



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.

*A61K 38/46* (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0057712

*A61P 1/16* (2006.01)

(43) 공개일자 2007년06월07일

*A61K 48/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-7027008

(22) 출원일자 2006년12월21일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년12월21일

(86) 국제출원번호 PCT/NL2005/000446

(87) 국제공개번호 WO 2005/123117

국제출원일자 2005년06월20일

국제공개일자 2005년12월29일

(30) 우선권주장 60/580,903 2004년06월21일 미국(US)

(71) 출원인  
 아카데미쉬 지에켄후이스 비즈 드 유니버시테이트 반 암스테르담  
 네덜란드 엔엘-1105 에이제트 암스테르담-주이두스트 메이베르그드리프 9  
 암스테르담 몰레클러 테라퓨틱스 비. 브이.  
 네덜란드 엔엘-1105 비에이 암스테르담 메이베르그드리프 61

(72) 발명자  
 반 데벤터 산더 얀 핸드릭  
 네덜란드 엔엘-2012 씨에이치 할렘 클레이네 호우트베그 6

(74) 대리인 박장원

전체 청구항 수 : 총 14 항

## (54) 비알코올성 지방 간염(N A S H)의 치료 방법

## (57) 요약

본 발명은 대상자에 유효량의 지질단백 리파제(LPL) 치료제를 투여함으로써 대상자의 비알코올성 지방 간염(NASH)을 치료하는 방법에 관한 것이다. LPL 치료제는 S447X 단백질 또는 유도체 또는 그의 변형체, 또는 그러한 단백질을 코딩하는 핵산인 것이 유리하다. LPL 치료제는 유전자 치료 벡터로서 사용될 수 있다.

## 특허청구의 범위

## 청구항 1.

대상자의 비알코올성 지방 간염 치료용 약제의 제조를 위한 LPL 치료제의 용도.

## 청구항 2.

제1항에 있어서, LPL 치료제는 다음으로 이루어진 군 중에서 선택된 것인 용도:

- a) SEQ ID No.1에 나타난 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 S447X 단백질 또는 그의 유도체;
- b) SEQ ID NO:1과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 인접한 분절을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 LPL 단백질 또는 그의 유도체: 최적으로 정렬될 경우 이들은 a) 단백질과 동등하거나 더 큰 LPL 활성을 갖는다; 또는
- c) a) 또는 b)를 코딩하는 핵산, 또는 그의 유도체.

### 청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, LPL 치료제는 SEQ ID NO: 2의 뉴클레오티드 256 내지 1599와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 RNA를 코딩하는 DNA 코딩 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 것인 용도.

### 청구항 4.

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, LPL 치료제는 엄격한 조건 하에서 SEQ ID NO:2의 뉴클레오티드 256 내지 1599와 하이브리다이즈하는 DNA 코딩 서열을 포함하는 핵산인 것인 용도.

### 청구항 5.

제1항 또는 제2항에 있어서, LPL 치료제는 SEQ ID NO:1와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 인접한 분절을 갖는 LPL S447X 단백질인 것인 용도.

### 청구항 6.

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, LPL 치료제는 유전자 치료 벡터로 대상자에게 투여되는 것인 용도.

### 청구항 7.

제6항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 바이러스 벡터를 포함하는 것인 용도.

### 청구항 8.

제7항에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스(AAV)를 포함하는 것인 용도.

### 청구항 9.

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 대상자는 인간인 것인 용도.

### 청구항 10.

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, LPL 치료제는 비경구적으로 투여되는 것인 용도.

## 청구항 11.

유효량의 LPL 치료제를 대상자에 투여하는 것을 포함하여 이루어지는, 대상자의 비알코올성 지방 간염 치료 방법.

## 청구항 12.

제11항에 있어서, LPL 치료제는 다음으로 이루어진 군 중에서 선택된 것인 방법:

- a) SEQ ID No.1에 나타난 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 S447X 단백질 또는 그의 유도체;
- b) SEQ ID NO:1과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 인접한 분절을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 LPL 단백질 또는 그의 유도체: 최적으로 정렬될 경우 이들은 a) 단백질과 동등하거나 더 큰 LPL 활성을 갖는다; 또는
- c) a) 또는 b)를 코딩하는 핵산, 또는 그의 유도체.

## 청구항 13.

제11항에 있어서, LPL 치료제는 SEQ ID NO: 2의 뉴클레오티드 256 내지 1599와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 RNA를 코딩하는 DNA 코딩 서열을 포함하는 LPL 핵산을 포함하는 것인 방법.

## 청구항 14.

제11항에 있어서, LPL 치료제는 염격한 조건 하에서 SEQ ID NO:2의 뉴클레오티드 256 내지 1599와 하이브리다이즈하는 DNA 코딩 서열을 포함하는 핵산인 것인 방법.

**명세서**

### 기술분야

본 발명은 비알코올성 지방 간염의 치료를 위한 단백질 및 핵산 치료제 분야에 관한 것이다.

### 배경기술

비알코올성 지방 간염(NASH)은 비알코올성 지방 간질환(NAFL)의 스펙트럼 중 일부이며, 과도한 알코올 섭취에 의해 유도되는 것에 비견되는, 간에서의 조직학적 변화의 발달을 가리킨다. 그러나 NASH는 알코올을 과음하지 않는 사람에서도 일어난다. NASH는 혈청 아미노트랜스퍼레이스의 증가에 의해 특징지어지는데, 이는 간세포 손상을 의미한다. 병의 특징에는 거대수포성 지방증(Macrovesicular steatosis)(즉, 간세포 핵을 기이하게 대체하는 세포질내 수포(vacuole)), 염증이 있고 때로는 간경화증으로 진행할 수도 있는 섬유증도 있다. NASH가 대사성 인슐린 저항성 증후군의 구성요소라는 증거가 증가하고 있다. 이는 비만증, 이상지질혈증, 동맥경화증 및 당뇨병을 포함한 장애의 집합인데, 인슐린 저항성을 일반적 특징으로 갖는다(de Sligte 외 (2004) Eur J Int Med 15:10).

비록 많은 약물로 NASH를 개선시키고 뒤따른 악화를 방지하기 위해 노력했지만, 이러한 잠재적으로 심각한 질환에 대한 치료가 수립되어 있지 않다. NASH에 대해 효능 시험한 약물 중 하나는 로지글리타존(Muurling et al (2003) Metabolism 52: 1078)이다. 체중의 감소 역시 NASH를 개선시킬 수 있다. 그러나, 이러한 개입에도 불구하고, 상당한 수의 환자에서 NASH는 간경화증으로 진행하고 최종적으로 간 이식을 필요로 하며, 그 후에 질병은 재발할 수 있다.

미국과 유럽 인구 모두에서 비만증과 당뇨병이 증가하는 추세를 고려할 때, NASH의 새로운 치료법이 시급히 요청된다.

## 발명의 상세한 설명

본 발명은 대상자의 비알코올성 지방 간염을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 대상자에게 지질단백 리파제(lipoprotein lipase, LPL) 치료제를 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다. 본 명세서에서, LPL 치료제는 LPL 활성(EC 3.1.1.34)을 가진 단백질이나 그러한 단백질을 코딩하는 핵산을 의미한다.

### LPL 치료제의 단백질 형태

하나의 구체예에서, 본 LPL 치료제는 SEQ ID No.1에 나타난 아미노산 서열을 갖는 LPL 단백질로서, 본 명세서에서 LPL S447X 단백질 또는 웨타이드로 칭하여진다. 일반적으로, 이들 LPL S447X 단백질은 448개의 아미노산을 갖는데, 이는 잘 알려진 야생형 LPL보다 짧은 것이다(예를 들어, Wion 외, Science (1987) 235: 1638 또는 WO 01/00220 참조). 이들은 웨타이드 절편, 변형된 웨타이드 절편, 유사체 또는 야생형 LPL의 카르복시 말단으로부터 절단된 447-448개의 아미노산을 갖는 LPL의 약학적으로 허용 가능한 염과 같은 화합물을 포함할 수 있다. 그러한 화합물은 본 명세서에서 총괄하여 LPL S447X 웨타이드로 칭하여진다. LPL S447X 웨타이드에는 호모 사피엔스(*homo sapiens*) 이외의 종으로부터의 동족체를 포함하여 아미노산 1 내지 446으로부터의 야생형 성숙 LPL 서열의 동족체가 포함될 수 있다(수의학적 적용도 가능하다). LPL S447X 웨타이드는 유도체 및 야생형 LPL의 자연 발생적 아이소형 또는 유전적 변이체를 포함할 수 있다. LPL S447X 단백질의 유도체 및 변이체의 용도 역시 본 발명에 포함된다.

### S447X 단백질의 유도체

특히, 유도체는 LPL S447X 단백질과 동일한 아미노산 서열을 갖지만, 특정 N- 또는 O-당화 부위가 변형되거나 제거된 LPL 활성을 가진 단백질을 포함한다. 유도체는 C-말단 히드록시메틸 유도체, O-변형 유도체(예컨대, C-말단 히드록시메틸 벤질 에테르) 및 알킬아마이드 및 히드라지드와 같은 치환된 아마이드를 포함한 N-말단 변형 유도체 역시 포함한다.

본 발명의 LPL 치료제 내에서, 웨타이드 구조는 변형기(변형기)와 직접적 또는 간접적으로 결합될 수 있다. "변형기(변형기)"라는 용어는 웨타이드 구조에 직접적으로 결합되는 구조(예컨대, 공유 결합에 의해) 뿐만 아니라, 웨타이드 구조에 간접적으로 결합되는 구조(예컨대, MCP-3 코어 웨타이드 구조의 측면에 위치할 수 있는, 안정한 비공유 결합에 의하거나 또는 추가적 아미노산 잔기나 그의 모방체, 유사체, 유도체에의 공유 결합에 의함)를 포함한다. 예를 들어, 변형기는 LPL 치료제 구조의 아미노-말단이나 카르복시-말단에, 또는 코어 도메인의 측면에 위치한 웨타이드나 웨타이드유사 지역에 결합될 수 있다. 또는 변형기는 LPL 치료제의 아미노산 잔기의 측쇄에, 또는 코어 도메인의 측면에 위치한 웨타이드나 웨타이드유사 지역에(예컨대, 라이실 잔기(들)의 엡실론 아미노기를 통해, 아스파르트산 잔기(들)이나 글루탐산 잔기(들)의 카르복실기를 통해, 티로실 잔기(들), 세린 잔기(들), 트레오닌 잔기(들) 또는 아미노산 측쇄의 기타 적당한 반응기의 히드록시기를 통해) 결합될 수 있다. 웨타이드 구조에 공유 결합된 변형기는 예를 들어, 아미드, 알킬아미노, 카바메이트 또는 요소 결합을 포함하는 화학적 구조에 연결되기 위해 당업계에 잘 알려진 수단과 방법을 사용해서 결합될 수 있다.

특정 구체예에서, 변형기는 시클릭, 헤테로시클릭 또는 폴리시클릭기를 포함할 수 있다. "시클릭기"라는 용어는, 본 명세서에 사용된 것처럼, 3 내지 10, 4 내지 8, 또는 5 내지 7 탄소 원자를 갖는 시클릭 포화 또는 불포화(즉, 방향족) 기를 포함한다. 대표적인 시클릭기는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실 및 시클로옥틸을 포함한다. 시클릭기는 하나 이상의 고리 위치가 치환될 수도 있고 치환되지 않을 수도 있다. 시클릭기는 예를 들어 할로겐, 알킬, 시클로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로사이클, 히드록실, 아미노, 니트로, 티올, 아민, 이민, 아마이드, 포스포네이트, 포스핀, 카르보닐, 카르복실, 실릴, 에테르, 티오에테르, 술포닐, 술포네이트, 셀레노에테르, 케톤, 알데히드, 에스테르,  $-CF_3$ ,  $-CN$ 으로 치환될 수 있다.

"헤테로시클릭기"라는 용어는 3 내지 10, 4 내지 8, 또는 5 내지 7 탄소 원자를 갖는 시클릭 포화, 불포화 및 방향족기를 포함하는데, 고리 구조는 약 1개 이상의 헤테로원자를 포함한다. 헤테로시클릭기는 피롤리딘, 옥솔란, 티올란, 이미다졸, 옥사졸, 피페리딘, 피페라진, 모르폴린을 포함한다. 헤테로시클릭 고리는 하나 이상의 위치에 예를 들어, 할로겐, 알킬, 시클로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 기타 헤�테로사이클, 히드록실, 아미노, 니트로, 티올, 아민, 이민, 아마이드, 포스포네이트, 포스핀, 카르보닐, 카르복실, 실릴, 에테르, 티오에테르, 술포닐, 술포네이트, 셀레노에테르, 케톤, 알데히드, 에스테르,  $CF_3$ ,  $CN$ 과 같은 치환기로 치환될 수 있다. 또한 헤�테로사이클은, 이하 기술하는 것처럼 다른 시클릭기에 브릿지되거나 접합될 수 있다.

본 명세서에서 사용된 "폴리시클릭기"이라는 용어는 2개 이상의 포화, 불포화 또는 방향족 시클릭 고리를 의미하는데, 그 고리는 2개 이상의 탄소가 2개의 접해 있는 고리에 공통으로 있어서 "융합(fused) 고리"라고 한다. 비인접 원자를 통해 연

결된 고리를 "브릿지(bridged)" 고리라고 칭한다. 폴리시클릭기의 각 고리는 상기한 치환기, 예를 들어 할로겐, 알킬, 시클로알킬, 알케닐, 알키닐, 히드록실, 아미노, 니트로, 티올, 아민, 이민, 아마이드, 포스포네이트, 포스핀, 카르보닐, 카르복실, 실릴, 에테르, 티오에테르, 술포닐, 셀레노에테르, 케톤, 알데하يد, 에스테르,  $-CF_3$ , 또는  $-CN$ 과 치환될 수 있다.

"알킬"이라는 용어는 직쇄형 알킬기, 분지쇄형 알킬기, 시클로알킬(알리시클릭)기, 알킬 치환 시클로알킬기 및 시클로알킬 치환 알킬기를 포함한 포화 지방족의 라디칼을 의미한다. 특정 구체예에서, 곧은 사슬 또는 가지 사슬 알킬은 백본에 20 개 이하의 탄소 원자(곧은 사슬에 대해  $C_1-C_{20}$ , 가지 사슬에 대해  $C_3-C_{20}$ )를 갖거나, 10 개 이하의 탄소 원자를 갖는다. 특정 구체예에서, 시클로알킬은 고리 구조에서 4~10개의 탄소 원자를 가질 수 있는데, 가령 5, 6 또는 7 탄소 고리이다. 탄소수가 달리 특정되지 않았다면, 본 출원에서 사용된 "저급 알킬"은 상기한 것처럼, 백본 구조에서 1 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알킬기를 의미한다. 마찬가지로, "저급 알케닐" 및 "저급 알키닐"은 10 개 이하의 탄소를 갖는 사슬 길이이다.

명세서와 청구항에서 사용된 "알킬"(또는 "저급 알킬")이라는 용어는 "비치환 알킬" 및 "치환 알킬"을 둘 다 포함하는데, 후자는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소에 수소를 대체하는 치환기를 갖는 알킬 부분을 의미한다. 이들 치환기는 예를 들어, 할로겐, 히드록실, 카르보닐(가령 카르복실, 케톤(알킬카르보닐 및 아릴카르보닐기 포함) 및 에스테르(알킬옥시카르보닐 및 아릴옥시카르보닐기 포함)), 티오카르보닐, 아실옥시, 알콕시, 포스포릴, 포스포네이트, 포스피네이트, 아미노, 아실아미노, 아미도, 아미딘, 이미노, 시아노, 니트로, 아지도, 술프히드릴, 알킬티오, 술페이트, 술포네이트, 술파모일, 술폰아미도, 헤테로사이클릴, 아랄킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 부분을 포함할 수 있다. 탄화수소 사슬에 치환된 부분은 적당하다면, 스스로 치환될 수 있다. 예를 들어, 치환된 알킬의 치환기는 아미노, 아지도, 이미노, 아미도, 포스포릴(포스포네이트 및 포스피네이트 포함), 술포닐(술페이트, 술폰아미도, 술파모일 및 술포네이트 포함) 및 실릴기 뿐만 아니라 에테르, 알킬티오, 카르보닐(케톤, 알데하يد, 카르복실레이트 및 에스테르 포함),  $-CF_3$ ,  $-CN$  등의 치환 형태 및 비치환 형태를 포함할 수 있다. 대표적인 치환 알킬을 이하 설명하였다. 시클로알킬은 알킬, 알케닐, 알콕시, 알킬티오, 아밀알킬, 카르보닐-치환 알킬,  $-CF_3$ ,  $-CN$ , 등으로 더 치환될 수 있다.

"알케닐" 및 "알키닐"이라는 용어는 길이가 유사하고 상기 서술한 알킬로 치환될 수 있는 불포화 지방족을 의미하나, 각각 적어도 하나의 이중 또는 삼중 결합을 함유한다.

"아랄킬"이라는 용어는, 본 명세서에 사용된 것처럼, 적어도 하나의 아릴기로 치환된 알킬 또는 알킬레닐기를 말한다. 대표적인 아랄킬은 벤질(즉, 페닐메틸), 2-나프틸에틸, 2-(2-파리딜)프로필, 5-디벤조수베릴, 등을 포함한다.

"알킬카르보닐"이라는 용어는, 본 명세서에 사용된 것처럼,  $-C(O)-$ 알킬을 의미한다. 유사하게, "아릴카르보닐"이라는 용어는  $-C(O)-$ 아릴을 의미한다. "알킬옥시카르보닐"이라는 용어는, 본 명세서에 사용된 것처럼,  $-C(O)-O-$ 알킬기를 의미하고 및 "아릴옥시카르보닐"이라는 용어는  $-C(O)-O-$ 아릴을 의미한다. "아실옥시"라는 용어는  $-O-C(O)-R_7$ 를 의미하고, 여기서  $R_7$ 은 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 아랄킬 또는 헤�테로사이클릴이다.

"아미노"라는 용어는, 본 명세서에 사용된 것처럼,  $-N(R_a)(R_\beta)$ 을 의미하는데, 여기서  $R_a$  및  $R_\beta$ 는 각각 독립적으로 수소, 알킬, 알킬레닐, 알키닐, 아랄킬, 아릴이거나,  $R_a$  및  $R_\beta$ 은 그들이 결합한 질소 원자와 함께 4~8개의 원자를 갖는 고리를 형성한다. 그러므로, "아미노"라는 용어는, 본 명세서에 사용된 것처럼, 비치환, 모노치환(예컨대, 모노알킬아미노 또는 모노아릴아미노) 및 디(di)치환(예컨대, 디알킬아미노 또는 알킬아릴아미노) 아미노기를 포함한다. "아미도"라는 용어는  $-C(O)-N(R_8)(R_9)$ 을 의미하는데, 여기서  $R_8$  및  $R_9$ 은 상기한 것과 같다. "아실아미노"라는 용어는  $-N(R'_8)C(O)-R_7$ 를 의미하는데, 여기서  $R_7$ 은 상기한 것과 같고  $R'_8$ 은 알킬이다.

본 명세서에 사용된 것처럼, "니트로"라는 용어는  $-NO_2$ 를 의미한다; "할로겐"이라는 용어는  $-F$ ,  $-Cl$ ,  $-Br$  또는  $-I$ 를 가리킨다; "술프히드릴"이라는 용어는  $-SH$ 를 의미하고; "히드록실"이라는 용어는  $-OH$ 를 의미한다.

본 명세서에서 사용된 "아릴"이라는 용어는 고리에서 0 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5-, 6- 및 7-원 방향족기s, 예를 들어, 페닐, 피롤릴, 푸릴, 티오페닐, 이미다졸릴, 옥사졸, 티아졸릴, 트리아졸릴, 피라졸릴, 피리딜, 피라지닐, 피리다지닐 및 피리미디닐, 등을 포함한다. 고리 구조에 헤�테로원자를 갖는 이들 아릴기는 "아릴 헤테로사이클" 또는 "헤테로방향족"라고 불릴 수도 있다. 방향족 고리는 하나 이상의 고리 위치에 상기한 치환기, 예를 들어 할로겐, 아지도, 알킬, 아랄킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 히드록실, 아미노, 니트로, 술프히드릴, 이미노, 아미도, 포스포네이트, 포스피네이트, 카르보닐,

카르복실, 실릴, 에테르, 알킬티오, 숤포닐, 숤폰아미도, 케톤, 알데히드, 에스테르, 헤테로사이클릴, 방향족 또는 헤테로방향족 부분,  $-CF_3$ ,  $-CN$ , 또는 기타로 치환될 수 있다. 아릴기는 폴리시클릭기의 일부가 될 수도 있다. 예를 들어, 아릴기는 가령 나프틸, 안트라세닐, 쿠놀릴, 인돌릴 등과 같은 융합 방향족 부분을 포함한다.

변형기로는 바이오티닐 구조, 플루오레세인-함유기, 디에틸렌-트리아민펜타아세틸기, (-)-멘톡시아세틸기, N-아세틸뉴라미닐기, 콜릴 구조 또는 이니오바이오티닐기를 함유하는 기를 들 수 있다. LPL 치료제는 당업계에 알려진 방법에 따라 카르복시 말단이 콜릴기로 변형될 수 있다(예를 들어 참조: Wess, G. 외. (1993) Tetrahedron Letters, 34:817-822); 콜릴 유도체 및 유사체는 Aic (3-(O-아미노에틸-이소)-콜릴)과 같은 변형기으로서도 사용될 수 있는데, 이는 LPL 치료제를 더 변형시키는 데 사용될 수 있는 유리 아미노기를 갖는다. 변형기는 "바이오티닐 구조"일 수 있는데, 이는 바이오티닐 기와 유사체 및 그의 유도체(가령 2-이미노바이오티닐기)를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 변형기는 가령 LPL 치료제 펩타이드를 5-(및 6-)-카르복시플루오레세인, 숙시니미딜 에스테르 또는 플루오레세인 이소티오시아네이트와 반응시킴으로써 추출된 기인 "플루오레세인-함유기"를 포함할 수 있다. 다른 다양한 구체예에서, 변형기(들)은 N-아세틸뉴라미닐기, 트랜스-4-코티닌카르복실기, 2-이미노-1-이미다졸리딘아세틸기, (S)-(-)-인돌린-2-카르복실기, (-)-멘톡시아세틸기, 2-노보네인아세틸기, 감마-옥소-5-아세나프텐부티릴, (-)-2-옥소-4-티아졸리딘카르복실기, 테트라히드로-3-퓨로일기, 2-이미노바이오티닐기, 디에틸렌트리아민펜타아세틸기, 4-모르폴린카르보닐기, 2-티오펜아세틸기 또는 2-티오펜술포닐기를 포함할 수 있다.

### LPL S447X 단백질의 변형

변형 LPL 폴리펩타이드는 LPL S447X 단백질과 실질적인 서열 유사성을 갖는, 가령 SEQ ID No.1의 상응하는 부분과 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는데, 그 상응하는 부분은 가령 10, 20, 30, 40, 50 또는 그 이상의 아미노산과 같으 어떠한 길이의 인접한 서열도 될 수 있다. 이들 단백질은 일반적으로 LPL 활성이나 또 다른 LPL-유사 특성을 가지고 있는데, 이는 LPL S447X 단백질과 같거나 그 이상이다. 특정 구체예에서, 화학적으로 유사한 아미노산은 LPL S447X 단백질 서열에서 아미노산으로 치환될 수 있다(보존적인 아미노산 치환을 제공하기 위해서). LPL 활성을 감소시키는 아미노산 치환은 50개 이상이 개시된 바 있는데, 가령 위치 291에서 Ser 잔기의 Asn로의 치환(Asn291Ser), 위치 9에서 Asn의 Asp로의 치환(Asp9Asn), 위치 188에서 Glu의 Gly로의 치환(Gly188Glu, Monsalve 외, J.Clin.Invest. 1990, 86(3):728-734 참조) 또는 Asp250Asn (Ma 외, Genomics. 1992, 13:649-653)은 바람직한 구체예에서 배제되어야 한다.

### LPL 치료제의 핵산 형태

또 다른 구체예에서, LPL 치료제는 야생형 LPL 단백질을 코딩하거나 LPL S447X 단백질을 코딩하는 핵산이다. 또 다른 구체예에서, 핵산은 SEQ ID NO:2의 뉴클레오티드 256 내지 1599와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 RNA를 코딩하는 DNA 코딩 서열을 포함할 수 있는데, 상기 뉴클레오티드 범위는 성숙 야생형 LPL 웨브타이드를 코딩하는 것이다.

또 다른 예에서, LPL 치료제는 엄격한 조건 하에서 SEQ ID NO:2의 뉴클레오티드 256 내지 1599와 하이브리다이즈하는 DNA 코딩 서열을 포함하는 핵산을 포함할 수 있다.

### 서열 동일성

2개의 핵산 또는 단백질 서열은 최적으로 정렬되었을 때 적어도 약 70% 서열 동일성을 갖는다면, 실질적으로 동일한 것으로 간주된다. 또 다른 구체예에서, 서열 동일성은 예를 들어 적어도 75%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 될 수 있다. 동일성의 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은 다양한 알고리즘을 사용하여 수행할 수 있는데, 알고리즘에는 가령 Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math 2: 482의 지역적 상동성 알고리즘, Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443의 상동성 정렬 알고리즘, Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444의 유사성 방법을 위한 검색 및 이들 알고리즘의 컴퓨터를 이용한 실행(가령 캡, BESTFIT, FASTA and TFASTA in the Wisconsin Genetics 소프트웨어 패키지, Genetics Computer Group, Madison, WI, U.S.A.)이 있다. 서열 정렬은 BLAST 알고리즘을 이용해서 역시 수행될 수 있는데, 이는 Altschul 외, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10에 기술되어 있다(출판된 디풀트 세팅 이용). BLAST 분석을 수행하는 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information를 통해 입수 가능하다(인터넷 사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>를 통해서). BLAST 알고리즘은 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어와 함께 정렬되었을 때 특정 양(positive)의 경계값(threshold) 점수 T를 매치하거나 만족시키는 질의(query) 서열에서 길이 W의 짧은 단어(word)를 동정함으로써 고득점 서열 쌍(HSPs)을 처음 동정하는 일을 수반한다. T는 인근 단어 점수 경계값을 의미한다. 최초 인근 단어 히트(hit)는 더 긴 HSPs를 찾는 데에 검색의 시작을 위한 씨앗으로서 역할을 한다. 단어 히트는

누적 정렬 점수가 증가되는 한, 각각의 서열을 따라 양쪽 방향으로 연장된다. 각각의 방향에서 단어 히트의 연장은 그 다음 파라미터를 만나면 정지된다: 누적 정렬 점수는 최고 달성을 부터 수량 X만큼 떨어진다; 누적 점수는 하나 이상의 음(negative) 득점 잔기 정렬의 축적으로 인해서 0 이하가 된다; 또는 어느 쪽의 서열의 끝에 도달한다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 정렬의 민감도 및 속도를 결정한다. BLAST 프로그램은 양쪽 가닥의 핵산 비교를 위해 디폴트 단어 길이(W)로서 11을, BLOSUM62 득점 행렬(Henikoff and Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919) 정렬(B)로서 50을, 기대값(E)으로서 10을(또 다른 구체예에서 1 또는 0.1 또는 0.01 또는 0.001 또는 0.0001로 변화할 수 있다; 비록 0.1보다 훨씬 높은 E값은 기능적으로 유사한 서열을 동정하지 않을 수 있지만, 0.1 내지 10의 E값을 유사성이 짧은 지역을 위해 히트를 낮은 중요도로 조사하는 것이 유용하다), M=5, N=4를 사용할 수 있다. 단백질 비교를 위해, BLASTP는 다음과 같은 디폴트와 함께 사용할 수 있다: G=11(캡을 여는 데에 소요); E=1(캡을 연장시키는 데에 소요); E=10(기대값, 본 세팅에서, 정의된 정렬 점수인 S와 같거나 나은 점수를 동반한 10 히트는 동일한 크기의 데이터 베이스에서 검색된 것으로서 우연히 일어날 것으로 기대된다; E값은 검색의 업격도를 변경하기 위하여 증가되거나 감소될 수 있다.); 및 W=3(단어 크기, BLASTN에 대하여 디폴트는 11, 다른 blast 프로그램에 대해서는 3).

BLOSUM 행렬은 정렬에서 각각의 위치에 대한 확률 점수를 배당하는데, 이는 관련 단백질 내 일치 블록 중에서 일어날 것으로 알려진 치환의 빈도에 기초한 것이다. BLOSUM62(캡 존재 값 = 11; 잔기 당 캡 값 = 1; 람다 비율 = 0.85) 치환 행렬은 BLAST 2.0에서 디폴트에 의해 사용된다. 다양한 기타 행렬들이 BLOSUM62의 대안으로서 사용될 수 있는데, 이는 PAM30 (9,1,0.87); PAM70 (10,1,0.87) BLOSUM80 (10,1,0.87); BLOSUM62 (11,1,0.82) 및 BLOSUM45 (14,2,0.87)을 포함한다. 두 서열 간 통계학적 유사성의 BLAST 알고리즘을 이용한 측정은 최소 합계 확률(P(N))인데, 이는 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 매치가 우연히 일어날 확률의 지표를 제공한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열은 서열의 비교에서 최소 합계 확률이 약 1보다 작으면, 바람직하게는 약 0.1보다 작으면, 더욱 바람직하게는 약 0.01보다 작으면, 그리고 가장 바람직하게는 약 0.001보다 작으면, 실질적으로 동일한 것으로 간주된다.

## 변형

펩타이드의 생물학적 기능을 실질적으로 변경함이 없이, 폴리펩타이드의 구조에서 특정 변형 및 변화를 만들어서 생물학적으로 동등한 폴리펩타이드를 얻을 수 있다는 것이 당업계에 잘 알려져 있다. 본 발명의 한 측면에서, LPL 치료제는 보존적 아미노산 치환에 의해 야생형 LPL 서열의 일부와 다른 웨프타이드를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 것처럼, "보존된 아미노산 치환"이라는 용어는 웨프타이드의 특정 위치에서 1개의 아미노산이 기능의 상실 없이 또 다른 것으로 치환되는 것을 의미한다. 그러한 변화를 일으키기는 데에는 예를 들어, 크기, 전하, 소수성, 친수성 등과 같은 측쇄 치환기의 상대적 유사성에 기초하여 유사 아미노산 잔기의 치환이 일어날 수 있고, 일상적 시험으로 웨프타이드의 기능에 대한 그러한 치환의 효과에 대해 분석할 수 있다.

특정 구체예에서, 보존된 아미노산 치환은 아미노산 잔기가, 유사한 친수성 값(예컨대, 2.0의 전후 값 내)을 갖는 다른 것으로 치환된 곳에서, 다음의 친수성 값이 아미노산 잔기에 배속되는 곳에서 일어날 수 있다(미국 특허 제 4,554,101호에 상술된, 본 출원에 참고 통합되었다): Arg (+ 3.0); Lys (+ 3.0); Asp (+ 3.0); Glu (+ 3.0); Ser (+ 0.3); Asn (+ 0.2); Gln (+ 0.2); Gly (0); Pro (-0.5); Thr (-0.4); Ala (-0.5); His (-0.5); Cys (-1.0); Met (-1.3); Val (-1.5); Leu (-1.8); Ile (-1.8); Tyr (-2.3); Phe (-2.5); 및 Trp (-3.4)).

또 다른 구체예에서, 보존된 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 수치요법 지표(hydripathic index)(예컨대, 2.0의 전후 값 내)를 가진 다른 것으로 치환된 곳에서 일어날 수 있다. 그러한 구체예에서, 각각의 아미노산 잔기는 그의 소수성 및 전하 특성에 기초하여 다음과 같이 수치요법 지표가 배당될 수 있다: Ile (+ 4.5); Val (+ 4.2); Leu (+ 3.8); Phe (+ 2.8); Cys (+ 2.5); Met (+ 1.9); Ala (+ 1.8); Gly (-0.4); Thr (-0.7); Ser (-0.8); Trp (-0.9); Tyr (-1.3); Pro (-1.6); His (-3.2); Glu (-3.5); Gln (-3.5); Asp (-3.5); Asn (-3.5); Lys (-3.9); 및 Arg (-4.5)).

또 다른 구체예에서, 보존된 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 동일한 클래스에서 다른 것으로 치환된 곳에서, 아미노산이 다음과 같이 무극성, 산성, 염기성 및 중성 클래스로 나뉘어진 곳에서 만들어질 수 있다: 무극성: Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, Met; 산성: Asp, Glu; 염기성: Lys, Arg, His; 중성: Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr.

## 유전자 치료

본 발명의 하나의 구체예에서, LPL 치료제는 유전자 치료 벡터로 대상자에 투여된다. 벡터는 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 헤르페스 바이러스(HSV), 렌티바이러스 및 레트로바이러스를 포함한 다른 타입의 바이러스로부터 제조할 수 있다. 하나의 구체예에서, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 및 AAV8로 이루어진 그룹으로부터 선택된 AAV 혈청형을 사용하였다.

가장 적당한 바이러스 또는 바이러스 아형을 선택하는 것은 본 발명이 속하는 분야의 당업자의 공지 기술 범위에 속한다. 어떤 타입의 조직에는 특정 아형이 다른 것보다 더 적당할 수도 있다. 예를 들어, LPL의 근육-특정 과발현은 근육 세포의 아데노-연관 바이러스(AAV)-매개 형질도입에 의해 유용하게 유도될 수 있다. 근육은 AAV-매개 형질도입을 받아들일 수 있고, 다른 혈청형이 사용될 수 있다(AAV1, AAV6, AAV7, AAV8). 근육의 형질도입은 복합 부위에 AAV-LPL를 근육내 주입함으로써 이루어질 수 있다. 국소적인 바이러스 투여량을 낮게 유지하는 복합 부위는 LPL-유도 근육병증 또는 벡터 유도 면역 반응을 막는 데에 도움을 줄 것이다. 이는 장기간 동안 혈청형 1을 사용한 근육의 형질도입에 효과적인 방법이 되어 왔으나, 다른 혈청형을 사용한 정맥내 투여도 역시 적용 가능하다(AAV6, AAV8).

유전자 치료의 일반적 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, Anderson 등의 미국 특허 제 5,399,346호(본 출원에 참고 통합되어 있다)를 참조하라. 유전 물질을 전달하기 위한 생체적 합성 캡슐은 Baetge 외의 PCT 공개 공보 제 WO 95/05452호에 기술되어 있다. 조혈 세포 내로 유전자 전달 방법도 이전에 보고된 바 있다(Clapp, D. W. 등, Blood 78: 1132-1139 (1991); Anderson, Science 288:627-9 (2000); 및 Cavazzana-Calvo 등, Science 288:669-72 (2000)를 참조, 이는 모두 본 출원에 참고 통합되어 있다).

### 유효량

본 발명에 따른 치료에서, 비알코올성 지방 간염은 유효량의 LPL 치료제를 대상에게 투여함으로써 치료한다. 본 명세서에 사용된 것처럼, 비알코올성 지방 간염은 간에서의 조직학적 변화의 발달을 의미하는데, 이는 과도한 알코올 섭취에 의해 유도되는 것에 비견되나, 알코올 남용은 없을 때이다.

LPL 치료제는 일반적으로 약학적 운반체, 희석제 및/또는 보조제와 임의로 조합한 약학적 조성물에 포함된다. 그러한 조성물에는 소망되는 치료제나 예방 효과를 제공하기에 충분한, 유효량의 LPL 치료제, 약학적으로 허용 가능한 운반체 또는 부형제가 포함된다. "유효량"은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량을 포함한다.

"치료적 유효량"은 투여량과 필요한 시간 주기에서, 가령 LPL 활성의 상승, HDL-콜레스테롤의 상승 또는 트리글리세리드 래벨 감소와 같은 지질 대사에서의 파라미터 변경과 같은 소망하는 치료 결과를 얻기 위한 유효량을 의미한다. LPL 치료제의 치료적 유효량은 개인의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중과 개인의 원하는 반응을 이끌어 내는 LPL 치료제의 능력과 같은 요소들에 따라 달라질 수 있다. 투여량 처방은 최적의 치료 반응을 제공하기 위해서 조절될 수 있다. 또한 치료적 유효량은 일반적으로 LPL 치료제의 치료적 유익한 효과가 유독하거나 해로운 효과를 능가하는 것이다.

"예방적 유효량"은 필요한 투여량으로 필요한 기간 동안, 소망하는 예방적 결과, 가령 LPL 반응 질환을 포함한 다양한 질환을 예방하거나 방지하는 것, 가령 심장동맥성 심질환, 심혈관 질환, 심장 동맥 질환, 고트리글리세리드 및/또는 저 HDL 을 얻는데 효과적인 양을 의미한다. 예방적 투여량은 질병의 초기 단계와 그 이전에 대상자에게 사용될 수 있고, 특정 경우에는 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 많거나 적을 수 있다.

특정 구체예에서, LPL 치료제의 치료적 또는 예방적 유효량의 범위는 0.01 nM-0.1M, 0.1 nM-0.1M, 0.1 nM-0.05M, 0.05 nM-15 $\mu$ M 또는 0.01 nM-10 $\mu$ M 일 수 있다. 투여량 수치는 경감시킬 질환의 심각성에 따라 달라질 수 있다는 것을 주의해야 한다. 어떤 특정 대상에 대해서든, 특수 투여량 처방은 시간이 지나면서 개인적 필요와 조성물의 투여를 관리하거나 감독하는 사람의 전문적인 판단에 따라서 조절될 수 있다. 본 명세서에 설명된 투여량 범위는 모범 예일 뿐이지 투여량 범위를 한정하는 것이 아니며, 의사에 의해 선택될 수 있다.

유전자 치료 벡터를 위해, 투여되는 투여량은 주로 치료받는 대상의 조건과 크기, 치료 조성물, 치료의 빈도 및 투여 경로에 의존한다. 치료를 계속하기 위한 투여량, 조성물 및 빈도를 포함한 처방계획은 초기 반응 및 의료적 판단에 의해 좌우될 수 있다. 특정 투여에서 분무제 조성물의 흡입과 같은 기타 비경구 경로가 필요할 수도 있지만, 조직의 세포간 공간에 주입하는 비경구 경로가 바람직하다. 특정 프로토콜에서, 수성 운반체에서 유전자 및 유전자 전달계를 포함하는 조성물은 적당량으로 조직에 주입된다. 목적 조직은 예를 들어 근육 또는 간 조직과 같이 특정적일 수도 있고, 예를 들어 근육 및 간 조직과 같이 몇 개의 조직의 조합일 수도 있다. 대표적인 목적 조직에는 간, 골격근, 심장 근육, 지방질 저장소, 신장, 폐, 맥관내피, 상피 및/또는 조혈 세포가 포함된다.

하나의 구체예에서, 작은 동물(마우스)의 유효 투여량 범위는, 근육내 주입 후에,  $1 \times 10^{12}$  내지  $1 \times 10^{13}$  게놈 copy (gc)/kg이고, 큰 동물(고양이) 및 possibly 인간 대상자에게는,  $1 \times 10^{11}$  내지  $1 \times 10^{12}$  gc/kg이다. 다시 마우스에서, 형질전환 유전자 발현의 레벨은, 포스트-헤파린 혈장에서 LPL에 의해 측정된 것처럼, 300 ng/ml(DaiNippon에서 시판된 ELISA를 이용하여 측정)에 달하고, 발현은 1회 투여 이후 장기간(>1년)이다.

본 발명의 조성물에서 활성 화합물의 양은 가령 개인의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 요소들에 따라서 달라진다. 투여량 처방은 최적의 치료 반응을 제공하기 위해서 조절될 수 있다. 예를 들어, 단일의 거환이 투여될 수도 있고, 몇 개로 나뉘어진 투여량이 시간이 지남에 따라 투여될 수도 있고, 또는 투여량은 치료제 상태의 요구에 의해 나타난 것처럼 부분적으로 감소되거나 증가할 수도 있다. 투여의 편의성과 투여량의 균일성을 위해서 비경구적 조성물을 단위 투여 제형으로 제조하는 것이 유리하다. 본 명세서에서 사용되는 "단위 투여 제형"은 치료할 대상자를 위한 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미한다; 미리 예정된 양의 활성 화합물을 함유하는 각 단위는 필요한 약학적 운반체와 결합하여 원하는 치료 효과를 내기 위해 계산된다. 본 발명의 단위 투여 제형을 위한 상술은 활성 화합물의 독특한 특성과 획득할 특정 치료 효과에 의해, 그리고 개인의 증상의 치료를 위한 이러한 활성 화합물을 혼합하는 기술에 내재한 한계에 의해 지시될 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 것처럼 "약학적으로 허용 가능한 운반체" 또는 "부형제"는 생리학적으로 친화적인 모든 용매, 분산매, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장액 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 하나의 구체예에서, 운반체는 비경구적 투여에 적당한 것인데, 정맥내, 복막내 또는 근육내 투여를 포함한다. 또는 운반체는 혀밀 투여 또는 경구 투여에 적당할 수도 있다. 약학적으로 허용 가능한 운반체는 무균 주사 가능한 용액 또는 분산의 임시 제조를 위한 무균 수성 용액 또는 분산 및 무균 분말을 포함한다. 약학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 용도는 당업계에 잘 알려져 있다. 모든 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 부조화된다는 점을 제외하고, 약학적 본 발명의 조성물에서의 그의 용도는 고려된다.

보충적 활성 화합물도 본 발명의 약학적 조성물에 통합될 수 있다. 추가적 치료제의 동시투여에 대한 안내는 예를 들어 캐나다 약사 협회(Canadian Pharmacists Association)의 Compendium of Pharmaceutical and Specialties(CPS)에서 찾을 수 있다.

일반적으로 약학적 조성물은 제조와 보관 조건 하에서 무균이고 안정하다. 약학적 조성물은 높은 약물 농도를 수용하는 데에 적당한 용액, 마이크로에멀젼, 리포솜 또는 기타 순서의 구조로서 제조될 수 있다. 운반체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜, 등) 및 그의 적당한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질이 될 수 있다. 적당한 유동성이 유지될 수 있는데, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅제를 이용함으로써, 분산의 경우 원하는 입도를 유지함으로써, 그리고 표면활성제를 이용함으로써 가능하다. 많은 경우에, 조성물에 등장제(등장액 제제), 예를 들어, 당, 만니톨, 소르비톨과 같은 폴리알코올, 또는 염화 나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주사 가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함함으로써 달성될 수 있다. LPL 치료제는 시간 또는 조절 방출형 제제로서 투여될 수 있다. 즉, 예컨대, 임플란트와 미세피막 전달계를 비롯하여, 화합물을 급속히 방출하는 것으로부터 보호해주는, 서방형 폴리머 또는 기타 운반체를 포함하는 조성물로서 투여될 수 있다. 예를 들어, 생물분해성, 생체적합성 폴리머, 가령 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락티, 폴리글리콜릭 코폴리머(PLG)가 사용될 수 있다. 그러한 조성물의 많은 제조 방법은 특히되었고 당업자에게 일반적으로 알려져 있다.

## 실시예

### 실시예 1 LPL 유전자 치료는 트리글리세리드 재분배를 야기한다

본 실시예에서는 수컷인 APOE3-라이덴 형질전환 마우스에 있어서, 식이 유발형(diet-induced) 고지혈증에 미치는 LPL S447X를 갖는 AAV1의 형질전환 유전자로서의 효과를 연구하였다. 본 목적을 위해서 본 발명자들은 6 마리의 마우스에  $1 \times 10^{13}$  gc's/kg AAV1-LPL S447X를, 6 마리의 마우스에 PBS(근육내; 4 부위)를 주입하였다. 1주 후에 상기 마우스들에 웨스턴 타입 다이어트(Western type diet)를 시작하였다. 다이어트를 시작한 지 28주 후에, 마우스들을 죽였다.

결과에 따르면, LPL 유전자 치료를 받은 마우스는 포스트-헤파린 LPL 농도가 주입 25주 후에 300 ng/ml까지 점차 증가하였으나, 총 포스트-헤파린 리파제 활성은 두드러지게 변화하지 않았다. 게다가, 4시간 단식 후 혈장 TG, HDL-c 및 TC에 대한 효과는 감지되지 않았다. 지질단백 농도를 순환시키는 효과는 없음에도 불구하고, Intralipid 거환을 정맥 내로 투여한 후에 처치된 마우스는 TG 및 FFA가 빨리 제거되는 점에서, LPL 유전자 치료는 효과적인 것으로 입증되었다

( $p<0.05$ ). 다른 의미있는 발견은 대조군에 비해서 AAV1-LPL S447X를 쳐치한 동물이 체중 증가가 현저히 감소되었다는 것을 포함하는데( $p<0.05$ ), 이는 복부의 지방 덩어리의 차이에 기인한 것은 아닌 효과이다. AAV1-S447X 쳐치된 마우스는 대조군에 비해서, 근육 균질물은 트리글리세리드 양이 현저히 증가된 것으로 나타난 반면( $p<0.05$ ), 간 균질물은 트리글리세리드 양이 현저히 감소된 것으로 나타났다( $p<0.05$ ).

본 실시예는 지질 금식에 효과가 없는 경우, 마우스 골격근에서의 인간 LPL의 발현은 트리글리세리드의 재분배 및 체중 증가의 감소를 유도한다는 것을 증명한다.

[표 1]

AAV1-LPLS447X 주입 후에 인간 LPL 농도 포스트 혈액 헤파린 혈장				
	0주	1주	11주	25주
평균(ng/ml)	0	107	187	293
표준 편차	0	42	59	250

[표 2]

피크 트리글리세리드의 지방 내성 시험, 인트라 리피드 주입 후의 % 부피					
인트라 리피드 주입 후 시간 (분)	평균 PBS 그룹	표준 편차	평균 AAV1-LPL	표준 편차	P (T-검정)
<3	100.0	0.0	100.0	0.0	
30	40.7	13.1	21.2	4.7	<0.05
60	9.3	5.3	5.1	2.3	
120	3.6	1.1	2.5	0.9	

[표 3]

피크 유리 지방산의 지방 내성 시험, 인트라 리피드 주입 후의 % 부피					
인트라 리피드 주입 후 시간 (분)	평균 PBS 그룹	표준 편차	평균 AAV1-LPL	표준 편차	P (T-검정)
<3	100.0	0.0	100.0	0.0	
30	56.9	13.7	33.8	6.4	<0.05
60	14.0	5.9	12.8	4.6	
120	9.3	2.8	11.5	3.1	

### 도면의 간단한 설명

도 1: 본 발명에 따른 LPL 치료제의 일 구체예의 단백질 서열, 즉 S447X 단백질.

도 2: LPL mRNA 서열. 뉴클레오티드 256 내지 1599는 성숙한 야생형 LPL 웹타이드를 코딩한다.

도면

## 도면1

Ala Asp Gln Arg Arg Asp Phe Ile Asp Ile Glu Ser Lys Phe Ala Leu  
 1 5 10 15

Arg Thr Pro Glu Asp Thr Ala Glu Asp Thr Cys His Leu Ile Pro Gly  
 20 25 30

Val Ala Glu Ser Val Ala Thr Cys His Phe Asn His Ser Ser Lys Thr  
 35 40 45

Phe Met Val Ile His Gly Trp Thr Val Thr Gly Met Tyr Glu Ser Trp  
 50 55 60

Val Pro Lys Leu Val Ala Ala Leu Tyr Lys Arg Glu Pro Asp Ser Asn  
 65 70 75 80

Val Ile Val Val Asp Trp Leu Ser Arg Ala Gln Glu His Tyr Pro Val  
 85 90 95

Ser Ala Gly Tyr Thr Lys Leu Val Gly Gln Asp Val Ala Arg Phe Ile  
 100 105 110

Asn Trp Met Glu Glu Glu Phe Asn Tyr Pro Leu Asp Asn Val His Leu  
 115 120 125

Leu Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Ala Ala Gly Ile Ala Gly Ser Leu  
 130 135 140

Thr Asn Lys Lys Val Asn Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro  
 145 150 155 160

Asn Phe Glu Tyr Ala Glu Ala Pro Ser Arg Leu Ser Pro Asp Asp Ala  
 165 170 175

Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Phe Thr Arg Gly Ser Pro Gly Arg  
 180 185 190

Ser Ile Gly Ile Gln Lys Pro Val Gly His Val Asp Ile Tyr Pro Asn  
 195 200 205

Gly Gly Thr Phe Gln Pro Gly Cys Asn Ile Gly Glu Ala Ile Arg Val  
 210 215 220

## 도면2

Ile Ala Glu Arg Gly Leu Gly Asp Val Asp Gln Leu Val Lys Cys Ser  
 225                    230                    235                    240

His Glu Arg Ser Ile His Leu Phe Ile Asp Ser Leu Leu Asn Glu Glu  
 245                    250                    255

Asn Pro Ser Lys Ala Tyr Arg Cys Ser Ser Lys Glu Ala Phe Glu Lys  
 260                    265                    270

Gly Leu Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Asn Leu Gly Tyr  
 275                    280                    285

Glu Ile Asn Lys Val Arg Ala Lys Arg Ser Ser Lys Met Tyr Leu Lys  
 290                    295                    300

Thr Arg Ser Gln Met Pro Tyr Lys Val Phe His Tyr Gln Val Lys Ile  
 305                    310                    315                    320

His Phe Ser Gly Thr Glu Ser Glu Thr His Thr Asn Gln Ala Phe Glu  
 325                    330                    335

Ile Ser Leu Tyr Gly Thr Val Ala Glu Ser Glu Asn Ile Pro Phe Thr  
 340                    345                    350

Leu Pro Glu Val Ser Thr Asn Lys Thr Tyr Ser Phe Leu Ile Tyr Thr  
 355                    360                    365

Glu Val Asp Ile Gly Glu Leu Leu Met Leu Lys Leu Lys Trp Lys Ser  
 370                    375                    380

Asp Ser Tyr Phe Ser Trp Ser Asp Trp Trp Ser Ser Pro Gly Phe Ala  
 385                    390                    395                    400

Ile Gln Lys Ile Arg Val Lys Ala Gly Glu Thr Gln Lys Lys Val Ile  
 405                    410                    415

Phe Cys Ser Arg Glu Lys Val Ser His Leu Gln Lys Gly Lys Ala Pro  
 420                    425                    430

Ala Val Phe Val Lys Cys His Asp Lys Ser Leu Asn Lys Lys  
 435                    440                    445

## 도면2a

ccccctcttcc	tcctcctcaa	gggaaagctg	cccacttcta	gctgccctgc	catccccttt	60
aaaggggcgac	ttgctcagcg	ccaaaccgcg	gctccagccc	tctccagcct	ccggctcagc	120
cggctcatca	gtcggtccgc	gccttgagc	tcctccagag	ggacgcgccc	cgagatggag	180
agcaaagccc	tgctcgtgct	gactctggcc	gtgtggctcc	agagtctgac	cgcccccgc	240
ggaggggtgg	ccgcccggga	ccaaagaaga	gattttatcg	acatcgaaag	taaatttgc	300
ctaaggaccc	ctgaagacac	agctgaggac	acttgcacc	tcattcccg	agtagcagag	360
tccgtggcta	cctgtcattt	caatcacagc	agcaaaaacct	tcatggtgat	ccatggctgg	420
acggtaacag	gaatgtatga	gagttgggtg	caaaaacttg	tggccggccct	gtacaagaga	480
gaaccagact	ccaatgtcat	tgtggtgac	tggctgtcac	gggctcagga	gcattacc	540
gtgtcccg	gctacaccaa	actggggaa	caggatgtgg	cccggttat	caactggatg	600
gaggaggagt	ttaactaccc	tctggacaat	gttccatctct	tgggatacag	ccttggagcc	660
catgtgctg	gcattgcagg	aagtctgacc	aataagaaag	tcaacagaat	tactggcctc	720
gatccagctg	gacctaactt	tgagttatgca	gaagccccga	gtcgcttttc	tcctgatgat	780
gcagattttg	tagacgtctt	acacacattc	accagagggt	ccccctggcg	aagcattgga	840
atccagaaac	cagttggca	tgttgacatt	tacccgaatg	gaggtacttt	tcagccagga	900
tgtaaatttg	gagaagctat	ccgcgtgatt	gcagagagag	gacttggaga	tgtggaccag	960
ctagtgaagt	gctcccacga	gcgcctccatt	catctttca	tgcactctct	gttgaatgaa	1020
gaaaatccaa	gtaaggccta	caggtgcagt	tccaaggaaag	cctttgagaa	agggctctgc	1080
ttgagttgta	gaaagaaccg	ctgcaacaat	ctgggctatg	agatcaataa	agtcagagcc	1140
aaaagaagca	gaaaaatgt	cctgaagact	cgttctcaga	tgcctacaa	agtcttccat	1200
taccaagtaa	agattcattt	ttctggact	gagagtgaaa	cccatacaa	tcaggcctt	1260
gagatttctc	tgtatggcac	cgtggccgag	agtgagaaca	tcccattcac	tctgcctgaa	1320
gtttccacaa	ataagaccta	ctccctccta	atttacacag	aggttagatat	tggagaacta	1380
ctcatgtga	agctcaaattg	gaagagtgtat	tcatacttta	gctggtcaga	ctgggtggagc	1440
agtcccggct	tcgcattca	gaagatcaga	gtaaaaggcag	gagagactca	aaaaaagg	1500
atcttctgtt	ctagggagaa	agtgtctcat	ttgcagaaag	gaaaggcacc	tgcggattt	1560
gtgaaatgcc	atgacaagtc	tctgaataag	aagtccaggct	gaaactggc	gaatctacag	1620

## 도면2b

aacaaaagaac ggcatgtgaa ttctgtgaag aatgaagtgg aggaagtaac ttttacaaa	1680
catacccaagt gtttgggtg tttcaaaaagt ggattttcct gaatattaat cccagcccta	1740
cccttgcgtt tag ttattttagg agacagtctc aagcaactaa aagtggctaa ttcaatttat	1800
ggggatagt ggc当地at cacatccccc aacgtaaaaa gacagtggat catgaaaagt	1860
gctgtttgt ctcttgagaa agaaataatt gtttgcgc agagtaaat aaggctcctt	1920
catgtggcgt attggccat agcataat tggttagaac ctccatattt aattggattt	1980
ctggatctt cggactgagg ctttcataa cttaactcta agtctccaag aatacagaaa	2040
atgctttcc gggcacgaa tcagactcat ctacacagca gatgaatga tgtttagaa	2100
tgtttccctc ttgttatgg aatgtggcc agacgtcaac caggaacatg taacttggag	2160
agggacgaa aaagggtctg ataaacacag aggtttaaa cagtcctac cattggcctg	2220
catcatgaca aagtacaaa ttcaaggaga tataaaatct agatcaatta attcttaata	2280
ggctttatcg ttattgtct aatcccttc tccccctct ttttgtctc aagattat	2340
tataataatg ttctctgggt aggtgtgaa aatgacgtc tagtcacata	2400
atttgaatgg tgcagaaaaa aaaaagatac cgtaattttt tattagatt ctccaaatga	2460
ttttcatcaa tttaaaatca ttcaatatct gacagttact cttagttt aggcttac	2520
tggtcatgct tcagttgtac ttccagtgcg tctctttgt tctggctt gacatgaaa	2580
gataggtttg agtccaaatt ttgcattgtg tgagcttcta cagattttag acaaggaccg	2640
ttttactaa gtaaaagggt ggagagggtc ctggggtgaa ttcttaagca gtgttgtaa	2700
accatcgct gcaatgagcc agatggagta ccatgagggt tgttattgt tgttttaa	2760
aactaatcaa gagtgagtga acaactatattt ataaactaga tctcctatattt ttcaaatgc	2820
tcttcacgt ataaatatga aatgataaag atgtcaaata tctcagaggc tatactggg	2880
aacccgactg tgaaagtatg tgatatctga acacatacta gaaagctctg catgtgttt	2940
gtccttcacg ataattcgaa agggaaaaaca gtcgatcaag ggatgtattt gaacatgtcg	3000
gagtagaaat tgccctgtat gtgcagaac ttgcaccctt tctctgagag agatgatcgt	3060
gcctataat agtaggacca atgtgtat taacatcata aggctggaa tgaattctct	3120
ctaaaaataa aatgatgtat gattgtgt tggcatcccc tttattaatt cattaaattt	3180
ctggatttgg gttgtgaccc aggtgtcatt aactaaaaag attactaaa gcacacata	3240
gcactggaa ctctggctcc gaaaaacttt gtatataata tcaaggatgt tctggctta	3300
cattttattt attagctgtt aatacatgtg tggatgtgtt aatggagctt gtacatattt	3360

## 도면2c

gaaaggtcat tgggttata tgcattata aatgtgtggt gctaactgtt tgggttttta	3420
tcagtgtgg tctcacagag ccaactcaact ctatgaaat gggcttaac aaaaacaagaa	3480
agaaacgtac ttaactgtgtt gaagaaatgg aatcagctttt taataaaattt gacaacattt	3540
tattaccac	3549

## 서열목록

<110> ACADEMISCH ZIEKENHUIS BIJ DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM  
AMSTERDAM MOLECULAR THERAPEUTICS B.V.

<120> NOVEL COMPOUNDS FOR TREATMENT OF NONALCOHOLIC STEATOTIC HEPATITIS

<130> KP-CH-067184

<150> US 60/580,903

<151> 2004-06-21

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 446

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Asp Gln Arg Arg Asp Phe Ile Asp Ile Glu Ser Lys Phe Ala Leu  
1 5 10 15

Arg Thr Pro Glu Asp Thr Ala Glu Asp Thr Cys His Leu Ile Pro Gly  
20 25 30

Val Ala Glu Ser Val Ala Thr Cys His Phe Asn His Ser Ser Lys Thr  
35 40 45

Phe Met Val Ile His Gly Trp Thr Val Thr Gly Met Tyr Glu Ser Trp  
50 55 60

Val Pro Lys Leu Val Ala Ala Leu Tyr Lys Arg Glu Pro Asp Ser Asn  
65 70 75 80

Val Ile Val Val Asp Trp Leu Ser Arg Ala Gln Glu His Tyr Pro Val  
85 90 95

Ser Ala Gly Tyr Thr Lys Leu Val Gly Gln Asp Val Ala Arg Phe Ile  
100 105 110

Asn Trp Met Glu Glu Glu Phe Asn Tyr Pro Leu Asp Asn Val His Leu  
115 120 125

Leu Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Ala Ala Gly Ile Ala Gly Ser Leu  
130 135 140

Thr Asn Lys Lys Val Asn Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro  
145 150 155 160

Asn Phe Glu Tyr Ala Glu Ala Pro Ser Arg Leu Ser Pro Asp Asp Ala  
165 170 175

Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Phe Thr Arg Gly Ser Pro Gly Arg  
180 185 190

Ser Ile Gly Ile Gln Lys Pro Val Gly His Val Asp Ile Tyr Pro Asn  
 195 200 205  
 Gly Gly Thr Phe Gln Pro Gly Cys Asn Ile Gly Glu Ala Ile Arg Val  
 210 215 220  
 Ile Ala Glu Arg Gly Leu Gly Asp Val Asp Gln Leu Val Lys Cys Ser  
 225 230 235 240  
 His Glu Arg Ser Ile His Leu Phe Ile Asp Ser Leu Leu Asn Glu Glu  
 245 250 255  
 Asn Pro Ser Lys Ala Tyr Arg Cys Ser Ser Lys Glu Ala Phe Glu Lys  
 260 265 270  
 Gly Leu Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Asn Leu Gly Tyr  
 275 280 285  
 Glu Ile Asn Lys Val Arg Ala Lys Arg Ser Ser Lys Met Tyr Leu Lys  
 290 295 300  
 Thr Arg Ser Gln Met Pro Tyr Lys Val Phe His Tyr Gln Val Lys Ile  
 305 310 315 320  
 His Phe Ser Gly Thr Glu Ser Glu Thr His Thr Asn Gln Ala Phe Glu  
 325 330 335  
 Ile Ser Leu Tyr Gly Thr Val Ala Glu Ser Glu Asn Ile Pro Phe Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Glu Val Ser Thr Asn Lys Thr Tyr Ser Phe Leu Ile Tyr Thr  
 355 360 365  
 Glu Val Asp Ile Gly Glu Leu Leu Met Leu Lys Leu Lys Trp Lys Ser  
 370 375 380  
 Asp Ser Tyr Phe Ser Trp Ser Asp Trp Trp Ser Ser Pro Gly Phe Ala  
 385 390 395 400  
 Ile Gln Lys Ile Arg Val Lys Ala Gly Glu Thr Gln Lys Lys Val Ile  
 405 410 415  
 Phe Cys Ser Arg Glu Lys Val Ser His Leu Gln Lys Gly Lys Ala Pro  
 420 425 430  
 Ala Val Phe Val Lys Cys His Asp Lys Ser Leu Asn Lys Lys  
 435 440 445

<210> 2  
<211> 3549  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 2	
ccccctttcc tcctcctcaa gggaaagctg cccacttcta gctgccctgc catcccctt	60
aaaggcgac ttgctcagcg ccaaaccgcg gctccagccc tctccagcct ccggctcagc	120
cggctcatca gtcggtccgc gccttgcagc tcctccagag ggacgcgccc cgagatggag	180
agcaaagccc tgctcgtgct gactctggcc gtgtggctcc agagtctgac cgccctccgc	240
gaggggtgg ccgcccggc ccaaagaaga gatttatcg acatcgaaag taaatttgcc	300
ctaaggaccc ctgaagacac agctgaggac acttgccacc tcattccgg agtagcagag	360
tccgtggcta cctgtcattt caatcacagc agcaaaacct tcatggtgat ccatggctgg	420
acggttaacag gaatgtatga gagttgggtg ccaaaacttg tggccgcct gtacaagaga	480
gaaccagact ccaatgtcat tgtggtgac tggctgtcac gggctcagga gcattaccca	540
gtgtccgcgg gctacaccaa actgggtggc caggatgtgg cccgggttat caactggatg	600
gaggaggagt ttaactaccc tctggacaat gtccatctct tgggatacag cttggagcc	660
catgctgctg gcattgcagg aagtctgacc aataagaaag tcaacagaat tactggcctc	720
gatccagctg gacctaactt tgagtatgca gaagcccgaa gtcgttttc tcctgatgat	780
gcagattttg tagacgtctt acacacattc accagagggc cccctggtcg aagcattgga	840
atccagaaac cagttggca tggacatt taccgaatg gaggtacttt tcagccagga	900
tgtaacattt gagaagctat ccgcgtgatt gcagagagag gacttggaga tgtggaccag	960
ctagtgaagt gctcccacga gcgctccatt catctttca tcgactctct gttaatgaa	1020
gaaaatccaa gtaaggccta caggtgcagt tccaaggaag ccttgagaa aggctctgc	1080
ttgagttgta gaaagaaccg ctgcaacaat ctggctatg agatcaataa agtcagagcc	1140
aaaagaagca gcaaaatgta cctgaagact cgttctcaga tgccctacaa agtcttccat	1200
taccaagtaa agattcattt ttctggact gagagtgaaa cccataccaa tcaggccttt	1260
gagatttctc tgtatggcac cgtggccgag agtgagaaca tcccattcac tctgcctgaa	1320
gtttccacaa ataagaccta ctccttccta attcacag aggttagatat tggagaacta	1380

ctcatgttga agctcaaatg gaagagtatc tcatactta gctggtcaga ctggggaggc	1440
agtcccggt tcgccattca gaagatcaga gtaaaagcag gagagactca gaaaaagggtg	1500
atcttctgtt ctagggagaa agtgtctcat ttgcagaaag gaaaggcacc tgcggtatTT	1560
gtgaaatgcc atgacaagtc tctgaataag aagtcaggct gaaaactggc gaatctacag	1620
aacaaagaac ggcatgtgaa ttctgtgaag aatgaagtgg aggaagtaac ttttacaaaa	1680
catacccagt gtttggggtg tttcaaaagt ggattttcct gaatattaat cccagcccta	1740
cccttgttag ttattttagg agacagtctc aagcactaaa aagtggctaa ttcaatttat	1800
ggggtatagt ggccaaatag cacatcctcc aacgtaaaaa gacagtggat catgaaaagt	1860
gctgtttgt ccttgagaa agaaataatt gtttgagcgc agagtaaat aaggctcctt	1920
catgtggcgt attgggcccatt agcctataat tggttagaac ctcctatTT aattggaaatt	1980
ctggatctt cggactgagg ctttctcaaa cttaactcta agtctccaag aatacagaaa	2040
atgctttcc gcggcacgaa tcagactcat ctacacagca gtatgaatga tgtttagaa	2100
tgattccctc ttgctattgg aatgtggtcc agacgtcaac caggaacatg taacttggag	2160
agggacgaag aaagggtctg ataaacacag aggtttaaa cagtcctac catggcctg	2220
catcatgaca aagttacaaa ttcaaggaga tataaaatct agatcaatta attcttaata	2280
ggctttatcg tttattgctt aatccctctc tcccccttct tttttgtctc aagatttat	2340
tataataatg ttctctgggt aggtgttgaa aatgagcctg taatcctcag ctgacacata	2400
atttgaatgg tgcagaaaaa aaaaagatac cgtaattta ttattagatt ctccaaatga	2460
ttttcatcaa tttaaaatca ttcaatatct gacagttact cttcagttt aggcttacct	2520
tggtcatgct tcagttgtac ttccagtgcg tctctttgt tcctggctt gacatgaaaa	2580
gataggtttg agttcaaatt ttgcatttg tgagcttcta cagattttag acaaggaccg	2640
tttttactaa gtaaaagggt ggagaggttc ctggggtgga ttcctaagca gtgttggtaa	2700
accatcgctg gcaatgagcc agatggagta ccatgagggt tgttatttg ttttttaac	2760
aactaatcaa gagtgagtga acaactatTT ataaactaga tctcctatTT ttcagaatgc	2820
tcttctacgt ataaatatga aatgataaaag atgtcaaata tctcagaggc tatacgctgg	2880
aacccgactg tgaaagtatg tgatatctga acacatacta gaaagctctg catgtgtgtt	2940

gtccttcagc ataattcgga agggaaaaca gtcgatcaag ggatgtattt gaacatgtcg	3000
gagtagaaat tgcccttgat gtgccagaac ttgcaccctt tctctgagag agatgatcgt	3060
gcctataaat agtaggacca atgttgttat taacatcatc aggcttgaa tgaattctct	3120
ctaaaaataa aatgatgtat gatttgttgc tggcatcccc tttattaatt cattaaattt	3180
ctggatttgg gttgtgaccc agggtgcatt aactaaaag attcactaaa gcagcacata	3240
gcactgggaa ctctggctcc gaaaaacttt gtttatata tcaaggatgt tctggctta	3300
cattttattt attagctgta aatacatgtg tggatgtgta aatggagctt gtacatattt	3360
gaaaggtcat tgtggctatc tgcattata aatgtgttgt gctaactgta tgtgtctta	3420
tcaagtatgg tctcacagag ccaactcact cttatgaaat gggcttaac aaaacaagaa	3480
agaaacgtac ttaactgtgtt gaagaaatgg aatcagctt taataaaattt gacaacattt	3540
tattaccac	3549