K S L E W I G D I N P N N G G A I Y N Q K F K G
K A T L T V D K S S S I A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T S G
I I T E I A E D F W G Q G T T L T V S S
- [0132]
- [0133] (서열 50)
- [0134] HCDR1: G Y T F T D Y Y M N (서열 51)
- [0135] HCDR2: D I N P N N G G A I Y N Q K F K G (서열 52)
- [0136] HCDR3: G I I T E I A E D F (서열 53)
- [0137] 1F11/1G11 면역글로불린 경쇄
- D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N V G T N V
V W Y Q Q K P G Q S P K A L I H S A S Y R Y S G V P D R F K G S G
S G T D F T L T I T N V Q S E D L A G F F C Q Q Y K T Y P Y T F G
G G T Q L E I K R A
- [0138]
- [0139] (서열 54)

- [0140] LCDR1: K A S Q N V G T N V V (서열 55)
- [0141] LCDR2: S A S Y R Y S (서열 56)
- [0142] LCDR3: Q Q Y K T Y P Y T (서열 57)
- [0143] 본 발명은 문헌[참조: Kabat, "Sequences of proteins of Immunological Interest" (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)] 또는 문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature 342:878 (1989)]; 및 문헌[J. Mol. Biol. 186:651 (1989) (Kabat 또는 Chothia)] 또는 문헌[Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997)]에 기재된 바와 같이 정의된 상기한 경쇄 및/또는 중쇄 면역글로불린 으로부터 취해진 하나 이상의(예를 들면, 3개) CDR을 포함하는 분리된 폴리펩타이드(예를 들면, 항체 및 이의 항원-결합 단편)를 포함한다.
- [0144] 따라서, 본 발명은 상기 나타난 하나 이상의 경쇄 및/또는 중쇄 면역글로불린 CDR을 포함하는 어떠한 항체 또는 이의 항원-결합 단편도 포함한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 항체 또는 단편은 예를 들면, 위의 특정한 순서 로 모든 3개의 경쇄 CDR 및/또는 모든 3개의 중쇄 CDR을 포함한다. 본 발명의 양태들은 예를 들면, 상기 나타 낸 바와 같이 항-PCSK9 항체 및 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 여기서, 항체 또는 단편은 모노클로날 항체, 카멜화된(camelized) 단일 도메인 항체, 폴리클로날 항체, 이특이적 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 항-개체 특이형 항체, 사람화된 항체, 이특이적 항체, 디아바디, 일본쇄항체, 디설파이드 Fv(dsFv), Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, 및 도메인 항체이다. 따라서, 용어 항체는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다특이적 항체 (예를 들면, 이특이적 항체)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 용어 항체의 항원-결합 단편은 전형적으로 모 항체의 항원-결합 또는 가변 영역(예를 들면, 하나 이상의 CDR)의 적어도 일부를 포함하는 항체의 단편 또는 유도 체를 포함하며, 이러한 단편 또는 유도체는 모 항체의 결합 특이성의 적어도 일부를 보유한다. 항체 항원-결합 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; dsFv; (dsFv)₂, ds 디아바디; dsFv-dsFv'; 일본쇄 항체 분자, 예 를 들면, sc-Fv, sc-Fv 이량체(2가 디아바디); 이특이적 디아바이; 및 항체 단편으로부터 형성된 다특이적 항체 를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0145] 본 발명은 PCSK9, 예를 들면, 사람 PCSK9에 특이적으로 결합하는 항-PCSK9 항체 및 이의 항원-결합 단편을 포함 한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 사람 PCSK9에 특이적으로 결합하는 항체 또는 단편은 랫트, 마우스 또는 칩 팬지 PCSK9의 결합과 비교하여 사람 PCSK9에 우선적으로 결합한다. 사람 PCSK9에 대한 우선적인 결합은, 랫트, 마우스 또는 칩팬지 PCSK9 결합의 정도가 어떠한 정도보다도 친화성보다 더 큰 친화성(예를 들면, 1%, 10%, 50%, 100%, 또는 10X 더 높은 친화성)으로 결합함을 의미한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 항-사람 PCSK9 항체는 PCSK9의 임의의 다른 종에 대한 어떠한 검출가능한 결합 없이(예를 들면, 마우스 또는 랫트 PCSK9에 대한 검출가능한 결합없이) 사람 PCSK9에 결합한다. 특이적 항-PCSK9 결합은, 결합할 수 있고 최소 Kd가 약 500 nM 인 임의의 다른 단백질의 Kd보다 적어도 약 100-배 이상의 높은 Kd를 갖는 PCSK9에 대한 항체 또는 이의 항원 단편의 결합을 나타낸다.
- [0146] 항체를 생성시키는 어떠한 적합한 방법도 사용될 수 있다. 예를 들면, 수령인은 PCSK9 또는 이의 면역원성 단편으로 면역시킬 수 있다. 면역화의 어떠한 적합한 방법도 사용될 수 있다. 이러한 방법은 항원증강제, 기타 면역자극제, 반복된 추가접종 면역화, 및 하나 이상의 면역화 경로의 사용을 포함할 수 있다. PCSK9의 어떠한 적합한 공급원도 본원에 기재된 조성물 및 방법 등의 항체 및 단편의 생성을 위한 면역원으로서 사용될 수 있다. 이러한 형태는 전장 단백질, 펩타이드(들), 및 당해 분야에 공지된 재조합, 합성, 화학 또는 효소적 분해 수단을 통해 생성된 에피토프를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0147] 항원의 어떠한 형태도 생물학적으로 활성인 항체를 발생시키는데 충분한 항체를 발생시키는데 사용할 수 있다. 따라서, 유발 항원은 단일 에피토프, 다수 에피토프, 또는 전장 단백질 단독 또는 당해 분야에 공지된 하나 이상의 면역원성 증강제와 조합한 단백질일 수 있다. 유발 항원은 분리된 전장 단백질, 세포 표면 단백질(예를 들면, 적어도 항원의 일부로 형질감염된 세포를 사용한 면역화), 또는 가용성 단백질 단편일 수 있다.
- [0148] 어떠한 적합한 방법도 PCSK9를 억제하기 위한 목적하는 생물학적 특성을 갖는 항체를 유발하는데 사용할 수 있다. 모노클로날 항체(mAbs)는 각종 포유동물 숙주, 예를 들면, 마우스, 랫트, 다른 설치류, 사람, 다른 영장류 등으로부터 제조될 수 있다. 이러한 모노클로날 항체를 제조하기 위한 기술은 문헌[예를 들면, Stites et al.

(eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY(4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, 및 본원에 인용된 참조문헌; Harlow and Lane (1988) ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL CSH Press; Goding (1986) MOONCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2d ed.) Academic Press, New York, NY)에 서 찾을 수 있다. 따라서, 모노클로날 항체는 당해 분야의 숙련된 조사자에게 친숙한 다수의 기술에 의해 수득될 수 있다. 전형적으로, 목적하는 항원으로 면역화된 동물로부터의 비장 세포는 일반적으로 골수종세포와의 융합에 의해 무한증식된다. 문헌[Kohler and Milstein (1976) Eur. J. Immunol. 6:511-519]을 참조한다. 무한증식의 대안적인 방법은 엡스테인 바르 바이러스(Epstein Barr Virus), 종양유전자, 또는 레트로바이러스를 사용한 형질전환, 또는 당해 분야에 공지된 다른 방법을 포함한다. 문헌[예를 들면, Doyle et al. (eds. 1994 and periodic supplements) CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley and Sons, New York, NY]을 참조한다. 단일 무한증식된 세포로부터 발생한 콜로니들을 항원에 대한 목적하는 특이성 및 친화성의 항체의 생산을 위해 스크리닝하고, 이러한 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 수율은 척추동물 숙주의 복강 내로의 주입을 포함하는 각종 기술에 의해 향상될 수 있다. 대안적으로, 예를 들면, 문헌[참조: Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281]에 의해 개략된 일반적인 프로토콜에 따라 사람 B 세포로부터 DNA 라이브러리를 스크리닝함으로써 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 DNA 서열을 분리할 수 있다.

[0149] 다른 적합한 기술은 파지(phage) 또는 유사한 벡터 내 항체의 라이브러리의 선택을 포함한다. 문헌[예를 들면, Huse et al. 상기참조; 및 Ward et al. (1989) Nature 341:544-546]을 참조한다. 본 발명의 폴리펩타이드 및 항체는 키메라 항체 또는 사람화된 항체를 포함하는 변형 또는 변형 없이 사용될 수 있다. 빈번하게는, 폴리펩타이드 및 항체는 검출가능한 신호를 제공하는 물질을 공유 또는 비-공유적으로 결합시킴으로써 표시시킬 수 있다. 광범위한 표지 및 접합 기술이 과학 문헌 및 특허 문헌 둘 다에서 공지되어 있고 광범위하게 보고되고 있다. 적합한 표지는 방사선헌종, 효소, 물질, 보조인자, 억제제, 형광잔기, 화학발광 잔기, 자기 입자 등을 포함한다. 당해 표지의 사용을 교시하는 특허는 미국 특허 제3,817,837호; 제3,850,752호; 제3,939,350호; 제3,996,345호; 제4,277,437호; 제4,275,149호; 및 제4,366,241호를 포함한다. 또한, 재조합 면역글로불린이 생산될 수 있거나[참조: Cabilly의 미국 특허 제4,816,567호; 및 Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033]; 또는 유전자삽입 마우스에서 제조될 수 있다[참조: Mendez et al. (1997) Nature Genetics 15:146-156].

[0150] 또한, 주어진 항원으로 면역화시킨 경우 사람 면역글로불린을 생산하는 마우스가 당해 분야에서 이용가능하다. 예를 들면, 문헌[참조: Lonberg, N., et al., (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N., et al., (1995) Intern. Rev. Immunol. 13:65-93, 및 Harding, F., et al., (1995) Ann. N. Y Acad. Sci 764:536-546); Taylor, L., et al., (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J., et al., (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon, et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:3720-3724; Choi, et al., (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J., et al., (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon, et al., (1994) J Immunol. 152:2912-2920; Lonberg, et al., (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor, L, et al., (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N., et al., (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93; Harding, F., et al., (1995) Ann. N.Y Acad. Sci 764:536-546; Fishwild, D., et al., (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 및 Harding, et al., (1995) Annals NY Acad. Sci. 764:536-546]을 참고한다. 또한, 문헌[참조: 미국 특허 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,789,650호; 제5,877,397호; 제5,661,016호; 제5,814,318호; 제5,874,299호; 제5,770,429호 및 제5,545,807호; 및 국제 특허 공개 공보 제WO 98/24884호; 제WO 94/25585호; 제WO 93/12227호; 제WO 92/22645호 및 제WO 92/03918호]을 참조한다.

[0151] "Fab 단편"은 하나의 경쇄, 및 하나의 중쇄의 C_H1 및 가변 영역으로 이루어진다. Fab 분자의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 디설파이드 결합을 형성할 수 없다.

[0152] "Fc" 영역은 항체의 C_H1 및 C_H2 도메인을 포함하는 두 개의 중쇄 단편을 함유한다. 두 개의 중쇄 단편은 두 개의 이상의 디설파이드 결합에 의해 및 C_H3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 함께 유지된다.

[0153] "Fab' 단편"은 하나의 경쇄, 및 V_H 도메인과 C_H1 도메인 및 또한 C_H1과 C_H2 도메인 사이의 영역을 함유하여쇄내 디설파이드 결합이 두 개의 Fab' 단편의 두 개의 중쇄 사이에 형성되어 F(ab')₂ 분자를 형성할 수 있는 하나의 중쇄의 일부를 함유한다.

- [0154] "F(ab')₂ 단편"은 두 개의 경쇄, 및 쇠내 디설파이드 결합이 두 개의 중쇄 사이에 형성되도록 C_H1 및 C_H2 도메인 사이의 고정 영역의 일부를 함유하는 두 개의 중쇄를 함유한다. 따라서, F(ab')₂ 단편은 두 개의 중쇄 사이의 디설파이드 결합에 의해 함께 유지되는 두 개의 Fab' 단편으로 이루어진다.
- [0155] "디설파이드 안정화된 Fv 단편" 및 "dsFv"는 디설파이드 브릿지(bridge)에 의해 결합된 가변 중쇄(V_H) 및/또는 가변 경쇄(V_L)를 갖는 분자를 포함한다.
- [0156] "Fv 영역"은 중쇄와 경쇄 둘 다로부터의 가변 영역을 포함하지만, 고정 영역이 결여되어 있다.
- [0157] 용어 "일본쇄(single-chain) Fv" 항체 또는 "scFv" 항체는 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하는 항체 단편을 나타내며, 여기서, 이들 도메인은 일본쇄 폴리펩타이드 쇠내에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩타이드는 V_H 및 V_L 쇠가 쌍을 이루도록 하여 결합 부위(예를 들면, 5개 내지 12개 잔기 길이)를 형성하도록 하는, V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 개요에 대해서는 문헌[참조: Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315]을 참조한다. 또한, 국제 특허공개공보 제WO 88/01649호 및 미국 특허 제4,946,778호 및 제 5,260,203호를 참조한다.
- [0158] "도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 면역학적으로 작용성인 면역글로불린 단편이다. 몇몇 예에서, 두 개 이상의 V_H 영역은 펩타이드 링커와 공유결합하여 2가 도메인 항체를 생성한다. 2가 도메인 항체의 두 개의 V_H 영역은 동일하거나 상이한 항원을 표적화할 수 있다.
- [0159] "2가 항체"는 2개의 항원-결합 부위를 포함한다. 몇몇 예에서, 2개의 결합 부위는 동일한 항원 특이성을 갖는다. 그러나, 2가 항체는 이특이적일 수 있다. 예를 들면, 본 발명은 scfv 이량체 및 dsfv 이량체를 포함하고, 각각의 scfv 및 dsfv 잔기는 동일하거나 상이한 항원 결합 특이성을 가질 수 있다.
- [0160] 본 발명의 하나의 양태에서, (dsfv)₂는 3개의 펩타이드쇄: 펩타이드 링커에 의해 결합하고, 디설파이드 브릿지에 의해 2개의 V_L 잔기에 결합한 2개의 V_H 잔기를 포함한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 이특이적 ds 디아바디는 VH₁ 및 VL₁ 사이의 디설파이드 브릿지에 의해 VH₁-VL₂ 잔기(또한, 펩타이드 링커에 의해 매어둠)에 결합한 VH₁-VL₂(펩타이드 링커에 의해 매어둠)를 포함한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 이특이적 dsfv-dsfv'는 또한 3개의 펩타이드 쇠를 포함한다: VH₁-VH₂ 잔기, 여기서, 중쇄는 펩타이드 링커[예를 들면, 긴 가요성 링커(long flexible linker)]에 의해 결합하고, 디설파이드 브릿지에 의해 VL₁ 및 VL₂ 잔기에 각각 결합하고; 여기서, 각각의 디설파이드 쌍의 중쇄 및 경쇄는 상이한 항원 특이성을 갖는다. 본 발명의 하나의 양태에서, scfv 이량체(2가 디아바디)는 V_H-V_L 잔기를 포함하고, 여기서, 중쇄 및 경쇄는 펩타이드 링커에 의해 결합되고, 기타 당해 잔기와 이량체화되어 1개의 쇠의 V_H가 다른 쇠의 V_L과 배위하여 2개의 동일한 결합 부위를 형성하게 된다. 본 발명의 하나의 양태에서, 이특이적 디아바디는 VH₁-VL₂(펩타이드 링커에 의해 연결됨)과 연합된 VH₁-VL₂ 잔기(펩타이드 링커에 의해 연결됨)를 포함하고, 여기서, VH₁ 및 VL₁가 배위하고, VH₂ 및 VL₂가 배위하고, 각각의 배위된 세트는 다양한 항원 특이성을 갖는다.
- [0161] 본원에 사용된 것으로서 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동질 항체의 집단으로부터 수득된 항체, 즉, 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연적으로 존재하는 돌연변이를 제외하고는 동일한 집단을 포함하는 개개 항체를 말한다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고 단일의 항원 에피토프에 대해 지시되어 있다. 대조적으로, 통상의(폴리클로날) 항체 제제는 전형적으로 상이한 에피토프에 대해 지시된(또는 특이적인) 다수의 항체를 포함한다. 수식어구 "모노클로날"은 항체의 실질적인 동질 집단으로부터 수득된 바와 같은 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특수 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 간주되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 재조합 또는 문헌[참조: Kohler et al. (1975) Nature 256: 495]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법(참조: 미국 특허 제4,816,567호)에 의해 제조할 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들면, 문헌[참조: Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628 및 Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597]에 기술된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 분리할 수 있다. 또한, 문헌[Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731]을 참조한다.

- [0162] 모노클로날 항체는 "키메라" 항체(면역글로불린)를 포함하며, 여기서, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 종으로부터 기원하거나 또는 특수 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체내 상응하는 서열과 동일하거나 동질이며, 여기서, 쇄의 나머지는 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한, 다른 종으로부터 기원하거나 또는 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체내 상응하는 서열, 및 이러한 항체의 단편과 동일하거나 동질이다[참조: 미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855]. 예를 들면, 가변 도메인은 마우스와 같은 실험 동물로부터의 항체("모 항체")로부터 획득되고, 고정 도메인 서열은 사람 항체로부터 획득되어서, 획득한 키메라 항체는 모 마우스 항체보다 사람 대상체에서 역 면역 반응을 유발하기 쉽지를 것이다.
- [0163] 본 발명의 재조합 항체 또는 이의 단편은 본 발명의 양태에서, 재조합적으로 생산되는, 예를 들면, 유기체(예를 들면, 세균 세포(예를 들면, 이. 콜라이) 또는 포유동물(예를 들면, CHO 세포) 내로 형질전환된 항체 또는 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유한 플라스미드) 내로 도입되고, 유기체로부터 항체 또는 단편을 분리한, 폴리뉴클레오타이드로부터 발현된 항체이다.
- [0164] 본 발명은 본 발명의 임의의 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 폴리펩타이드를 발현하기 위한 방법을 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 하나의 양태는 (i) 면역글로불린 중쇄의 하나 이상의 가변 도메인을 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드, 및 적어도 면역글로불린 경쇄의 가변 도메인을 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드로 하기 숙주 세포를 형질전환시키는 단계, 및 (ii) 상기 제1 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 폴리뉴클레오타이드를 독립적으로 발현시켜서 상기 면역글로불린 중쇄 및 경쇄가 상기 형질전환된 숙주 세포 내에서 별개의 분자로서 생산되는 단계를 포함하여, 숙주 세포(예를 들면, 단일 숙주 세포), 예를 들면, CHO 세포(예를 들면, CHO-K1 또는 DXB11 세포) 속에서, 적어도 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인을 포함하는 면역글로불린 분자 또는 면역학적으로 작용성인 면역글로불린 단편을 생산하는 방법을 포함한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 CMV 프로모터와 같은 프로모터에 작동적으로 연결된다. 또한, 본 발명은 제1 일배체 효모 숙주 세포[예를 들면, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)와 같은 피치아(*Pichia*)]를 적어도 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄의 가변 도메인을 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드로 형질전환시키고, 제2 일배체 효모 숙주 세포(예를 들면, 피치아 파스토리스와 같은 피치아)를 다른 쇄를 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드로 형질전환시키는 것을 도입하여, 일배체 세포가 다배수체, 예를 들면, 이배체(예를 들면, 교배를 통한)를 형성하도록 하고, 다배수체를 일배체로부터 선택한 다음, 중쇄 및 경쇄가 다배수체 속에서 발현되고, 임의로 배양 배지 내로 분비되는 조건하에 다배수체를 배양시킴을 포함하는, 면역글로불린 분자 또는 면역학적으로 작용성인 면역글로불린 단편을 생산하는 방법을 포함한다.
- [0165] 본 발명의 하나의 양태에서, 숙주 세포 내로 도입된 폴리뉴클레오타이드는 탄곳(ectopic)에 남는 반면, 본 발명의 다른 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포의 염색체 DNA 내로 통합된다.
- [0166] 본 발명의 하나의 양태에서, 항체 또는 단편을 생산하는 방법은 숙주 세포 및/또는 배양 배지로부터 발현된 쇄를 분리시킴을 추가로 포함한다.
- [0167] 또한, 본 발명은 카멜화된 일본쇄 도메인 항체를 포함한다. 참조: 예를 들면, Muyldermans et al. (2001) Trends Biochem. Sci. 26:230; Reichmann et al. (1999) J. Immunol. Methods 231:25; 제WO 94/04678호; 제WO 94/25591호; 미국 특허 제6,005,079호, 이들은 본원에 전문이 참조로 인용되어 있다. 낙타과(Camelidae: 낙타, 단봉낙타 및 라마)는 경쇄가 결여되어서 '중쇄' IgG 또는 HCAb(중쇄 항체의 경우)로 명명되는 IgG 항체를 포함한다. HCAb는 전형적으로 중쇄 가변 도메인으로만 이루어지기 때문에 약 95 kDa의 분자량을 갖는다. HCAb는 경쇄가 결여되어 있지만, 이들은 진정한 항원-결합 레퍼토리를 갖는다(참조: Hamers-Casterman et al., Nature (1993) 363:446-448; Nguyen et al., Adv. Immunol. (2001) 79:261-296; Nguyen et al, Immunogenetics. (2002) 54:39-47). 하나의 양태에서, 본 발명은 변형을 갖는 2개의 V_H 도메인을 포함하는 단일 도메인 항체를 제공하여 단일 도메인 항체를 형성한다.
- [0168] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타내고, 여기서, 단편은 동일한 폴리펩타이드 쇄(V_H - V_L 또는 V_L - V_H)에서 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함한다. 동일한 쇄에서 두 개의 도메인 사이에 쌍을 이루는 것을 허용하기에는 매우 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인들을 다른 쇄의 상보성 도메인과 쌍을 이루도록 하여 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 디아바디는 문헌[참조: 유럽 특허 제404,097호; 제WO93/11161호; 및 Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448]에 보다 상세하게 기재되어 있다. 가공된 항체 변이체를 재검토하려면, 일반적으로 문헌[참조:

Holliger and Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23:1126-1136]을 참조한다.

- [0169] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "사람화된 항체"는 사람 및 비-사람(예를 들면, 마우스 또는 랫트) 항체로부터의 서열을 함유하는 항체들의 형태를 말한다. 일반적으로, 사람화된 항체는 하나 이상, 전형적으로 2개의 가변 도메인 모두를 실질적으로(여기서, 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프(CDRs)는 비-사람 면역글로불린 서열에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 프레임워크(framework: FR) 영역은 사람 면역글로불린 서열의 것이다) 포함할 것이다. 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 가변 영역은 3개의 추가변영역(또는 CDRs로 일컬어짐)에 의해 차단된 "프레임워크" 영역으로 이루어진다. 사람 프레임워크 서열에 대한 몇몇의 대중적인 공급원은 예를 들면, V-base(단백질 가공을 위한 MRC 센터)를 포함하여 이용가능하다. 사람화된 항체는 사람 면역글로불린 고정 영역(Fc)의 적어도 일부를 임의로 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 하나의 양태는 특이적 마우스 면역글로불린 CDR 및 본원에 기재된, 예를 들면, 사람 면역글로불린 고정 영역에 융합된 사람 면역글로불린 프레임워크 영역을 포함하는 사람화된 항-PCSK9(예를 들면, 항-사람 PCSK9) 항체를 포함한다. 다음의 미국 특허가 본원에 참조로 인용되어 있다: 제5,585,089호, 제5,693,761호, 제5,693,762호 및 제6,180,370호. 예를 들면, 본 발명의 양태는, CDR의 임의의 다른 그룹이 본 발명의 사람화된 항체 내에 포함되는 것을 포함한다:
- [0170] (i) 아미노산 서열 G F N I K D T Y M H (서열 11)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 R I D P A N G H T E Y D P K F Q D (서열 12)를 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 S Y F G S I F A Y (서열 13)을 포함하는 HCDR3;
- [0171] (ii) 아미노산 서열 G F N I K D T Y I H (서열 19)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 R I D P A N G H T E Y D P K F Q G (서열 20)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 S Y Y G S I F A Y (서열 21)을 포함하는 HCDR3;
- [0172] (iii) 아미노산 서열 G F N I K D Y Y I H (서열 27)을 포함하는 HCDR1; 아미노산 서열 W I D P E N G D T E Y A P K F Q G (서열 28)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 Y Y R Y D D G T W F P Y (서열 29)을 포함하는 HCDR3;
- [0173] (iv) 아미노산 서열 G F N I K D T Y I H (서열 35)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G (서열 36)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 G Y Y R Y Y S L D Y (서열 37)을 포함하는 HCDR3;
- [0174] (v) 아미노산 서열 G F T F S N H D M A (서열 43)을 포함하는 HCDR 1, 아미노산 서열 S I T P S G G T T Y Y R D S V E G (서열 44)를 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 Q N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y (서열 45)를 포함하는 HCDR3;
- [0175] (vi) 아미노산 서열 G Y T F T D Y Y M N (서열 51)을 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 D I N P N N G G A I Y N Q K F K G (서열 52)을 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 G I I T E I A E D F (서열 53)을 포함하는 HCDR3;
- [0176] (vii) 아미노산 서열 S A S S S V S Y L Y (서열 15)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 R S S H R A S (서열 16)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 H Q Y Q S Y P P T (서열 17)을 포함하는 LCDR3;
- [0177] (viii) 아미노산 서열 S A S S S V S Y L F (서열 23)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 R T S Y L A S (서열 24)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 H Q Y H T Y P P T (서열 25)을 포함하는 LCDR3;
- [0178] (ix) 아미노산 서열 R A S G N I H S Y L A (서열 31)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열

N A K T L P D (서열 32)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 Q H F W N T P W T (서열 33)을 포함하는 LCDR3;

[0179] (x) 아미노산 서열 R A S Q D I S N Y L N (서열 39)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 Y S S R L H S (서열 40)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 Q Q G K T L P L T (서열 41)을 포함하는 LCDR3;

[0180] (xi) 아미노산 서열 R S S Q S L V Y S D G N T Y L H (서열 47)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 R V S N R F S (서열 48)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 L Q S T H F P P T (서열 49)을 포함하는 LCDR3; 또는

[0181] (xii) 아미노산 서열 K A S Q N V G T N V V (서열 55)을 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 S A S Y R Y S (서열 56)을 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 Q Q Y K T Y P Y T (서열 57)을 포함하는 LCDR3.

[0182] 또한, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드와 함께 본원에 나타난 번역글로블린 쇠의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드, 당해 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 및 폴리뉴클레오타이드와 벡터를 포함하는 분리된 숙주 세포(예를 들면, CHO 세포, 세균 세포, 예를 들면, 이. 콜라이 및 진균 세포, 예를 들면, 에스, 세레비지애(S.cerevisiae) 및 피치아, 예를 들면, 피치아 파스토리스)를 포함한다. 또한, 폴리펩타이드를 제조하는 방법은 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 숙주 세포 내로 도입시키고, 폴리펩타이드가 발현될 수 있고, 임의로 분비될 수 있는 조건 하에 숙주 세포를 배양시킨 다음, 임의로 폴리펩타이드를 분리시킴을 포함함을 포함한다.

[0183] **치료적 방법, 투여 및 약제학적 제형**

[0184] 본 발명은 치료학적 유효량의 항-PCSK9 항체(예를 들면, 본원에 나타난 바와 같음) 또는 이의 항원-결합 단편 또는 EGF-A 폴리펩타이드를 투여함으로써 콜레스테롤 또는 지질 항상성의 장애 및 이와 관련된 장애, 예를 들면, 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 고중성지방혈증, 시토스테롤혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상심질환, 혈관 염증 및 황색종을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0185] 용어 고콜레스테롤혈증은 예를 들면, 가족성 및 비-가족성 고콜레스테롤혈증을 포함한다. 가족성 고콜레스테롤혈증(FHC)은 저밀도 지단백질(LDL)에 결합한 혈청 콜레스테롤의 상승으로 특징지어지는 상염색체 우성 장애이다. 가족성 고콜레스테롤혈증은 이종접합 FHC 및 동형접합 FHC 둘다를 포함한다.

[0186] 고지질혈증은 혈류 내 지질의 상승이다. 이들 지질은 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 인지질 및 중성지방을 포함한다. 고지질혈증은 예를 들면, 제I형, 제IIa형, 제IIb형, 제III형, 제IV형 및 제V형을 포함한다.

[0187] 시토스테롤혈증은 유전되는 식물 스테롤 저장 회귀병이다. 일반적으로, 감염된 환자에서의 대사 결함은 위장관으로부터 시토스테롤 과흡수, 이후의 감소된 제거로 인한 시토스테롤의 감소된 간 분비, 및 변형된 콜레스테롤 합성을 야기한다.

[0188] 죽상경화증은 지방 물질, 콜레스테롤, 세포 폐기물, 동맥의 내층 내 칼슘 및 피브린의 침착과 관련된 동맥의 경화를 포함한다. 야기되는 빌드업(buildup)은 플라그(plaque)로 지칭된다.

[0189] 죽상경화증은 경화를 야기하는 동맥 벽내 칼슘의 확산 빌드-업(build-up) 및 침착을 포함한다.

[0190] 또한, 본 발명은 심장병의 증가된 위험과 관련된 혈액 콜레스테롤 마커를 증진시키는 방법을 제공한다. 이들 마커는 높은 총 콜레스테롤, 높은 LDL, HDL에 대한 높은 총 콜레스테롤 비율 및 HDL에 대한 높은 LDL 비율을 포함한다.

[0191] 일반적으로, 200 mg/dL 미만의 총 콜레스테롤이 바람직한 것으로 고려되고, 200 내지 239 mg/dL은 경계 이상으로 고려되고, 240 mg/dL 및 이상은 경계 상위로 고려된다.

[0192] 일반적으로, 100 mg/dL 미만의 혈액 LDL 수준이 최적의 것으로 고려되고; 100 내지 129 mg/dL은 최적/최적 상위 근처로 고려되고, 130 내지 159 mg/dL은 경계 이상으로 고려되고, 160 내지 189 mg/dL은 경계 상위로 고려되며, 190 mg/dL 이상은 매우 높은 것으로 고려된다.

- [0193] 일반적으로, 정상으로 고려되는 HDL 수준은 적어도 35 내지 40 mg/dL이다. 심장병 위험의 다른 지표는 HDL에 대한 총 콜레스테롤의 비율이다. 일반적으로, 심장병의 초저 위험은 <3.4 (남자) 또는 <3.3(여자)의 비율과 서로 관련되어 있고; 저위험은 4.0(남자) 또는 3.8(여자)의 비율과 관련되어 있고, 평균 위험은 5.0(남자) 또는 4.5(여자)의 비율과 관련되어 있고, 중간 위험은 9.5(남자) 또는 7.0(여자)의 비율과 관련되어 있으며, 고위험은 >23(남자) 또는 >11(여자)의 비율과 관련되어 있다.
- [0194] 심장 질환 위험의 추가의 지표는 HDL에 대한 LDL의 비율이다. 일반적으로, 초저 위험은 1(남자) 또는 1.5(여자)의 비율과 관련되어 있고, 평균 위험은 3.6(남자) 또는 3.2(여자)의 비율과 관련되어 있고, 중간 위험은 6.3(남자) 또는 5.0(여자)의 비율과 관련되어 있고, 고 위험은 8(남자) 또는 6.1(여자)의 비율과 관련되어 있다.
- [0195] 본 발명의 하나의 양태에서, 본 발명의 항-PCSK9 항체 및 이의 항원-결합 단편 또는 EGF-A 폴리펩타이드는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 제형 내로 제형화된다. 제형에 관한 일반적인 정보는 예를 들면, 문헌[참조: Gilman, et al., (eds.) (1990), The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press; A. Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania.; Avis, et al., (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, New York; Lieberman, et al., (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, New York; and Lieberman, et al., (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, New York, Kenneth A. Walters (ed.) (2002) Dermatologies and Transdermal Formulations (Drugs and the Pharmaceutical Sciences). Vol 119, Marcel Dekker]을 참조한다.
- [0196] 본 발명의 항-PCSK9 항체 및 이의 항원-결합 단편 또는 EGF-A 폴리펩타이드는 약제학적으로 유용한 조성물을 제조하기 위해 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있고, 이로써 항체 또는 단편은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 합해진다. 담체, 부형제 또는 안정화제는 수용자에게 사용된 투여량 및 농도에서 무독성이고, 완충제, 예를 들면, 인산, 시트르산, 기타 유기산; 아스코르빈산을 포함하는 항산화제; 저분자량 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈, 아미노산, 예를 들면, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신; 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들면, EDTA; 당알콜, 예를 들면, 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 역이온, 예를 들면, 나트륨; 및/또는 비이온성 표면활성제, 예를 들면, TweenTM, PluronicTM 또는 PEG를 포함한다. 생체 내 투여에 사용되어지는 제형은 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통해 동결 건조 및 재구성 이전 또는 이후에 용이하게 달성된다. 본원의 치료학적 또는 약제학적 조성물 또는 제형은 일반적으로 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들면, 정맥 용액 백 또는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알 내에 둔다.
- [0197] 본 발명의 항체 및 이의 항원-결합 단편의 투여 경로는 하나의 양태에서, 비경구적 경로(예를 들면, 정맥내, 피하내, 동맥내, 종양내, 근육내, 복강내)로 투여된다.
- [0198] 본 발명의 약제학적 조성물의 용량 및 목적하는 항-PCSK9 또는 EGF-A 폴리펩타이드 농도는 계획된 특정 용도에 좌우되어 변할 것이다. 투여의 적절한 용량 또는 경로의 결정은 보통의 담당 의사의 기술내에 있다. 동물 실험은 사람 치료요법을 위한 유효 투여량의 결정에 신뢰할만한 지침을 제공한다. 유효 투여량의 종간의 스케일링 (scaling)은 문헌[참조: Mordenti, J. 및 Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42 96]에 기재된 원칙을 따라 수행할 수 있다.
- [0199] 대상체(예를 들면, 본원에 논의된 바와 같음)에서 장애를 치료하는데 사용되는 경우, 치료학적 유효 용량 또는 유효량의 항-PCSK9 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 EGF-A 폴리펩타이드가 대상체에게 투여된다. 본 발명의 하나의 양태에서, 치료학적 유효 용량은 무엇이든지 간에 임의의 정도로 총 혈청 콜레스테롤을 감소시키거나, 혈액 LDL 수준을 감소시키거나, 혈액 HDL 수준을 증가시키는데 충분한 용량이다. 본 발명의 하나의 양태에서, 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 고중성지방혈증, 시토스테롤혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상심질환, 혈관 염증 또는 황색종의 치료 또는 심질환 위험(예를 들면, 본원에 논의된 바와 같음)의 임의의 혈액 마커의 치료를 위한 치료학적 유효 용량의 항-PCSK9 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예를 들면, 본원에 기재된 바와 같음)은 약 0.1 mg/kg(체중)/주 내지 약 1.0 mg/kg/주이다. 치료학적 유효 용량의 가용성 PCSK9 EGF-A 폴리펩타이드는, 본 발명의 하나의 양태에서, 약 0.25 mg/kg/주 내지 약 25 mg/kg/주이다.

를 포함한다. β -아드레날린 수용체 차단제는 부놀롤 하이드로클로라이드(1(2H)-나프탈레논, 5-[3-(1,1-디메틸에틸)아미노]-2-하이드록시프로폭시]-3,4-디하이드로, 하이드로클로라이드, CAS RN 31969-05-8; 이는 Parke-Davis로부터 입수될 수 있다); 아세부톨롤(\pm N-[3-아세틸-4-[2-하이드록시-3-[(1-메틸에틸)아미노]프로폭시]페닐]-부탄아미드, 또는 (\pm)-3'-아세틸-4'-[2-하이드록시-3-(이소프로필아미노)프로폭시]부티르아닐리드); 아세부톨롤 하이드로클로라이드(예: N-[3-아세틸-4-[2-하이드록시-3-[1-메틸-에틸)아미노]프로폭시]페닐]-, 모노하이드로클로라이드, (\pm); 3'-아세틸-4'-[2-하이드록시-3-(이소프로필아미노)프로폭시]부티르아닐리드 모노하이드로클로라이드, 예를 들면, Wyeth-Ayerst로부터 입수 가능한 SECTRAL[®]

캡셀제); 알프레놀롤 하이드로클로라이드(2-프로판올, 1-[(1-메틸에틸)아미노]-3-[2-(2-프로페닐)페녹시]-, 하이드로클로라이드, CAS RN 13707-88-5(참조: 네덜란드 특허원 제6,605,692호)); 아테놀롤(예: 벤젠아세트아미드 4-[2'-하이드록시-3'-[(1-메틸에틸)아미노]프로폭시]-, 예를 들면, AstraZeneca로부터 입수 가능한 TENORMIN[®]

정맥내 주사제); 카테올롤 하이드로클로라이드(예: 5-[3-[(1,1-디메틸에틸)아미노]-2-하이드록시프로폭시]-3,4-디하이드로-2(1H)-퀴놀린 모노하이드로클로라이드, 예를 들면, Abbott로부터 입수 가능한 Cartrol[®]

Filmtab[®]

정제); 셀리프롤롤 하이드로클로라이드(3-[3-아세틸-4-[3-(3급-부틸아미노)-2-하이드록시프로폭시]페닐]-1,1-디에틸우레아 모노하이드로클로라이드, CAS RN 57470-78-7, 참조: 미국 특허 제4,034,009호); 세타몰롤 하이드로클로라이드(아세트아미드, 2-[2-[3-[(1,1-디메틸에틸)아미노]-2-하이드록시프로폭시]-페녹시]-N-메틸-, 모노하이드로클로라이드, CAS RN 77590-95-5, 참조: 미국 특허 제4,059,622호); 라베탈롤 하이드로클로라이드(예: 5-[1-하이드록시-2-[(1-메틸-3-페닐프로필)아미노]에틸]살리실아미드 모노하이드로클로라이드, 예를 들면, Schering로부터 입수 가능한 NORMODYNE[®]

정제); 에스몰롤 하이드로클로라이드((\pm)-메틸 p-[2-하이드록시-3-(이소프로필아미노)프로폭시]하이드로신나메이트 하이드로클로라이드, 예를 들면, Baxter로부터 입수 가능한 BREVIBLOC[®]

주사제); 레보베탉솔롤 하이드로클로라이드(예: (S)-1-[p-[2-(사이클로프로필메톡시)에틸]페녹시]-3-(이소프로필아미노)-2-프로판올 하이드로클로라이드, 예를 들면, Alcon로부터 입수 가능한 BETAXON[™] 안과용 현탁제); 레보부놀롤 하이드로클로라이드(예: (-)-5-[3-(3급-부틸아미노)-2-하이드록시프로폭시]-3,4-디하이드로-1(2H)-나프탈레논 하이드로클로라이드, 예를 들면, Allergan로부터 입수 가능한 C CAP[®]

컴플라이언스 캡을 갖는 BETAGAN[®]

Liquifilm[®]

); 나돌롤(예: 1-(3급-부틸아미노)-3-[(5,6,7,8-테트라하이드로-시스-6,7-디하이드록시-1-나프틸)옥시]-2-프로판올, 예를 들면, Mylan로부터 입수 가능한 나돌롤 정제); 프락톨롤(아세트아미드, N-[4-[2-하이드록시-3-[1-메틸에틸)-아미노]프로폭시]페닐]-, CAS RN 6673-35-4, 참조: 미국 특허 제3,408,387호); 프로프라놀롤 하이드로클로라이드(1-(이소프로필아미노)-3-(1-나프틸옥시)-2-프로판올 하이드로클로라이드, CAS RN 318-98-9); 소탈롤 하이드로클로라이드(예: d,l-N-[4-[1-하이드록시-2-[(1-메틸에틸)아미노]에틸]-페닐]메탄-설푼아미드 모노하이드로클로라이드, 예를 들면, Berlex로부터 입수 가능한 BETAPACE AF[™] 정제); 티몰롤(2-프로판올, 1-[(1,1-디메틸에틸)아미노]-3-[[4-4(4-모르폴리닐)-1,2,5-티아디아졸-3-일]옥시]-, 헤미하이드레이트, (S)-, CAS RN 91524-16-2); 티몰롤 말레이이트((S)-1-[(1,1-디메틸에틸)아미노]-3-[[4-(4-모르폴리닐)-1,2,5-티아디아졸-3-일]옥시]-2-프로판올(Z)-2-부텐디오에이트 (1:1) 염, CAS RN 26921-17-5); 비소프롤롤(2-프로판올, 1-[4-[[2-(1-메틸에톡시)에톡시]-메틸]페녹시]-3-[(1-메틸에틸)아미노]-, (\pm), CAS RN 66722-44-9); 비소프롤롤 푸마레이트(예: (\pm)-1-[4-[[2-(1-메틸에톡시)에톡시]메틸]페녹시]-3-[(1-메틸에틸)아미노]-2-프로판올 (E)-2-부텐디오에이트 (2:1)(염), 예를 들면, Lederle Consumer로부터 입수 가능한 ZEBETA[™] 정제); 네비탈롤(2H-1-벤조피란-2-메탄올, α α '-[이미노비스(메틸렌)]비스[6-플루오로-3,4-디하이드로-, CAS RN 99200-09-6, 참조: 미국 특허 제4,654,362호); 시클로프롤롤 하이드로클로라이드(예: 2-프로판올, 1-[4-[2-(사이클로프로필메톡시)에톡시]페녹시]-3-[1-메틸에틸)아미노]-, 하이드로클로라이드, A.A.S. RN 63686-79-3); 및 텍스프로프라놀롤 하이드로클로라이드(2-프로판올, 1-[1-메틸에틸)-아미노]-3-(1-나프탈레닐옥시)-하이드로클로라이드 (CAS RN 13071-11-9); 디아세톨롤 하이드로클로라이드(아세트아미드, N-[3-아세틸-4-[2-하이드록시-3-[(1-메틸-에틸)아미노]프

로폭시][페닐]-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 69796-04-9); 딜레발롤 하이드로클로라이드(벤즈아미드, 2-하이드록시-5-[1-하이드록시-2-[1-메틸-3-페닐프로필]아미노]에틸]-, 모노하이드로클로라이드, CAS RN 75659-08-4); 엑사프롤롤 하이드로클로라이드(2-프로판올, 1-(2-사이클로헥실페녹시)-3-[(1-메틸에틸)아미노]-, 하이드로클로라이드 CAS RN 59333-90-3); 플레스톨롤 설페이트(벤조산, 2-플루오로-, 3-[[2-[아미노카보닐]아미노]-1-디메틸에틸]아미노]-2-하이드록시프로필 에스테르, (±)-설페이트 (1:1)(염), CAS RN 88844-73-9); 메탈롤 하이드로클로라이드(메탄술폰아미드, N-[4-[1-하이드록시-2-(메틸아미노)프로필]페닐]-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 7701-65-7); 메토프롤롤 2-프로판올, 1-[4-(2-메톡시에틸)페녹시]-3-[1-메틸에틸]아미노]-, CAS RN 37350-58-6); 메토프롤롤 타르트레이트(예: 2-프로판올, 1-[4-(2-메톡시에틸)페녹시]-3-[(1-메틸에틸)아미노]-, 예를 들면, Novartis로부터 입수 가능한 LOPRESSOR®

); 파마톨롤 설페이트(카밤산, [2-[4-[2-하이드록시-3-[(1-메틸에틸)아미노]프로폭시]페닐]-에틸]-, 메틸 에스테르, (±)설페이트(염)(2:1), CAS RN 59954-01-7); 펜부톨롤 설페이트(2-프로판올, 1-(2-사이클로헥실페녹시)-3-[1,1-디메틸에틸]아미노]1,(S)-, 설페이트 (2:1)(염), CAS RN 38363-32-5); 프락톨롤(아세트아미드, N-[4-[2-하이드록시-3-[(1-메틸에틸)아미노]-프로폭시]페닐]-, CAS RN 6673-35-4); 티프레놀롤 하이드로클로라이드(프로판올, 1-[(1-메틸에틸)아미노]-3-[2-(메틸티오)-페녹시]-, 하이드로클로라이드, (±), CAS RN 39832-43-4); 톨라몰롤(벤즈아미드, 4-[2-[[2-하이드록시-3-(2-메틸페녹시)-프로필]아미노]에톡시]-, CAS RN 38103-61-6)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0208] α-수용체 억제제인 아드레날린 수용체는 내인성 카테콜아민에 의해 유도된 혈관수축을 차단시키는 작용을 한다. 이로써 말초 내성이 저하되어 평균 혈압을 강하시켜 준다. 이러한 효과 정도는 해당 길항제가 투여되는 시점에서의 교감신경계 톤(sympathetic tone)의 정도에 좌우된다.

[0209] α-수용체 억제제인 적합한 아드레날린 수용체에는 펜스피리드 하이드로클로라이드(본원에 참조문헌으로써 인용된 미국 특허 제3,399,192호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다); 프로록산(CAS RN 33743-96-3); 알푸조신 하이드로클로라이드(CAS RN 81403-68-1); 및 상기 언급된 바와 같은 라베탈롤 하이드로클로라이드, 또는 이들의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0210] 본 발명에 사용될 수 있는 α 및 β-수용체 억제제 활성을 나타내는 아드레날린 차단제에는 브레틸륨 토실레이트(CAS RN 61-75-6); 디하이드로에르그타민 메실레이트(예: 에르그타민-3',6',18-트리온, 9',-10-디하이드로-12'-하이드록시-2'-메틸-5'-(페닐메틸)-, (5'(알파))-, 모노메탄설포네이트, 예를 들면, Novartis로부터 입수 가능한 DHE 45®

주사제); 카베딜롤(예: (±)-1-(카르바졸-4-일옥시)-3-[[2-(o-메톡시페녹시)에틸]아미노]-2-프로판올, 예를 들면, SmithKline Beecham로부터 입수 가능한 COREG®

정제); 라베탈롤(예: 5-[1-하이드록시-2-[(1-메틸-3-페닐프로필)아미노]에틸]살리실아미드 모노하이드로클로라이드, 예를 들면, Schering으로부터 입수 가능한 NORMODYNE®

정제); 브레틸륨 토실레이트(벤젠메탄아미늄, 2-브로모-N-에틸-N,N-디메틸-, 4-메틸벤젠설폰산과의 염(1:1) CAS RN 61-75-6); 펜톨아민 메실레이트(페놀, 3-[[[(4,5-디하이드로-1H-이미다졸-2-일)메틸](4-메틸페닐)아미노]-, 모노메탄설포네이트(염) CAS RN 65-28-1); 솔리퍼틴 타르트레이트(5H-1,3-디옥솔로[4,5-f]인돌, 7-[2-[4-(2-메톡시페닐)-1-피페라지닐]에틸]-, (2R,3R)-2,3-디하이드록시부탄디오에이트 (1:1) CAS RN 5591-43-5); 졸레르틴 하이드로클로라이드(피페라진, 1-페닐-4-[2-(1H-테트라졸-5-일)에틸]-, 모노하이드로클로라이드 (8C1, 9C1) CAS RN 7241-94-3)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0211] 안지오텐신 시스템 억제제는 안지오텐신 II의 작용, 합성 또는 이화 작용을 방해하는 제제이다. 본 발명에 사용될 수 있는 이들 제제는 안지오텐신-전환 효소(ACE) 억제제, 안지오텐신 II 길항제, 안지오텐신 II 수용체 길항제, 안지오텐신 II의 이화 작용을 활성화시키는 제제, 및 궁극적으로 안지오텐신 II가 유도되는 안지오텐신 I의 합성을 방지시키는 제제가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 레닌-안지오텐신 시스템은 혈액역학, 및 물과 전해질 발란스의 조절에 관여한다. 혈액 용량, 신장 프로퓨전(renal profusion), 또는 혈장 내 Na⁺ 농도를 저하시키는 인자는 상기 시스템을 활성화시키는 경향이 있는 반면, 이들 매개변수를 증가시키는 인자는 이의 기능을 억제시키는 경향이 있다. 안지오텐신 I 및 안지오텐신 II는 효소적 레닌-안지오텐신 경로에 의해 합성된다. 이러한 합성 과정은 상기 효소 레닌이 혈장 중의 슈도글로불린(pseudoglobulin)인 안지오텐시노젠 상에서 작용하는 경우 개시되어 세카펩타이드 안지오텐신 I을 생성한다. 안지오텐신 I은 안지오텐신-전환 효소(ACE)에

의해 안지오텐신 II로 전환된다. 후자는 각종 포유류 중에서 몇 가지 형태의 고혈압의 원인물질로서 암시되고 있는 활성 승압제 물질이다.

[0212]

안지오텐신 II 수용체 길항제는 안지오텐신 II 수용체와 결합하여 이의 활성을 방해함으로써 안지오텐신 II의 활성을 방해하는 화합물이다. 본 발명에 사용될 수 있는 안지오텐신 II 수용체 길항제는 널리 공지되어 있고, 펩타이드 화합물 및 비-펩타이드 화합물이 포함된다. 안지오텐신 II 수용체 길항제의 비-제한적 예에는 다음이 포함된다:

칸데사르탄 실렉세틸(1H-벤즈이미다졸-7-카복실산, 2-에톡시-1-[[2'-(1H-테트라졸-5-일)[1,1'-비페닐]-4-일]메틸-, 1-[[[사이클로헥실옥시]카보닐]옥시]에틸 에스테르) CAS RN 145040-37-5); 텔미사르탄([1,1'-비페닐]-2-카복실산, 4'-[(1,4'-디메틸-2'-프로필[2,6'-비-1H-벤즈이미다졸]-1'-일)메틸]- CAS RN 144701-48-4); 칸데사르탄(1H-벤즈이미다졸-7-카복실산, 2-에톡시-1-[[2'-(1H-테트라졸-5-일)[1,1'-비페닐]-4-일]메틸]- CAS RN 139481-59-7); 로사르탄 칼륨(1H-이미다졸-5-메탄올, 2-부틸-4-클로로-1-[[2'-(1H-테트라졸-5-일)[1,1'-비페닐]-4-일]메틸]-, 모노칼륨 이르베사르탄 1,3-디아자스피로[4.4]논-1-엔-4-온, 2-부틸-3-[[2'-(1H-테트라졸-5-일)[1,1'-비페닐]-4-일]메틸]-CAS RN 138402-11-6).

[0213]

안지오텐신-전환 효소(ACE)는 안지오텐신 I을 안지오텐신 II로 전환시키는 것을 촉매하는 효소이다. 본 발명에 사용될 수 있는 ACE 억제제에는 ACE의 활성을 억제함으로써 승압제 물질 안지오텐신 II의 형성을 감소시키거나 없앴으로써 레닌-안지오텐신 시스템에 개입하는 ACE에 대한 항체, 아미노산 및 이의 유도체, 및 펩타이드(디 및 트리 펩타이드 포함)가 포함된다. ACE 억제제는 고혈압, 울혈성 심부전증, 심근 경색증 및 신장 질병을 치료하기 위해 의학적으로 사용되어 왔다. 적합한 ACE 억제제에는 벤나제프릴 하이드로클로라이드(예: 3-[[1-(에톡시카보닐)-3-페닐-(1S)-프로필]아미노]-2,3,4,5-테트라하이드로-2-옥소-1H-1-(3S)-벤자제핀-1-아세트산 모노하이드로클로라이드, 예를 들면, Novartis로부터 입수 가능한 LOTREL®

캡셀제); 캅토프릴(예: 1-[(2S)-3-머캅토-2-메틸프로피오닐]-L-프롤린, 예를 들면, Mylan로부터 입수 가능한 CAPTOPRIL 정제); 포시노프릴(예: L-프롤린, 4-사이클로헥실-1-[[[2-메틸-1-(1-옥소프로폭시)프로폭시](4-페닐부틸)포스포닐]아세틸]-, 나트륨 염, 트랜스-, 예를 들면, Bristol-Myers Squibb로부터 입수 가능한 MONOPRIL®

정제); 모엑시프릴 하이드로클로라이드(예: [3S-[2(R^{*})(R^{*})],3R^{*}]]-2-[2-[[1-(에톡시카보닐)-3-페닐프로필]아미노]-1-옥소프로필]-1,2,3,4-테트라하이드로-6,7-디메톡시-3-이소퀴놀린카복실산, 모노하이드로클로라이드, 예를 들면, Schwarz로부터 입수 가능한 UNIRETIC®

정제); 페린도프릴 에르부민(예: (2S,3aS,7aS)-1-[(S)-N-[(S)-1-카복시부틸]알라닐]헥사하이드로-2-인돌린카복실산, 1-에틸 에스테르, 3급-부틸아민과의 화합물 (1:1), 예를 들면, Solvay로부터 입수 가능한 ACEON®

정제); 퀴나프릴(예: [3S-[2(R^{*})(R^{*})],3R^{*}]]-2-[2-[[1-(에톡시카보닐)-3-페닐프로필]아미노]-1-옥소프로필]-1,2,3,4-테트라하이드로-3-이소퀴놀린카복실산, 모노하이드로클로라이드, 예를 들면, Parke-Davis로부터 입수 가능한 ACCURETIC®

정제); 라미프릴(예: 2-아자-바이사이클로[3.3.0]-옥탄-3-카복실산 유도체, 예를 들면, Monarch로부터 입수 가능한 ALTACE®

캡셀제); 에날라프릴 말레에이트(예: (S)-1-[N-[1-(에톡시카보닐)-3-페닐프로필]-L-알라닐]-L-프롤린, (Z)-2-부텐디오에이트 염 (1:1), 예를 들면, Merck로부터 입수 가능한 VASOTEC®

정제); 리시노프릴(예: (S)-1-[N-2-(1-카복시-3-페닐프로필)-L-리실]-L-프롤린 디하이드레이트, 예를 들면, Merck로부터 입수 가능한 PRINZIDE®

정제); 텔라프릴(이는 미국 특허 제4,385,051호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 및 스피라프릴(이는 미국 특허 제4,470,972호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 베나제프릴라트(1H-1-벤자제핀-1-아세트산, 3-[[[(1S)-1-카복시-3-페닐프로필]아미노]-2,3,4,5-테트라하이드로-2-옥소-, (3S)- CAS RN 86541-78-8); 텔라프릴 하이드로클로라이드(글리신, N-[(1S)-1-(에톡시카보닐)-3-페닐프로필]-L-알라닐-N-(2,3-디하이드로-1H-인덴-2-일)-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 83435-67-0); 포시노프릴 나트륨(L-프롤린, 4-사이클로헥실-1-[[[R)-[(1S)-2-메틸-1-(1-옥소프로폭시)프로폭시](4-페닐부틸)포스포닐]아세틸]-, 나트륨 염, (4S)- CAS RN88889-14-9); 리벤자프릴(1H-1-벤자제핀-1-아세트산, 3-[[[(1S)-5-아미노-1-카복시펜틸]아미노]-2,3,4,5-테트라하이드로-

2-옥소-, (3S)- CAS RN 109214-55-3); 펜토프릴(1H-인돌-1-펜타노산, 2-카복시-2,3-디하이드로-알파, 감마-디메틸-델타-옥소-, 알파-에틸 에스테르, (알파 R, 감마 R, 2S)- CAS RN 82924-03-6); 페린도프릴(1H-인돌-2-카복실산, 1-[(2S)-2-[(1S)-1-(에톡시카보닐)부틸]아미노]-1-옥소프로필]옥타하이드로-, (2S,3aS,7aS)- CAS RN 82834-16-0); 퀴나프릴 하이드로클로라이드(3-이소퀴놀린카복실산, 2-[(2S)-2-[(1S)-1-(에톡시카보닐)-3-페닐프로필]아미노]-1-옥소프로필]-1,2,3,4-테트라하이드로-, 모노하이드로클로라이드, (3S)- CAS RN 82586-55-8); 퀴나프릴라트(3-이소퀴놀린카복실산, 2-[(2S)-2-[(1S)-1-카복시-3-페닐프로필]아미노]-1-옥소프로필]-1,2,3,4-테트라하이드로-, (3S)- CAS RN 82768-85-2); 스피라프릴 하이드로클로라이드(1,4-디티아-7-아자스피로[4.4]노난-8-카복실산, 7-[(2S)-2-[(1S)-1-(에톡시카보닐)-3-페닐프로필]아미노]-1-옥소프로필]-, 모노하이드로클로라이드, (8S)- CAS RN 94841-17-5); 스피라프릴라트(1,4-디티아-7-아자스피로[4.4]노난-8-카복실산, 7-[(2S)-2-[(1S)-1-카복시-3-페닐프로필]아미노]-1-옥소프로필]-, (8S)- CAS RN 83602-05-5); 테프로티드(브라디키닌 효능화제 BPP9a CAS RN 35115-60-7); 리시노프릴(L-프롤린, N2-[(1S)-1-카복시-3-페닐프로필]-L-리실- CAS RN 76547-98-3); 조페노프릴(L-프롤린, 1-[(2S)-3-벤조일티오]-2-메틸-1-옥소프로필]-4-(페닐티오)-, 칼슘 염 (2:1), (4S)- CAS RN 81938-43-4)이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0214]

"칼슘 채널 차단제"는 고혈압, 협심증, 및 심부전증과 같은 몇몇 심혈관 장애를 포함한 각종 질병을 제어하는데 있어서 중요한 치료학적 가치를 지닌 화학적으로 다양한 부류의 화합물이다[참조: Fleckenstein, *Cir. Res.* V. 52 (suppl.1), p.13-16 (1983); Fleckenstein, *Experimental Facts and Therapeutic Prospects*, John Wiley, New York (1983); McCall, D., *Curr. Pract Cardiol.*, v. 10, p.1-11 (1985)]. 칼슘 채널 차단제는 세포성 칼슘 채널을 조절함으로써 칼슘이 세포 내로 유입되는 것을 방지하거나 이를 느리게 하는 이종(heterogeneous) 그룹의 약물이다[참조: Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company, Eaton, PA, p.963 (1995)]. 본 발명에 유용한 칼슘 채널 차단제에는 암로디핀의 베실레이트 염(예: 3-에틸-5-메틸-2-(2-아미노에톡시메틸)-4-(2-클로로페닐)-1,4-디하이드로-6-메틸-3,5-피리딘디카복실레이트 벤젠설포네이트, 예를 들면, Pfizer로부터 입수 가능한 NORVASC®

); 클렌티아젠 말레에이트(1,5-벤조티아제핀-4(5H)-온, 3-(아세틸옥시)-8-클로로-5-[2-(디메틸아미노)에틸]-2,3-디하이드로-2-(4-메톡시페닐)-(2S-시스)-, (Z)-2-부텐디옥사이드 (1:1), 미국 특허 제4,567,195호 참조); 이스라디핀(3,5-피리딘디카복실산, 4-(4-벤조푸라자일)-1,4-디하이드로-2,6-디메틸-, 메틸 1-메틸에틸 에스테르, (±)-4-(4-벤조푸라자일)-1,4-디하이드로-2,6-디메틸-3,5-피리딘디카복실레이트, 참조: 미국 특허 제 4,466,972호); 니모디핀(예: 이소프로필 (2-메톡시에틸)-1,4-디하이드로-2,6-디메틸-4-(3-니트로페닐)-3,5-피리딘-디카복실레이트, 예를 들면, Bayer로부터 입수 가능한 NIMOTOP®

); 펠로디핀(예: 에틸 메틸 4-(2,3-디클로로페닐)-1,4-디하이드로-2,6-디메틸-3,5-피리딘디카복실레이트, 예를 들면, AstraZeneca LP로부터 입수 가능한 PLENDIL®

연장-방출형 정제); 닐바디핀(3,5-피리딘디카복실산, 2-시아노-1,4-디하이드로-6-메틸-4-(3-니트로페닐)-, 3-메틸 5-(1-메틸에틸)에스테르, 참조: 미국 특허 제3,799,934호); 니페디핀(예: 3,5-피리딘디카복실산, 1,4-디하이드로-2,6-디메틸-4-(2-니트로페닐)-, 디메틸 에스테르, 예를 들면, Pfizer로부터 입수 가능한 PROCARDIA XL®

연장-방출형 정제); 딜티아젠 하이드로클로라이드(예: 1,5-벤조티아제핀-4(5H)-온, 3-(아세틸옥시)-5[2-(디메틸아미노)에틸]-2,3-디하이드로-2(4-메톡시페닐)-, 모노하이드로클로라이드, (+)-시스, 예를 들면, Forest로부터 입수 가능한 TIZAC®

캡셀제); 베라파밀 하이드로클로라이드(예: 벤젠아세트로니트릴, (알파)-[[3-[[2-(3,4-디메톡시페닐)에틸]메틸아미노]프로필]-3,4-디메톡시-(알파)-(1-메틸에틸) 하이드로클로라이드, 예를 들면, Knoll Labs로부터 입수 가능한 ISOPTIN®

SR 정제); 텔루디핀 하이드로클로라이드(3,5-피리딘디카복실산, 2-[(디메틸아미노)메틸]-4-[2-[(1E)-3-(1,1-디메틸에톡시)-3-옥소-1-프로페닐]페닐]-1,4-디하이드로-6-메틸-, 디에틸 에스테르, 모노 하이드로클로라이드, CAS RN 108700-03-4); 벨포스틸(포스폰산, [2-(2-페녹시에틸)-1,3-프로판디일]비스-, 테트라부틸 에스테르 CAS RN 103486-79-9); 포스테딜(포스폰산, [[4-(2-벤조티아졸릴)페닐]메틸-, 디에틸 에스테르 CAS RN 75889-62-2)이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0215]

"항협심증제"로서 작용하기도 하는 본 발명의 심혈관 제제가 본 발명에 유용하다. 협심증에는 심근 산소 이용

가능한 양이 심근 산소 요구량을 충족시키기에 불충분한 경우에 발생하는 증상이 포함된다. 이들 제제의 비-제한적 예에는 다음이 포함된다: 라놀라진 (하이드로클로라이드(1-피페라진아세트아미드, N-(2,6-디메틸페닐)-4-[2-하이드록시-3-(2-메톡시페녹시)프로필]-, 디하이드로클로라이드 CAS RN 95635-56-6); 베타솔롤 하이드로클로라이드(2-프로판올, 1-[4-[2-(사이클로프로필메톡시)에틸]페녹시]-3-[(1-메틸에틸)아미노]-, 하이드로클로라이드 CAS RN 63659-19-8); 부토프로진 하이드로클로라이드(메탄올, [4-[3(디부틸아미노)프로폭시]페닐](2-에틸-3-인돌리진)-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 62134-34-3); 시네파제트 말레에이트(1-피페라진아세트산, 4-[1-옥소-3-(3,4,5-트리메톡시페닐)-2-프로페닐]-, 에틸 에스테르, (2Z)-2-부텐디오에이트 (1:1) CAS RN 50679-07-7); 토시펜(벤젠설포아미드, 4-메틸-N-[[[(1S)-1-메틸-2-페닐에틸]아미노]카보닐]- CAS RN 32295-18-4); 베라파밀 하이드로클로라이드(벤젠아세토니트릴, 알파-[3-[[2-(3,4-디메톡시페닐)에틸]메틸아미노]프로필]-3,4-디메톡시-알파-(1-메틸에틸)-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 152-11-4); 몰시도민(1,2,3-옥사디아졸륨, 5-[(에톡시카보닐)아미노]-3-(4-모르폴리닐)-, 내부 염 CAS RN 25717-80-0); 라놀라진 하이드로클로라이드(1-피페라진아세트아미드, N-(2,6-디메틸페닐)-4-[2-하이드록시-3-(2-메톡시페녹시)프로필]-, 디하이드로클로라이드 CAS RN 95635-56-6); 토시펜(벤젠설포아미드, 4-메틸-N-[[[(1S)-1-메틸-2-페닐에틸]아미노]카보닐]- CAS RN 32295-18-4).

[0216]

"관상 혈관확장제"는 심장에 대한 산소 공급을 증가시킴으로써 앙기나 시스템(angina system)을 저하시키는 작용을 할 수 있다. 본 발명에 유용한 관상 혈관확장제에는 딜티아젠펙 하이드로클로라이드(예: 1,5-벤조티아제핀-4(5H)-온, 3-(아세틸옥시)-5[2-(디메틸아미노)에틸]-2,3-디하이드로-2(4-메톡시페닐)-, 모노하이드로클로라이드, (+)-시스, 예를 들면, Forest로부터 입수 가능한 TIZAC[®]

캡셀제); 이소소르비드 디니트레이트(예: 1,4:3,6-디안하이드로-D-글루시톨 2,5-디니트레이트, 예를 들면, Wyeth-Ayerst로부터 입수 가능한 ISORDIL[®]

TITRADOSE[®]

정제); 소소르비드 모노니트레이트(예: 1,4:3,6-디안하이드로-D-글루시톨, 5-니트레이트, 유기 니트레이트, 예를 들면, Wyeth-Ayerst로부터 입수 가능한 Isomo[®]

정제); 니트로글리세린(예: 2,3-프로판트리올 트리니트레이트, 예를 들면, Parke-Davis로부터 입수 가능한 NITROSTAT[®]

정제); 베라파밀 하이드로클로라이드(벤젠아세토니트릴, (±)-(알파)-[3-[[2-(3,4-디메톡시페닐)에틸]메틸아미노]프로필]-3,4-디메톡시-(알파)-(1-메틸에틸) 하이드로클로라이드, 예를 들면, Searle로부터 입수 가능한 COVERA HS[®]

연장-방출형 정제); 크로모나르(이는 미국 특허 제3,282,938호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 클로니테이트(Annalen 1870 155); 드로프레닐아민(이는 독일 특허 제2,521,113호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 리도플라진(이는 미국 특허 제3,267,104호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 프레닐아민(이는 미국 특허 제3,152,173호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 프로파틸 니트레이트(이는 프랑스 특허 제1,103,113호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 미오플라진 하이드로클로라이드(1-피페라진아세트아미드, 3-(아미노카보닐)-4-[4,4-비스(4-플루오로페닐)부틸]-N-(2,6-디클로로페닐)-, 디하이드로클로라이드 CAS RN 83898-67-3); 믹시딘(벤젠에탄아민, 3,4-디하이드록시-N-(1-메틸-2-피롤리딘리덴)-피롤리딘, 2-[(3,4-디메톡시페닐)이미노]-1-메틸-1-메틸-2-[(3,4-디메톡시페닐)이미노]피롤리딘 CAS RN 27737-38-8); 몰시도민(1,2,3-옥사디아졸륨, 5-[(에톡시카보닐)아미노]-3-(4-모르폴리닐)-, 내부 염 CAS RN 25717-80-0); 이소소르비드 모노니트레이트(D-글루시톨, 1,4:3,6-디안하이드로-, 5-니트레이트 CAS RN 16051-77-7); 에리트리톨 테트라니트레이트(1,2,3,4-부탄테트룰, 테트라니트레이트, (2R,3S)-rel-CAS RN 7297-25-8); 클로니테이트(1,2-프로판다이올, 3-클로로-, 디니트레이트(7C1, 8C1, 9C1) CAS RN 2612-33-1); 디피리다몰 에탄올(2,2',2'',2'''-[(4,8-디-1-피페리딘리덴)피리미도[5,4-d]피리미딘-2,6-디일)디니트릴로]테트라키스- CAS RN 58-32-2); 니코란딜(CAS RN 65141-46-03-); 피리딘 카복사미드(N-[2-(니트로옥시)에틸]-; 니솔디핀(3,5-피리딘디카복실산, 1,4-디하이드로-2,6-디메틸-4-(2-니트로페닐)-, 메틸 2-메틸프로필 에스테르 CAS RN 63675-72-9); 니페디핀(3,5-피리딘디카복실산, 1,4-디하이드로-2,6-디메틸-4-(2-니트로페닐)-, 디메틸 에스테르 CAS RN 21829-25-4); 퍼헭실린 말레에이트(피페리딘, 2-(2,2-디사이클로헥실에틸)-, (2Z)-2-부텐디오에이트 (1:1) CAS RN 6724-53-4); 옥스프레놀롤 하이드로클로라이드(2-프로판올, 1-[(1-메틸에틸)아미노]-3-[2-(2-프로페닐옥시)페녹시]-, 하이드로클로라이드 CAS RN 6452-73-9); 펜

트리니트톨(1,3-프로판디올, 2,2-비스[(니트로옥시)메틸]-, 모노니트레이트(에스테르) CAS RN 1607-17-6); 베라파밀(벤젠아세토니트릴, 알파-[3-[[2-(3,4-디메톡시페닐)에틸]메틸아미노]프로필]-3,4-디메톡시-알파-(1-메틸에틸)- CAS RN 52-53-9)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0217] "이뇨제"란 용어에는 용질(주로 NaCl)과 물의 배출을 증가시키는 화합물이 포함된다. 일반적으로, 이뇨제 치료요법의 주요 목적은 혈압을 강하시키거나 또는 과량의 간질성 유체(부종)를 체 내로부터 제거하기 위해 세포의 유체 용량을 감소시키는 것이다. 본 발명의 범위 내에서 사용될 수 있는 이뇨제의 비-제한적 예에는 알티아지드(이는 영국 특허 제902,658호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 벤즈티아지드(이는 미국 특허 제3,108,097호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 부티아지드(이는 영국 특허 제861,367호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 클로로티아지드(이는 미국 특허 제2,809,194호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다); 스피로놀락톤(CAS 번호 52-01-7); 및 트리암테렌(CAS 번호 396-01-0)이 포함된다.

[0218] 본 발명에서 심혈관 제제로서 유용한 "아드레날린 자극제"에는 구안과신 하이드로클로라이드(예: N-아미디노-2-(2,6-디클로로페닐)아세트아미드 하이드로클로라이드, 예를 들면, Robins로부터 입수 가능한 TENEX®

정제); 하이드로클로로티아지드(예: 6-클로로-3,4-디하이드로-2H-1,2,4-벤조티아디아진-7-설폰아미드 1,1-디옥사이드)와 조합된 메틸도파-하이드로클로로티아지드(예: 레보-3-(3,4-디하이드록시페닐)-2-메틸알라닌)(예를 들어, Merck로부터 입수 가능한 ALDORIL®

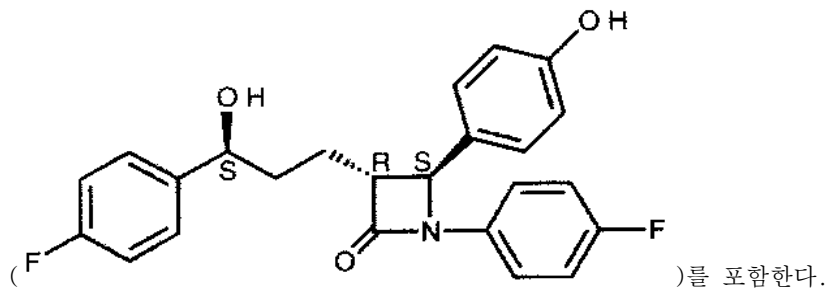
정제로서의 조합물); 메틸도파-클로로티아지드(예: 6-클로로-2H-1,2,4-벤조티아디아진-7-설폰아미드 1,1-디옥사이드 및 상기 언급된 바와 같은 메틸도파, 예를 들면, Merck로부터 입수 가능한 ALDOCLOR®

정제); 클로니딘 하이드로클로라이드(예: 2-(2,6-디클로로페닐아미노)-2-이미다졸린 하이드로클로라이드 및 클로르탈리돈(예: 2-클로로-5-(1-하이드록시-3-옥소-1-이소인돌리닐)벤젠설폰아미드), 예를 들면, Boehringer Ingelheim로부터 입수 가능한 COMBIPRES®

정제); 클로니딘 하이드로클로라이드(예: 2-(2,6-디클로로페닐아미노)-2-이미다졸린 하이드로클로라이드, 예를 들면, Boehringer Ingelheim으로부터 입수 가능한 CATAPRES®

정제); 클로니딘(1H-이미다졸-2-아민, N-(2,6-디클로로페닐)-4,5-디하이드로-CAS RN 4205-90-7)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0219] 항-PCSK9 항체 및 이의 항원-결합 단편 및 EGF-A 폴리펩타이드는 또한, 내장 콜레스테롤 흡수를 억제하는 어떠한 아제티딘노과도 함께 투여될 수 있다. 이러한 아제티딘노는 에제티미베



[0220] 항-PCSK9 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 EGF-A 폴리펩타이드와 함께 투여될 수 있는 추가의 화학치료제는 어유, 에이코사예페나노산, 도코사헥사노산, 리놀레산, 니아신, 피브레이트, 예를 들면, 페노피브레이트, 갬피브로질 및 담즙산 격리제(sequestrant), 예를 들면, 콜레스티라민, 콜레스티폴 및 콜레세벨람을 포함한다.

[0221] 기타 화학치료제는 알티아지드(2H-1,2,4-벤조티아디아진-7-설폰아미드, 6-클로로-3,4-디하이드로-3-[(2-프로페닐티오)메틸]-1,1-디옥사이드 CAS RN 5588-16-9); 벤즈티아지드(2H-1,2,4-벤조티아디아진-7-설폰아미드, 6-클로로-3-[[2-(페닐메틸)티오]메틸]-1,1-디옥사이드 CAS RN 91-33-8); 캠프토프릴(L-프롤린, 1-[(2S)-3-머캅토-2-메틸-1-옥소프로필]- CAS RN 62571-86-2); 카베딜롤(2-프로판올, 1-(9H-카바졸-4-일옥시)-3-[[2-(2-메톡시페녹시)에틸]아미노]- CAS RN 72956-09-3); 클로로티아지드(나트륨 2-프로판올, 1-(9H-카바졸-4-일옥시)-3-[[2-(2-메톡시페녹시)에틸]아미노]- CAS RN 72956-09-3); 클로니딘 하이드로클로라이드(1H-이미다졸-2-아민, N-(2,6-디클로로페닐)-4,5-디하이드로-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 4205-91-8); 사이클로티아지드(2H-1,2,4-벤조티아디아진-7-설폰아미드, 3-비사이클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-일-6-클로로-3,4-디하이드로-1,1-디옥사이드 CAS RN

2259-96-3); 텔라프틸 하이드로클로라이드(2H-1,2,4-벤조티아디아진-7-설폰아미드, 3-비사이클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-일-6-클로로-3,4-디하이드로-1,1-디옥사이드 CAS RN 2259-96-3); 딜레발롤 하이드로클로라이드(2H-1,2,4-벤조티아디아진-7-설폰아미드, 3-비사이클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-일-6-클로로-3,4-디하이드로-1,1-디옥사이드 CAS RN 2259-96-3); 텔라프틸 하이드로클로라이드(글리신, N-[(1S)-1-(에톡시카보닐)-3-페닐프로필]-L-알라닌-N-(2,3-디하이드로-1H-인텐-2-일)-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 83435-67-0); 독사조신 메실레이트(피페라진, 1-(4-아미노-6,7-디메톡시-2-퀴나졸리닐)-4-[(2,3-디하이드로-1,4-벤조디옥신-2-일)카보닐]-, 모노메탄설포네이트 CAS RN 77883-43-3); 포시노프릴 나트륨(L-프롤린, 4-사이클로헥실-1-[(R)-[(1S)-2-메틸-1-(1-옥소프로폭시)프로폭시]-2-[(2S)-2-[(1S)-1-(에톡시카보닐)-3-페닐프로필]아미노]-1-옥소프로필]-1,2,3,4-테트라하이드로-6,7-디메톡시-, 모노하이드로클로라이드, (3S)-CAS RN 82586-52-5); 모나테필 말레에이트(1-피페라진부탄아미드, N-(6,11-디하이드로디벤조(b,e)티에핀-11-일)-4-(4-플루오로페닐)-, (±)-, (Z)-2-부텐디오에이트(1:1) (±)-N-(6,11-디하이드로디벤조(b,e)티에핀-11-일)-4-(p-플루오로페닐)-1-피페라진부타미드 말레에이트(1:1) CAS RN 132046-06-1), 메토프롤롤 석시네이트(부탄디온산, 1-[4-(2-메톡시에틸)페녹시]-3-[(1-메틸에틸)아미노]-2-프로판올(1:2) CAS RN 98418-47-4와의 화합물); 구안과신 하이드로클로라이드(벤젠아세트아미드, N-(아미노이미노메틸)-2,6-디클로로-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 29110-48-3; 메틸도파(L-티로신, 3-하이드록시-.알파.-메틸- CAS RN 555-30-6); 퀴나프릴라트(3-이소퀴놀린카복실산, 2-[(2S)-2-[(1S)-1-카복시-3-페닐프로필]아미노]-1-옥소프로필]-1,2,3,4-테트라하이드로-, (3S)- CAS RN 82768-85-2); 퀴나프릴 하이드로클로라이드(3-이소퀴놀린카복실산, 2-[(2S)-2-[(1S)-1-(에톡시카보닐)-3-페닐프로필]아미노]-1-옥소프로필]-1,2,3,4-테트라하이드로-, 모노하이드로클로라이드, (3S)- CAS RN 82586-55-8); 프리미돌롤(2,4(1H,3H)-피리미딘디온, 1-[2-[[2-하이드록시-3-(2-메틸페녹시)프로필]아미노]에틸]-5-메틸- CAS RN 67227-55-8); 피라조신 하이드로클로라이드(피페라진, 1-(4-아미노-6,7-디메톡시-2-퀴나졸리닐)-4-(2-푸라닐카보닐)-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 19237-84-4); 펠란세린 하이드로클로라이드 2,4(1H,3H)-퀴나졸리딘온, 3-[3-(4-페닐-1-피페라지닐)프로필]-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 42877-18-9); 페녹시벤즈아민 하이드로클로라이드(벤젠메탄아민, N-(2-클로로에틸)-N-(1-메틸-2-페녹시에틸)-, 하이드로클로라이드 CAS RN 63-92-3); 칸데사르탄 실렉세틸(1H-벤즈이미다졸-7-카복실산, 2-에톡시-1-[[2'-(1H-테트라졸-5-일)[1,1'-비페닐]-4-일]메틸]-, 1-[[[사이클로헥실옥시]카보닐]옥시]에틸 에스테르 CAS RN 145040-37-5); 텔미사르탄(1,1'-비페닐)-2-카복실산, 4'-[(1,4'-디메틸-2'-프로필[2,6'-비-1H-벤즈이미다졸]-1'-일)메틸]-CAS RN 144701-48-4); 칸데사르탄 1H-벤즈이미다졸-7-카복실산, 2-에톡시-1-[[2'-(1H-테트라졸-5-일)[1,1'-비페닐]-4-일]메틸]- CAS RN 139481-59-7); 암로디핀 베실레이트3,5-피리딘디카복실산, 2-[(2-아미노에톡시)메틸]-4-(2-클로로페닐)-1,4-디하이드로-6-메틸-, 3-에틸 5-메틸 에스테르, 모노벤젠설포네이트 CAS RN 111470-99-6 암로디핀 말레에이트 3,5-피리딘디카복실산, 2-[(2-아미노에톡시)메틸]-4-(2-클로로페닐)-1,4-디하이드로-6-메틸-, 3-에틸 5-메틸 에스테르, (2Z)-2-부텐디오에이트(1:1) CAS RN 88150-47-4); 테라조신 하이드로클로라이드(피페라진, 1-(4-아미노-6,7-디메톡시-2-퀴나졸리닐)-4-[(테트라하이드로-2-푸라닐)카보닐]-, 모노하이드로클로라이드 CAS RN 63074-08-8); 베반톨롤 하이드로클로라이드(2-프로판올, 1-[[2-(3,4-디메톡시페닐)에틸]아미노]-1-3-(3-메틸페녹시)-, 하이드로클로라이드 CAS RN 42864-78-8); 라미프릴(사이클로헥타[b]피롤-2-카복실산, 1-[(2S)-2-[(1S)-1-(에톡시카보닐)-3-페닐프로필]아미노]-1-옥소프로필]옥타하이드로, (2S,3aS,6aS)- CAS RN 87333-19-5)를 포함한다.

[0222] 스크리닝 검정

[0223] 본 발명은 대상체에서 PCSK9 억제제 또는 PCSK9/LDL 수용체 결합의 억제제 또는 PCSK9/EGF-A 도메인 결합의 억제제인 물질; 총 콜레스테롤 수준, 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수준, 아포지단백질 B 수준, 총 콜레스테롤/고밀도 지단백질 비율 또는 저밀도 지단백질/고밀도 지단백질 비율을 감소시키는 물질; 또는 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 고중성지방혈증, 시토스테롤혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상심질환, 혈관 염증 또는 황색종을 치료 또는 예방하는 물질을 식별하는 방법을 추가로 제공하고, 당해 방법은 PCSK9 폴리펩타이드 또는 이의 작용성 단편 및 LDL 수용체 EGF-A 도메인(예를 들면, 서열 3)을 포함하는 폴리펩타이드와, 상기 물질의 존재를 위해 시험할 샘플을 접촉시킴을 포함하고; 여기서, 상기 물질은, PCSK9 및 LDL 수용체 EGF-A 도메인을 포함하는 당해 폴리펩타이드의 결합이 샘플의 부재하에서보다 샘플의 존재하에서 더 적게 관찰되는 경우 식별된다. 또한, 이러한 검정에서 식별된 어떠한 물질도 본 발명의 일부를 형성한다.

[0224] 본 발명의 양태는, 당해 PCSK9 및 EGF-A 폴리펩타이드가 PCSK9 및 LDL 수용체 또는 이의 EGF-A 도메인의 결합을 억제하지 않는 것으로 공지된 물질과 접촉하는 음성-대조군 검정을 추가로 포함하고, 여기서, 당해 검정은,

PCSK9 및 LDL 수용체 또는 이의 EGF-A 도메인의 결합이 상기 결합 억제제의 존재하에서보다 더 많이 관찰되는 경우 적절하게 작동되는 것으로 결정된다.

[0225] 본 발명의 하나의 양태는, 당해 PCSK9 및 EGF-A 폴리펩타이드를 PCSK9 및 LDL 수용체 또는 이의 EGF-A 도메인의 결합을 억제하는 것으로 공지된 물질과 접촉시키는 양성-대조군 검정을 추가로 포함하고, 여기서, 당해 검정은, PCSK9 및 LDL 수용체 또는 이의 EGF-A 도메인의 결합이 상기 결합의 억제제의 존재하에서보다 더 적게 관찰되는 경우 적절하게 작동되는 것으로 결정된다.

[0226] 물질의 결합은 당해 분야에 공지된 임의의 몇가지 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0227] 실시예

[0228] 다음의 정보는 본 발명을 보다 명확하게 기재하기 위해 제공되고, 본 발명을 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 아래 기재된 임의의 모든 조성물 및 방법은 본 발명의 범위 내에 속한다.

[0229] 실시예 1: LDLR-PCSK9 상호작용을 차단하는 LDL 수용체 또는 항-PCSK9 항체의 가용성 EGF-A 도메인

[0230] 당해 실시예에서, 사람 LDL 수용체 및 각종 항-PCSK9 항체의 EGF-A 도메인을 암호화하는 가용성 펩타이드는 PCSK9 및 당해 수용체 사이의 상호작용을 차단하는 것으로 밝혀졌다.

[0231] 다음은 PCSK9-LDLR 상호작용 실험의 항체 및 EGF-A 억제를 위한 알파스크린(AlphaScreen) 방법 및 물질이다.

[0232] C-말단 FLAG 태그를 수반하는 정제된 PCSK9는 PCSK9를 안정하게 발현하는 HEK293 세포로부터 정제된다. 순도는 은염색에 의해 >90% 초과로 평가하였다. 항-PCSK9-촉매적 도메인 항체는 Cayman Chemical(토끼 항-쥐-PCSK9 폴리클로날 항체, 제조원: 미국 미시간주 Ann Arbor 소재의 Cayman Chemical; 제품번호 10008811)로부터 구입하였다. 당해 토끼 항-마우스/사람 PCSK9-촉매적 도메인 항체는 다음의 아미노산 서열: **VFAQSIPWNLER** (서열 8)을 갖는 에피토프를 인지한다. 토끼 항-사람 PCSK9 C-말단 도메인 항체[**SRSQKRRGERMEA** (서열 4의 아미노산 490번 내지 502번)에 특이적으로 결합함] 및 토끼 항-사람 PCSK9 총 단백질 항체가 또한 사용되었다.

[0233] 가용성 EGF-A 도메인 펩타이드는 표준 방법을 사용하여 합성적으로 생성시켰다. 완충액(25 mM HEPES, 0.1 M NaCl, 0.1% BSA, pH 7.5) 2.5 마이크로리터 중의 정제된, C-말단 FLAG 태그된 PCSK9 2.5 ng(ProxiPlate-384 Plus[제조원: 미국 매사추세츠 왈탐(Waltham) 소재의 Perkin-Elmer]의 2.5 ng/2.5 μ l/웰)을 실온에서 30분 동안 지정된 농도에서 2.5 마이크로리터의 항-PCSK9 항체 또는 EGF-A 도메인 펩타이드 중의 하나와 예비-항온처리 하였다. 이후에, 정제된 HIS-태그된 가용성 LDLR(제조원: 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재의 알앤디 시스템즈(R&D Systems); 제품번호 2148-LD/CF; 서열 2) 2.5 ng 및 바이오티닐화된 항-FLAG 항체(BioM2 모노클로날 항체, 제조원: 미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마(Sigma); 제품번호 F 9291) 5 ng를 함유하는 5 μ l 완충액 및 상기 혼합물을 실온에서 추가 30분 동안 항온처리하였다. 최종적으로, 낮은 광 조건하에, 공여자/수용체 비드 혼합물(알파스크린 히스티딘 검출 키트, 제조원: 미국 매사추세츠주 왈탐 소재의 Perkin-Elmer; 제품번호 #6760619C) 5 μ l를 가한 다음, 2103 EnVision Multilabel Plate Reader(제조원: 미국 매사추세츠주 왈탐 소재의 Perkin-Elmer)를 사용하여 알파스크린 시그널을 검출하였다. 공여자/수용체 비드 혼합물을, 니켈-수용체 비드 10 μ l 및 SA-공여자 비드 10 μ l를 하나의 384-웰 플레이트에 대해 2.2 ml 완충액에 가함으로써 암실 조건에서 제조한 다음, 실온에서 암실에서 2시간 이상 동안 항온처리하였다.

[0234] 이들 실험에서 생성된 데이터는 아래 표 1 내지 표 3에 나타낸다.

표 1

가해진 칼슘*의 존재 또는 부재하에 가용성 **LDLR-EGF-A** 도메인에 의한 **PCSK9-LDLR** 상호작용의 억제. 값은 3회 반복실험의 평균값이다.

log[EGF-A] μ M	칼슘 미첨유 (평균수)	2mM 칼슘 (평균수)
2.30103	8476	4098.333
1.823909	25291	6320.667
1.346787	74404.33	27519
0.869666	132192.7	80542.67
0.392545	182225.3	143204.7
-0.08458	205094.7	202404.3
-0.5617	214258	234140.3
-1.03882	219281	246093.7
-1.51594	221429	240820.7
-1.99306	220878	257794
-2.47018	206909.3	254980.3

* 더 낮은 수는 PCSK9/LDL 수용체 결합이 더 적게 관찰되었음을 나타낸다.

[0235]

[0236]

이들 데이터는, PCSK9-LDLR 상호작용이 칼슘의 존재 또는 부재하에 가용성 EGF-A 도메인에 의해 억제됨을 나타낸다. 약간 더 많은 수준의 억제는 칼슘의 부재하보다 칼슘의 존재하에서 관찰되었다. 칼슘의 존재하에 IC50은 약 3 마이크로몰이었고, 칼슘의 부재하에 IC50은 약 12 마이크로몰이었다.

표 2

항-**PCSK9** 항체(촉매적 도메인(**Cat**) 및 **C**-말단 도메인(**CT**))에 의한 **PCSK9-LDLR** 상호작용의 억제

log[항체] μ g/ml	대조군 IgG	항-PCSK9 (Cat)	항-PCSK9 (CT)
1.826075	113607.7	6840	37878
1.348954	135127.7	25815	87575.33
0.871832	139744.7	55616	108605.7
0.394711	135829.3	93545.67	119019.3
-0.08241	140328.3	94768	127197
-0.55953	139224.7	128021.3	127770.3
-1.03665	127405.7	124136.7	129751.7
-1.51377	133565.3	126417.7	131044.3
-1.9909	135194.7	129937.3	131160.7
-2.46802	140051.7	131985.3	128822.3

[0237]

[0238]

이들 데이터는, 항-PCSK9 촉매적 도메인 항체 및 항-PCSK9 C-말단 도메인 항체가 PCSK9 및 LDL 수용체 사이의 상호작용을 억제함을 입증한다. C-말단 도메인에 대해 야기된 항-PCSK9는 상호작용을 억제하는데 덜 효과적이었다. 비-특이적 IgG 대조군은 상호작용을 억제하는데 비효과적이고, 비교를 위해 나타내었다. 이들 표의 값은 3회 반복실험의 평균값이다.

표 3

항-PCSK9 항체(촉매적 도메인(Cat) 및 총 단백질(총))에 의한 PCSK9-LDLR 상호작용의 억제

log[항체] $\mu\text{g/ml}$	대조군 IgG	항-PCSK9 (Cat)	항-PCSK9 (총)
1.826075	61920.67	2101.33	1005.33
1.348954	74394.33	12259.00	1435.00
0.871832	79625.67	33347.33	14236.67
0.394711	79552.00	60074.00	52994.00
-0.08241	82751.00	70040.00	75020.33
-0.55953	88110.00	77438.00	85241.00
-1.03665	84421.00	79789.00	82679.00
-1.51377	83144.67	85603.67	87349.33
-1.9909	80747.33	81462.67	80731.67
-2.46802	78151.33	80556.33	83171.00
-2.94514	82101.00	85405.33	80429.00

[0239]

[0240]

이들 데이터는, PCSK9-LDLR 상호작용이 PCSK9 촉매적 도메인 펩타이드를 결합하는 항체 및 총 PCSK9 단백질에 대해 야기된 항체에 의해 억제됨을 입증한다. 비-특이적 IgG 대조군은 상호작용을 억제하는데 비효과적이고, 비교를 위해 나타내었다. 이들 값은 3회 반복실험의 평균값이다.

[0241]

실시예 2: 증강된 LDL 흡수를 유도하는 세포의 항-PCSK9 항체 처리

[0242]

가용성 PCSK9와 세포의 항온처리는 배지로부터 저밀도 지단백질(LDL)을 흡수하고 청소하는 세포 능력에서의 감소를 유도한다. 당해 실시예는, 항-PCSK9 항체를 사용한 PCSK9의 억제가 PCSK9의 당해 효과를 길항시키고, LDL 흡수 및 청소를 증강된 수준으로 유도함을 입증한다.

[0243]

흡수 검정을 다음과 같이 수행하였다: 384 콜라겐 I 피복된 플레이트에 10,000 세포/웰로 HepG2 세포를 시딩(seeding)하였고, 밤새 성장시켰다. 다음날, MEM-1% BSA 중의 bacu-PCSK9-WT의 일련의 희석물을 제조하고, 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도에서 고정된 농도의 항-마우스-고양이 도메인 PCSK9 폴리클로날 항체(제조원: 미국 미시간주 Ann Arbor 소재의 Cayman Chemical; 제품번호 10008811; 마우스 PCSK9 항원 **VFAQSIPWNLER** (서열 8)에 대해 생성되며, 사람 PCSK9와 교차반응함) 또는 항-사람 PCSK9 폴리클로날 항체(제조원: 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재의 알앤디 시스템즈(R&D Systems); 제품번호 AF3888)와 혼합하였다. 이들 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 항온처리한 후, 배지를 HepG2 세포로부터 흡인시킨 다음, 혼합물 25 μl /웰을 384 플레이트에서 HepG2 세포에 가하고, 6시간 동안 및 18시간 동안 각각 항온처리하였다. 지정된 항온처리 시간 후, 상기 혼합물을 HepG2 세포로부터 제거하고, PBS로 1회 세척한 후, Dil-LDL(Dil 표지는 1,1'-디옥타데실-3,3',3'-테트라메틸인도카보시아닌 퍼클로레이트이다)을 MEM-1% BSA 중의 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 세포에 가하고, 항온처리한 다음, 실온에서 90분 동안 두었다. Dil-LDL을 이후에 제거하고, 세포를 Prefer 고정액(글리옥살, 에탄올, 완충액; 제조원: 미국 캘리포니아주 헤이워드(Hayward) 소재의 아나테크 엘티디.(Anatech LTD.); 제품번호 414)으로 20분 동안 고정시킨 후, 세포를 PBS로 2회 세척한 다음, 세포 내 Dil-LDL 흡수를 형광 강도 판독 분석기를 사용하여 판독하였다. 이들 검정에서 생성된 데이터는 아래 표 4에 제시되어 있다.

표 4

PCSK9 및 항-PCSK9 항체의 존재하에 LDL 흡수.

6 시간 항온처리

[PCSK9] ug/ml	대조군	항-CAT	항-총
15	20675218	22419420	18606777
5	21873226	25617426	31744993
1.67	23647886	29483684	30994715
0	29824887	28736616	30124921

18 시간 항온처리

[PCSK9] ug/ml	대조군	항-CAT	항-총
15	20163100	21843043	17106209
5	24214957	25921384	27741479
1.67	27777510	32019111	29054521
0	31232393	32526668	28127286

[0244]

[0245]

표 4는, 촉매적 도메인 펩타이드에 대해 생성된 폴리클로날 항체(항-CAT) 또는 총 단백질에 대해 생성된 항체(항-총) 중의 하나의 존재하에 지정된 양의 정제된, 재조합 PCSK9(대조군) 또는 PCSK9으로 처리된 사람 HepG2 간 세포에 의한 diI-표지된 LDL의 흡수를 나타낸다. 상기 세포에 의한 LDL의 PCSK9-의존적 흡수는 혼합물 중의 항-PCSK9 항체의 존재에 좌우된 방식으로 증가하였다. 숫자가 높을수록 PCSK9의 존재에도 불구하고 LDL 흡수 및 LDLR의 관찰이 더 많음을 나타냈다.

[0246]

실시예 3: 항-PCSK9 항체의 특성.

[0247]

75B9, 77D10, 11B5, 22D11, 1F11/1G11 및 29C10 항-PCSK9 항체를 특성화하였다. 당해 항체들은 PCSK9 및 LDL 수용체 사이의 상호작용을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 PCSK9-매개된 LDL 수용체 분해를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 생체 내에서, 당해 항체는 PCSK9를 억제함으로써, 존재하는 LDL 수용체의 수준을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 또한, 당해 항체는 외인성 PCSK9가 가해지는 경우 관찰된 생체 내 콜레스테롤 증가를 중화시켰다.

[0248]

항-PCSK9 항체를 사용한 PCSK9-매개된 LDLR 분해의 억제.

[0249]

75B9, 77D10, 11B5, 22D11, 1F11/1G11 및 29C10 항체를, HepG2 세포에서 PCSK9에 의한 LDL 수용체의 분해를 억제하는 항체의 능력에 대해 세포-내 웨스턴 검정으로 평가하였다.

[0250]

세포-내 웨스턴을 수행하여 PCSK9-매개된 LDLR 분해의 항-PCSK9 항체 억제를 정량하였다. HepG2 세포를 384-웰 콜라겐 I 피복된 플레이트에 시딩한 다음, 항-PCSK9 항체 및/또는 PCSK9 (100 nM)으로 18시간 동안 처리하였다. LDLR 및 β -액틴의 검출을, 상기한 항체를 사용하여 제조업자의 프로토콜(제조원: 미국 네브라스카주 Lincoln 소재의 Li-Cor Biosciences)에 따라 IRDye 800CW 염소 항-토끼(Li-Cor) 및 IRDye 680 염소 항-마우스(Li-Cor)와 함께 수행하였다. 당해 검정을, 오디세이 적외선 영상화 시스템(Li-Cor) 위에서 판독한 다음, 각각의 웰에서 LDLR 단백질에 대한 시그널을 β -액틴 함량으로 표준화하였다. 이들 실험으로부터의 데이터는 아래 표 5에 기재되어 있다.

표 5

세포-내 웨스턴 검정에서 관찰된 항-PCSK9항체 각각의 억제 수준

치료	관측된 LDLR 분해 억제의 상대적 수준*
75B9 항-PCSK9 항체 (IgG2a)	++
77D10 항-PCSK9 항체 (IgG2b)	++
11B5 항-PCSK9 항체 (IgG2a)	++
22D11 항-PCSK9 항체 (IgG1)	+
1F11/1G11 항-PCSK9 항체 (IgG2a)	+++
29C10 항-PCSK9 항체 (IgG2a)	+
PCSK9 대조군 없음	100%
+ PCSK9/항체 대조군 없음	0%

* + 기호의 수가 증가할수록 기타 치료에 대해 더 높은 수준의 억제를 나타낸다.

[0251]

[0252]

"+PCSK9/항체 대조군 없음"과 관련하여, 당해 항체를 HepG2 세포에서 각종 효능을 갖는 LDL 수용체의 억제된 PCSK9-매개된 분해를 시험하였다.

[0253]

알파스크린 결합 검정(Alphascreen binding assays)

[0254]

PCSK9-FLAG 및 잠정적 결합 파트너 사이의 상호작용을 직접적으로 결정할 수 있는 ALPHA(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay, 제조원: 미국 매사추세츠주 왈탐 소재의 Perkin-Elmer)를 사용하여 이 상호작용에 있어 항-PCSK9 항체의 효과를 결정하였다. 당해 기술은, "공여자" 및 "수용체" 비드가 단백질-단백질 상호작용을 통해 근접하여 증가된 발광성을 생성(참조: Ullman et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (1994) 91:5426-5430)함을 요구하였다. 기초 검정에서, PCSK9에 대한 LDL 수용체 결합은 다음과 같이 결정되었다: 적절한 농도의 제조항 수용체 5 μ l를 PCSK9-FLAG(1.4 μ g/ml, 30 분) 2.5 μ l와 함께 항온처리하였다. 바이오티닐화된 항-Flag-M2 항체(1.8 μ g/ml) 약 2.5 μ l를 가한 다음, 혼합물을 1시간 동안 항온처리하였다. 이후에, 스트렙타비딘 공여자 비드 및 니켈 킬레이트 수용체 비드(1:1 혼합물) 5 μ l를 가한 다음, 당해 검정을 밤새 항온처리하였다. 알파스크린 시그널(초당 수)을 EnVision microplate 판독기(제조원: Perkin-Elmer)를 사용하여 분석하였다. 모든 데이터 실험들을 3회 측정하였다. 검정은 25 mM HEPES, 0.1 M NaCl, pH 7.4, 0.1% BSA를 함유하는 완충액 속에서 23°C로 수행하였다. 억제 검정을 용적 및 단백질 농도를 검정하기 위해서 약간 조절하여 유사하게 결정하였다. 요약하면, PCSK9-Flag의 1.25 μ g/ml 및 His-태그된 LDL 수용체 1.25 μ g/ml의 5 μ l를 적절한 농도에서 항체 2.5 μ l와 함께 30분 동안 항온처리한 후, 항-Flag-BioM2(1.8 μ g/ml) 2.5 μ l를 가하고, 1시간 항온처리하였다. 이들 검정으로부터의 데이터는 아래 표 6에 나타낸다.

표 6

PCSK9/LDLR 상호작용의 항-PCSK9항체 매개된 억제의 수준

치료	IC ₅₀ (nM)	항체의 450 nM에서의 억제율(%)
75B9 항-PCSK9 항체 (IgG2a)	0.5	100
77D10 항-PCSK9 항체 (IgG2b)	38	62
11B5 항-PCSK9 항체 (IgG2a)	0.4	100
22D11 항-PCSK9 항체 (IgG1)	ND	ND
1F11/1G11 항-PCSK9 항체 (IgG2a)	0.049*	88*
29C10 항-PCSK9 항체 (IgG2a)	13	71

* 2개 측정값의 평균.

[0255]

- [0256] 시험한 당해 항체는 PCSK9/LDL 수용체 상호작용을 다양한 효능(항체를 첨가하지 않고 수행한 검정에 대해 상대적인 IC_{50} 및 억제율(%)의 용어로 표현함)으로 억제하였다.
- [0257] LDLR 분해 및 혈장 콜레스테롤의 생체 내 억제에 있어 항-PCSK9의 효과
- [0258] 마우스에서 LDL 수용체 분해를 억제하는 항-PCSK9 항체(1F11/1G11)의 능력을, 콜레스테롤 수준을 조절하는 항체의 능력과 함께 당해 검정에서 평가하였다.
- [0259] 생체 내 과정:
- [0260] 시간-0: 수컷 C57BL/6j 마우스에 항-사람 PCSK9 항체, 1F11/1G11 400 μ g을 복강내 주사하였다.
- [0261] 시간-2 시간: 이후에, 마우스에 사람 PCSK9 단백질 10 μ g으로 정맥내 주사하였다.
- [0262] 시간-4 시간: 마우스를 죽인 다음, 혈장 및 간 샘플을 수집하였다.
- [0263] 분석:
- [0264] 각각의 마우스(0.1 mL 혈장)의 혈장 지단백질 프로파일을 Pharmacia Superose 6 칼럼을 사용하는 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC)로 측정하였다. FPLC 분획 콜레스테롤 수준을 Wako Cholesterol Enzymatic 비색 방법을 사용하여 측정하였다.
- [0265] 간 LDL 수용체의 단백질 수준을 웨스턴 블롯(Western Blot)으로 측정하였다. 각각의 간 균질물 40 μ g을 Invitrogen 4 내지 12% NuPAGE 겔 상에서 분리시키고, PVDF 막으로 이전시킨 다음, 염소 항-마우스 LDL 수용체 항체(토끼 항-GAPDH 항체를 동등한 로딩(loading)을 위해 대조군으로서 사용하였다)로 항온처리하였다. 이후에, 막을 상응하는 HRP-연결된 항체와 함께 항온처리한 다음, 고성능 화학발광 필름으로 가시화하였다. 밴드 강도를 ImageQuant 5.2 소프트웨어를 사용하여 정량하였다.
- [0266] LDL 수용체 수준을 GAPDH 밴드 강도에 대한 LDL 수용체 밴드 강도의 비로서 AU(Arbitrary Units)로 표현하였다. LDL 수용체 측정 결과를 아래 표 7 및 표 8에 나타낸다. 데이터의 2개의 별개의 분석이 제시되어 있다.

표 7

LDLR 패널 대 GAPDH 패널 둘다의 발광체 노출

마우스	LDLR	GAPDH	LDLR/GAPDH	평균	변화율(%)
107	13714	50469	0.272	0.235 (항체 및 PCSK9)	-48.0
108	13766	49467	0.278		
109	12508	47790	0.262		
110	5977	46744	0.128		
111	1724	46456	0.037	0.081 (식염수 및 PCSK9)	-82.0
112	912	44130	0.021		
113	2631	51367	0.051		
114	10217	47345	0.216		
115	23237	48860	0.476	0.452 (식염수만 존재)	대조군
116	18589	47694	0.390		
117	16577	47554	0.349		
118	27116	45755	0.593		

[0267]

표 8

LDLR 패널 대 발광체 GAPDH 패널의 더 어두운 노출

마우스	LDLR	GAPDH	LDLR/GAPDH	평균	변화율(%)
107	19883	45242	0.439	0.377 (항체 및 PCSK9)	-35.2
108	18057	45634	0.396		
109	18642	43767	0.426		
110	10669	42898	0.249		
111	2817	43967	0.064	0.123 (식염수 및 PCSK9)	-78.8
112	1204	43206	0.028		
113	4252	47846	0.089		
114	13848	44288	0.313		
115	27675	44510	0.622	0.582 (식염수만 존재)	대조군
116	23016	45090	0.510		
117	19837	44526	0.446		
118	32897	43792	0.751		

[0268]

[0269]

1F11/1G11 항체는 시험된 마우스에서 PCSK9 매개된 LDL 수용체 분해의 수준을 감소시켰다.

표 9

지정된 조건하에 시험된 마우스 내 혈장 콜레스테롤 수준

치료	혈장 총 콜레스테롤 수준 (mg/dl)
항-PCSK9 및 PCSK9	72.05
식염수 및 PCSK9	83.28
식염수만 존재	74.88

[0270]

[0271]

1F11/1G11 항체는 시험된 마우스에서 PCSK9 매개된 콜레스테롤 증가의 수준을 감소시켰다.

[0272]

본 발명은 본원에 기재된 특정 양태에 의해 범위가 제한되지는 않는다. 실제로, 본원에 기재된 것에 추가하여 본 발명의 다양한 변화가 전술한 기재로부터 당해 분야의 숙련가에게 명백해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구의 범위내에 속하는 것으로 의도된다.

[0273]

특허, 특허 출원, 공보, 제품 설명, 및 프로토콜이 본 출원에 걸쳐 인용되고, 이들 기재는 모든 목적을 위해 전 문이 본원에 참조로 인용되어 있다.

도면

도면1a

카밧에 따른 잔기 번호매김

중쇄

11B5	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	T	L	S	C	T	A	S	G	F	N	I	K	D	T	Y	M	H	-----CDR-H1-----
75B9	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	D	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S	G	F	N	I	K	D	T	Y	I	H	
77D10	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	R	S	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	I	H		
29C10	E	V	L	L	Q	Q	S	V	A	E	L	V	R	P	G	A	S	V	R	L	S	C	T	A	S	G	F	N	I	K	D	T	Y	I	H	
22D11	E	V	Q	L	V	D	S	G	G	L	V	Q	P	G	R	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	E	S	N	H	D	M	A		
1F11	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	V	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	N	
1G11	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	V	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	N	26 30 35

11B5	W	V	N	Q	R	P	E	Q	G	L	V	W	I	G	R	I	D	P	A	N	G	H	T	E	Y	D	P	K	F	Q	D	-----CDR-H2-----
75B9	W	V	K	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	A	N	G	H	T	E	Y	D	P	K	F	Q	G	
77D10	W	V	K	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	E	Y	A	P	K	F	Q	G	
29C10	W	V	R	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	F	G	W	I	D	P	A	N	G	Y	T	K	Y	A	P	N	F	Q	G	
22D11	W	V	R	Q	A	P	T	K	G	L	E	W	V	A	S	I	T	P	S	G	G	T	T	Y	Y	R	D	S	V	E	G	
1F11	W	V	K	Q	S	H	G	K	S	L	E	W	I	G	D	I	N	P	N	G	G	A	I	Y	N	Q	K	F	K	G		
1G11	W	V	K	Q	S	H	G	K	S	L	E	W	I	G	D	I	N	P	N	G	G	A	I	Y	N	Q	K	F	K	G	50 60 65	

도면1b

11B5 K A T I T D T S S N T A Y L H L S S L T S G D T A V Y C A R
75B9 R A T L T T D T S S N T A Y L Q L L F S L T S E D S A V Y F C A R
77D10 K A T M T A D T S S N T A Y L Q L L S S L T S A D T A V Y C N A R
29C10 K A T L T T D T S S N T A Y L H L S S L T S E D S A I Y Y C A R
22D11 R F T V S R D N V K S S I A Y M E L R S L T S E D S A T Y Y C A R
1F11 K A T L T V D K S S I A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T S
1G11 K A T L T V D K S S I A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T S
70 80 a b c 90

-----CDR-H3-----
11B5 S Y F G S I F A Y W G Q G T L V T V S A
75B9 S Y Y G S I F A Y W G Q G T L V T V S A
77D10 Y Y R Y D D G T W F P Y W G Q G T L V T V S A
29C10 G Y Y R Y Y S L D Y W G Q G T S V T V S S
22D11 Q N Y Y D G S Y Y G L Y Y F D Y W G Q G V M V T V S S
1F11 G I I T E I A E D F W G Q G T L T V S S
1G11 G I I T E I A E D F W G Q G T L T V S S
95 102 110

도면1c

정세

```

11B5 Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S ( S S
75B9 Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S ( S S
77D10 D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T ( G N I
29C10 D I Q M T Q T T S S L S A S I G D R V T I S ( Q D I
22D11 D V L M T Q T P V S L P V S L G G Q V S I S ( Q S L V S D G
1F11 D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S V T ( Q N V
1G11 D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S V T ( Q N V
1
10
20
-----L1-----
11B5 V S Y L Y W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S G V P
75B9 V S Y L F W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S G V P
77D10 H S Y L A W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S G V P
29C10 S N Y L N W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S G V P
22D11 N T Y L H W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S G V P
1F11 G T N V V W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S G V P
1G11 G T N V V W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S G V P
30 34 40 50 56

```


도면1d

11B5	ARFSGSGSGT	SYSLT	ISSM	EAE	DAATYYC
75B9	ARFSGSGSGT	SFSLT	ISSM	EAE	DAATYYC
77D10	S R F S V S G S G T	Q Y S L K I N S	L Q P E D	F G T Y Y F C	
29C10	S R F S G R S G T	D Y S L T I S T	L E Q E D	I A T Y Y F C	
22D11	D R F S G S G S G T	D F T L K I S R	V E P E D	L G L Y Y F C	
1F11	D R F K G S G S G T	D F T L T I T N	V Q S E D	L A G F F C	
1G11	D R F K G S G S G T	D F T L T I T N	V Q S E D	L A G F F C	
	60	70	80		
	-----L3-----				
11B5	H Q Y Q S Y P P T	F G G G T	K L E I	K R A	
75B9	H Q Y H T Y P P T	F G G G T	K L E I	K R A	
77D10	Q H F W N T P W T	F G G G T	K L E I	K R A	
29C10	Q Q G K T L P L T	F G A G T	K L E I	K R A	
22D11	L Q S T H F P P T	F G S G T	K L E I	K R A	
1F11	Q Q Y K T Y P P T	F G G G T	K L E I	K R A	
1G11	Q Q Y K T Y P P T	F G G G T	K L E I	K R A	
	80	90	100		

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Schering Corporation

<120> Anti-PCSK9 and Methods for Treating Lipid and Cholesterol Disorders

<130> 5-1998-069738-4

<150> 60/982,922

<151> 2007-10-26

<160> 57

<170> Kopatent In 1.71

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 860

<212> PRT

<213> Homo sapiens

 $\langle 400 \rangle$ 1

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

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

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

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

 Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp
 210 215 220
 Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp
 245 250 255

Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn
260 265 270

Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu
275 280 285

Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp
290 295 300

Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp
305 310 315 320

Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr
325 330 335

Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys
340 345 350

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys
355 360 365

Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln
370 375 380

Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr
385 390 395 400

Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg
405 410 415

Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu
420 425 430

Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln
435 440 445

Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser
450 455 460

Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala
465 470 475 480

Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly
485 490 495

Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe

500 505 510
 Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
 515 520 525

 Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
 530 535 540
 Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile
 545 550 555 560
 Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
 565 570 575
 Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
 580 585 590

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

 Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
 660 665 670
 Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
 675 680 685
 Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
 690 695 700
 Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
 705 710 715 720

 Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
 725 730 735
 Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
 740 745 750

Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
755 760 765

His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro
770 775 780

Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val
785 790 795 800

Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
805 810 815

Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
820 825 830

Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro
835 840 845

Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
850 855 860

<210> 2

<211> 767

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe Gln Cys Gln Asp Gly
1 5 10 15

Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly Ser Ala Glu Cys Gln
20 25 30

Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu Ser Val Thr Cys Lys
35 40 45

Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn Arg Cys Ile Pro Gln
50 55 60

Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp Asn Gly Ser Asp Glu
65 70 75 80

Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp Glu Phe Arg Cys His
85 90 95

Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys Asp Ser Asp Arg Asp

100	105	110	
Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro Val Leu Thr Cys Gly			
115	120	125	
Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys Ile Pro Gln Leu Trp			
130	135	140	
Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu Trp Pro			
145	150	155	160
Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly Asp Ser Ser Pro Cys			
165	170	175	
Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu Cys Ile His Ser Ser			
180	185	190	
Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp Lys Ser Asp Glu Glu			
195	200	205	
Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu Phe Gln Cys Ser Asp			
210	215	220	
Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp Arg Glu Tyr Asp Cys			
225	230	235	240
Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn Val Thr Leu Cys Glu			
245	250	255	
Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu Cys Ile Thr Leu Asp			
260	265	270	
Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp Glu Pro			
275	280	285	
Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Asn Gly Gly Cys			
290	295	300	
Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro			
305	310	315	320
Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu			
325	330	335	
Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys Val Asn Leu Glu Gly			
340	345	350	

Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln Leu Asp Pro His Thr
355 360 365

Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr Leu Phe Phe Thr Asn
370 375 380

Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg Ser Glu Tyr Thr Ser
385 390 395 400

Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu Asp Thr Glu Val Ala
405 410 415

Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln Arg Met Ile Cys Ser
420 425 430

Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser Tyr Asp Thr Val Ile
435 440 445

Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala Val Asp Trp Ile His
450 455 460

Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly Thr Val Ser Val Ala
465 470 475 480

Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe Arg Glu Asn Gly Ser
485 490 495

Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His Gly Phe Met Tyr Trp
500 505 510

Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys Gly Gly Leu Asn Gly
515 520 525

Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile Gln Trp Pro Asn Gly
530 535 540

Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ser Lys
545 550 555 560

Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly Gly Asn Arg Lys Thr
565 570 575

Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro Phe Ser Leu Ala Val
580 585 590

Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile Asn Glu Ala Ile Phe

595 600 605
 Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn Leu Leu Ala Glu Asn
 610 615 620

Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His Asn Leu Thr Gln Pro
 625 630 635 640
 Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu Ser Asn Gly Gly Cys
 645 650 655
 Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn Pro His Ser Pro Lys
 660 665 670
 Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu Ala Arg Asp Met Arg
 675 680 685

Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala Thr Gln Glu Thr Ser
 690 695 700
 Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val Arg Thr Gln His Thr
 705 710 715 720
 Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu Pro Gly Ala Thr Pro
 725 730 735
 Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser His Gln Ala Leu Gly
 740 745 750

Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro Ser Ser Val Arg
 755 760 765

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

35

40

<210> 4

<211> 692

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Thr Val Ser Ser Arg Arg Ser Trp Trp Pro Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ala Arg Ala Gln Glu

20 25 30

Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg Ser Glu

35 40 45

Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr Thr Ala Thr Phe

50 55 60

His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Val Val

65 70 75 80

Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu Arg Thr Ala Arg

85 90 95

Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys Ile Leu

100 105 110

His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met Ser Gly

115 120 125

Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr Ile Glu

130 135 140

Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg

145 150 155 160

Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp Gly

165 170 175

Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp

180 185 190

His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp Phe Glu Asn Val

195 200 205
 Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp
 210 215 220
 Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly
 225 230 235 240
 Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln

 245 250 255
 Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg
 260 265 270
 Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro
 275 280 285
 Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu
 290 295 300
 Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp

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

 370 375 380
 Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met Met Leu
 385 390 395 400
 Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile
 405 410 415
 His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp
 420 425 430
 Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr

 435 440 445

His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala His
 450 455 460
 Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Val Ala Arg Cys Ala Pro Asp
 465 470 475 480
 Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Lys Arg Arg
 485 490 495
 Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val Cys Arg Ala His
 500 505 510
 Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala Arg Cys Cys Leu
 515 520 525
 Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ala
 530 535 540
 Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly His Val Leu Thr
 545 550 555 560
 Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly Thr His Lys Pro
 565 570 575
 Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly His Arg
 580 585 590
 Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu Glu Cys
 595 600 605
 Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val Thr Val
 610 615 620
 Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu Pro Gly
 625 630 635 640
 Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val Val
 645 650 655
 Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Glu Gly Ala Val
 660 665 670
 Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser
 675 680 685
 Gln Glu Leu Gln
 690

<210> 5

<211> 677

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 5

Met Gly Thr Val Ser Ser Arg Arg Ser Trp Trp Pro Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ala Arg Ala Gln Glu

20 25 30

Asp Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr Thr Ala Thr

35 40 45

Phe His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Val

50 55 60

Val Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu Arg Thr Ala

65 70 75 80

Arg Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys Ile

85 90 95

Leu His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met Ser

100 105 110

Gly Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr Ile

115 120 125

Glu Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu

130 135 140

Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp

145 150 155 160

Gly Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln Ser

165 170 175

Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp Phe Glu Asn

180 185 190

Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys

195 200 205

Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala
 210 215 220
 Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys
 225 230 235 240
 Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile
 245 250 255
 Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu Leu
 260 265 270
 Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln Arg
 275 280 285
 Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe Arg
 290 295 300
 Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr
 305 310 315 320
 Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu
 325 330 335
 Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu Asp
 340 345 350
 Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln Ser
 355 360 365
 Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met Met
 370 375 380
 Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu
 385 390 395 400
 Ile His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu
 405 410 415
 Asp Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro Ser
 420 425 430
 Thr His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala
 435 440 445
 His Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Val Ala Arg Cys Ala Pro

450 455 460
 Asp Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Lys Arg
 465 470 475 480
 Arg Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val Cys Arg Ala
 485 490 495
 His Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala Arg Cys Cys

 500 505 510
 Leu Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Ile His Thr Ala Pro Pro Ala Glu
 515 520 525
 Ala Gly Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly His Val Leu
 530 535 540
 Thr Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly Thr His Lys
 545 550 555 560
 Pro Pro Met Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly His

 565 570 575
 Arg Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys Arg Ala Pro Gly Leu Glu
 580 585 590
 Cys Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val Thr
 595 600 605
 Val Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu Pro
 610 615 620
 Gly Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val

 625 630 635 640
 Val Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Ala Gly Ser Thr Ser Glu Glu Ala
 645 650 655
 Val Ala Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala
 660 665 670
 Ser Gln Glu Leu Gln
 675
 <210> 6
 <211> 694
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Met Gly Thr His Cys Ser Ala Trp Leu Arg Trp Pro Leu Leu Pro Leu

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

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

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

195 200 205
Asn Ser Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser
210 215 220
Lys Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg

225 230 235 240
 Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Thr Ser Leu His Ser Leu Arg Val Leu
 245 250 255
 Asn Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu

 260 265 270
 Phe Ile Arg Lys Ser Gln Leu Ile Gln Pro Ser Gly Pro Leu Val Val
 275 280 285
 Leu Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Ile Leu Asn Ala Ala Cys
 290 295 300
 Arg His Leu Ala Arg Thr Gly Val Val Leu Val Ala Ala Ala Gly Asn
 305 310 315 320
 Phe Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val

 325 330 335
 Ile Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly
 340 345 350
 Thr Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly
 355 360 365
 Lys Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Met Ser
 370 375 380
 Gln Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Val Ala

 385 390 395 400
 Arg Met Leu Ser Arg Glu Pro Thr Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln
 405 410 415
 Arg Leu Ile His Phe Ser Thr Lys Asp Val Ile Asn Met Ala Trp Phe
 420 425 430
 Pro Glu Asp Gln Gln Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Thr Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ser Thr His Glu Thr Gly Gly Gln Leu Leu Cys Arg Thr Val Trp

 450 455 460
 Ser Ala His Ser Gly Pro Thr Arg Thr Ala Thr Ala Thr Ala Arg Cys
 465 470 475 480

Ala Pro Glu Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly
485 490 495

Arg Arg Arg Gly Asp Trp Ile Glu Ala Ile Gly Gly Gln Gln Val Cys
500 505 510

Lys Ala Leu Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Val Ala Arg
515 520 525

Cys Cys Leu Val Pro Arg Ala Asn Cys Ser Ile His Asn Thr Pro Ala
530 535 540

Ala Arg Ala Gly Leu Glu Thr His Val His Cys His Gln Lys Asp His
545 550 555 560

Val Leu Thr Gly Cys Ser Phe His Trp Glu Val Glu Asp Leu Ser Val
565 570 575

Arg Arg Gln Pro Ala Leu Arg Ser Arg Arg Gln Pro Gly Gln Cys Val
580 585 590

Gly His Gln Ala Ala Ser Val Tyr Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly
595 600 605

Leu Glu Cys Lys Ile Lys Glu His Gly Ile Ser Gly Pro Ser Glu Gln
610 615 620

Val Thr Val Ala Cys Glu Ala Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Asn Val
625 630 635 640

Leu Pro Gly Ala Ser Leu Thr Leu Gly Ala Tyr Ser Val Asp Asn Leu
645 650 655

Cys Val Ala Arg Val His Asp Thr Ala Arg Ala Asp Arg Thr Ser Gly
660 665 670

Glu Ala Thr Val Ala Ala Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg Pro Ser Ala
675 680 685

Lys Ala Ser Trp Val Gln
690

<210> 7

<211> 691

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

Met Gly Ile Arg Cys Ser Thr Trp Leu Arg Trp Pro Leu Ser Pro Gln

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

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

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

195 200 205
Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp Ser
210 215 220
His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly Val
225 230 235 240

Ala Lys Gly Thr Ser Leu His Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln Gly
245 250 255

Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg Lys
260 265 270

Ser Gln Leu Ile Gln Pro Ser Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro Leu
275 280 285

Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Ile Leu Asn Thr Ala Cys Gln Arg Leu Ala
290 295 300

Arg Thr Gly Val Val Leu Val Ala Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp Asp
305 310 315 320

Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr Val Gly
325 330 335

Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly Thr
340 345 350

Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Lys Asp Ile Ile
355 360 365

Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Tyr Met Ser Gln Ser Gly Thr
370 375 380

Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Val Ala Met Met Leu Asn
385 390 395 400

Arg Asp Pro Ala Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile Leu
405 410 415

Phe Ser Thr Lys Asp Val Ile Asn Met Ala Trp Phe Pro Glu Asp Gln
420 425 430

Arg Val Leu Thr Pro Asn Arg Val Ala Thr Leu Pro Pro Ser Thr Gln
435 440 445

Glu Thr Gly Gly Gln Leu Leu Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala His Ser
450 455 460

Gly Pro Thr Arg Thr Ala Thr Ala Thr Ala Arg Cys Ala Pro Glu Glu
465 470 475 480

Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Arg Arg Arg Gly

485 490 495
 Asp Arg Ile Glu Ala Ile Gly Gly Gln Gln Val Cys Lys Ala Leu Asn
 500 505 510
 Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Val Ala Arg Cys Cys Leu Leu

515 520 525
 Pro Arg Val Asn Cys Ser Ile His Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Gly
 530 535 540
 Pro Gln Thr Pro Val His Cys His Gln Lys Asp His Val Leu Thr Gly
 545 550 555 560
 Cys Ser Phe His Trp Glu Val Glu Asn Leu Arg Ala Gln Gln Gln Pro
 565 570 575
 Leu Leu Arg Ser Arg His Gln Pro Gly Gln Cys Val Gly His Gln Glu

580 585 590
 Ala Ser Val His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu Glu Cys Lys
 595 600 605
 Ile Lys Glu His Gly Ile Ala Gly Pro Ala Glu Gln Val Thr Val Ala
 610 615 620
 Cys Glu Ala Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Asn Val Leu Pro Gly Ala
 625 630 635 640
 Ser Leu Pro Leu Gly Ala Tyr Ser Val Asp Asn Val Cys Val Ala Arg

645 650 655
 Ile Arg Asp Ala Gly Arg Ala Asp Arg Thr Ser Glu Glu Ala Thr Val
 660 665 670
 Ala Ala Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg Pro Ser Ala Lys Ala Ser Trp
 675 680 685
 Val His Gln

690

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg

1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Arg Ser Gly Lys Arg Arg Gly Glu Arg Met Glu Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Val Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Glu Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Phe Gly Ser Ile Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His

1 5 10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Glu Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Ser Tyr Phe Gly Ser Ile Phe Ala Tyr

1 5

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe

35 40 45

Arg Ser Ser His Arg Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

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

 100 105
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 15
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu Tyr
 1 5 10

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16
 Arg Ser Ser His Arg Ala Ser
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 17
 His Gln Tyr Gln Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 118
 <212>
 > PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 18

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

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

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400>

> 19

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Glu Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Ser Tyr Tyr Gly Ser Ile Phe Ala Tyr

1 5

<210> 22

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu

20 25 30

Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Thr Tyr Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala

100 105

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu Phe

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Arg Thr Ser Tyr Leu Ala Ser

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

His Gln Tyr His Thr Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp Gly Thr Trp Phe Pro Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

120

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His

1

5

10

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp Gly Thr Trp Phe Pro Tyr

1

5

10

<210> 30

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

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

1

5

10

15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Ser Tyr

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala

100 105

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Asn Ala Lys Thr Leu Pro Asp

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Gln His Phe Trp Asn Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Phe

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Ala Pro Asn Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Arg Tyr Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Trp Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Ala Pro Asn Phe Gln

1 5 10 15
Gly

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Gly Tyr Tyr Arg Tyr Tyr Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 38

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ser Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala

100 105

<210>

39

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus
 <400> 39
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 40
 Tyr Ser Ser Arg Leu His Ser
 1 5
 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 41
 Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 42
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 42
 Glu Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

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

 65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gln Asn Tyr Tyr Asp Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr

100

105

110

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

115

120

125

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400

> 43

Gly Phe Thr Phe Ser Asn His Asp Met Ala

1

5

10

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Ser Ile Thr Pro Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Glu

1

5

10

15

Gly

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Gln Asn Tyr Tyr Asp Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Phe Asp

1

5

10

15

Tyr

<210> 46

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

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

1 5 10 15

Gly Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser

85 90 95

Thr His Phe Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Ala

<210> 47

<211> 16

<212>

> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

Leu Gln Ser Thr His Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Ala Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ser Gly Ile Ile Thr Glu Ile Ala Glu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Ala Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Gly Ile Ile Thr Glu Ile Ala Glu Asp Phe

1 5 10

<210> 54

<211> 109

<212> PRT

<213>

Mus musculus

<400> 54

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

His Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Lys Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser

65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Gly Phe Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Thr Tyr Pro Tyr

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys Arg Ala

100 105

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 55

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Val

1 5 10

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

Gln Gln Tyr Lys Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5