



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0026548
(43) 공개일자 2018년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/685 (2006.01)
A61K 31/688 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) C07K 14/775 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/127 (2013.01)
A61K 31/685 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7005474(분할)
(22) 출원일자(국제) 2006년03월23일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2016-7016313
원출원일자(국제) 2006년03월23일
심사청구일자 2016년07월18일
(85) 번역문제출일자 2018년02월23일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2006/000635
(87) 국제공개번호 WO 2006/100567
국제공개일자 2006년09월28일
(30) 우선권주장
60/665,180 2005년03월24일 미국(US)

(71) 출원인
세레니스 제라퓨틱스 홀딩 에스에이
프랑스 에프-31670 라베즈 바트 아 튀 드 라 데쿠
베르트 265
(72) 발명자
다쎄, 장-루이 에이치.
프랑스 에프-31320 비에이-톨루즈 쉬멩 드 방페
낙 7
(74) 대리인
양영준, 김영

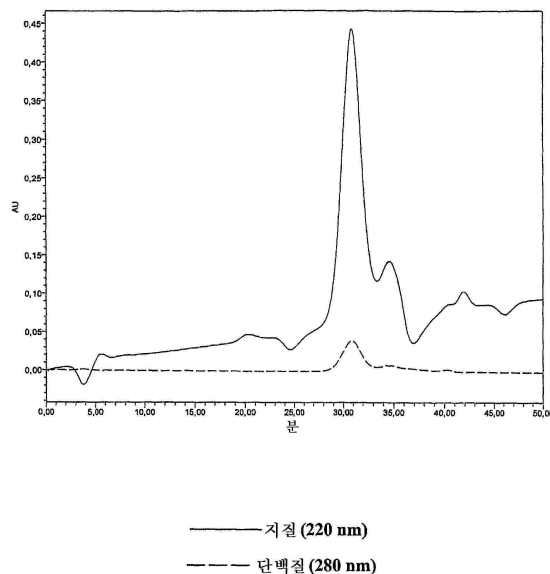
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 하전된 지단백질 복합체 및 그의 용도

(57) 요약

본 개시내용은 개선된 치료 성질을 복합체에 부여하는 것으로 기대되는 하나의 성분으로 음 하전 인지질을 포함하는 하전된 지단백질 복합체를 제공하고 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/688 (2013.01)

A61K 38/1709 (2013.01)

A61K 49/0008 (2013.01)

A61K 9/1275 (2013.01)

C07K 14/775 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 아포지단백질 분획, (ii) 하나 이상의 중성 인지질 및 하나 이상의 하전된 인지질을 포함하는 지질 분획, 및 (iii) 라벨을 포함하는, 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 라벨이 방사성동위원소 라벨을 포함하는 것인 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 방사성동위원소 라벨이 ^{125}I 를 포함하는 것인 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 4

제2항에 있어서, 방사성동위원소 라벨이 ^{14}C 를 포함하는 것인 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 5

제2항에 있어서, 방사성동위원소 라벨이 ^3H 를 포함하는 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 라벨이 형광 라벨을 포함하는 것인 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 라벨이 효소 라벨을 포함하는 것인 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 라벨이 염료를 포함하는 것인 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 아포지단백질 분획이 라벨로 표지화된 것인 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 10

제1항에 있어서, 지질 분획의 하나 이상의 인지질이 라벨로 표지화된 것인 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 아포지단백질 분획이 아포A-I, 프리프로아포A-I 또는 프로아포A-I를 포함하는 것인, 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 12

제11항에 있어서, 아포지단백질이 프리프로아포A-I, 프로아포A-I, 아포A-I, 프리프로아포A-I_{Milano}, 프로아포A-I_{Milano}, 아포A-I_{Milano}, 프리프로아포A-I_{Paris}, 프로아포A-I_{Paris}, 아포A-I_{Paris}, 또는 이들의 혼합물인, 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 중성 인지질이 레시틴, 스핑고마이엘린, 또는 이들의

혼합물을 포함하는 것인, 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 14

제13항에 있어서, 레시틴을 포함하는 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 15

제13항에 있어서, 스펡고마이엘린을 포함하는 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 16

제13항에 있어서, 레시틴과 스펡고마이엘린의 혼합물을 포함하는 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 17

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 하전된 인지질이 하나 이상의 음하전된 인지질을 포함하는 것인, 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 18

제17항에 있어서, 하나 이상의 음하전된 인지질의 총량이 지질 분획의 0.2 내지 10중량%인 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 19

제17항에 있어서, 하나 이상의 음하전된 인지질이 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜세린, 포스파티딘산, 포스파티딜글리세롤, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것인, 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 20

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 지단백질 복합체의 지질:아포지단백질의 물비가 2:1 내지 200:1의 범위이고, 여기서 아포지단백질에 대한 수치는 아포A-I 당량으로 표현된 것인, 재구성된 하전된 지단백질 복합체.

청구항 21

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 하전된 지단백질 복합체 및 제약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 이들의 조합을 포함하는, 영상화 절차에 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 영상화 절차가 CAT 스캔 또는 MRI 스캔을 포함하는 것인 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

1. 관련 출원과의 상호참조

[0002]

본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에서 미국 가 출원번호 60/665,180호 (2005년 3월 24일 출원) (여기에서 그 전체내용이 참고문헌으로 포함된다) 특권을 청구한다.

[0003]

2. 기술분야

[0004]

본 개시내용은 하전된 지단백질 복합체, 복합체를 포함하는 제약학적 조성물, 및 이상지질혈증 및/또는 그와 관련된 질병, 질환 및/또는 상태를 포함하여 다양한 상태 및 질병을 치료 또는 예방하기 위한 복합체의 사용 방법을 제공한다.

배경 기술

[0005]

3. 배경기술

[0006] 순환 콜레스테롤은, 혈액 중에서 지질을 운반하는 지질 및 단백질 조성의 복합체 입자인 혈장 지단백질에 의하여 보유된다. 4 종류로 대별되는 지단백질 입자가 혈장에 순환하며 지방-운반 체계에 관련된다: 유미미립, 초저밀도 지단백질(VLDL), 저밀도 지단백질(LDL) 및 고밀도 지단백질(HDL). 유미미립은 단기간 존재하는 소장 지방 흡수의 생성물을 구성한다. VLDL 및 특히 LDL은 콜레스테롤을 (합성되거나 또는 식품 원료로부터 수득되는 곳인) 간으로부터 동맥 벽을 포함한 간외 조직으로 전달하는 책임을 갖는다. 이와 대조적으로 HDL은 콜레스테롤 지질이 저장되거나, 이화되거나, 제거되거나 또는 재순환되는 곳인 간외의 역 콜레스테롤 운반(RCT), 특히 간외 조직으로부터 콜레스테롤 지질의 제거를 중재한다. HDL은 또한 염증, 산화된 지질 및 인터루킨의 운반에서 역할을 한다.

[0007] 지단백질 입자는 콜레스테롤 (보통 콜레스테릴 에스테르의 형태) 및 트리글리세리드로 구성된 소수성 코어를 갖는다. 이러한 코어는 인지질, 비에스테르화 콜레스테롤 및 아포지단백질을 포함한 표면 코트에 의해 둘러싸인다. 아포지단백질은 지질 운반을 매개하고, 일부는 지질 대사에 관련된 효소와 상호작용할 수도 있다. 아포(Apo)A-I, 아포A-II, 아포A-IV, 아포A-V, 아포B, 아포C-I, 아포C-II, 아포C-III, 아포D, 아포E, 아포J 및 아포H를 포함하여 적어도 10개 아포지단백질이 동정되었다. 기타 단백질, 예컨대 LCAT (레스틴:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제), CETP (콜레스테릴 에스테르 전달 단백질), PLTP (인지질 전달 단백질) 및 PON (파라옥소나제)가 지단백질과 관련된 것으로 밝혀졌다.

[0008] 관상 심장 질환, 관상 동맥 질환 및 죽상경화증과 같은 심장혈관 질환은 높은 혈청 콜레스테롤 수준에 압도적으로 연관된다. 예를 들어, 죽상경화증은 동맥 벽 내 콜레스테롤의 축적을 특징으로 하는 서서히 진행되는 질환이다. 강력한 증거가, 죽상경화증 병변에 침착된 지질이 주로 혈장 LDL로부터 유래한다는 이론을 뒷받침하고; 따라서 LDL가 "나쁜" 콜레스테롤로 널리 알려지기 시작하였다. 반대로, HDL 혈청 수준은 관상 심장 질환과 역으로 상관관계를 갖는다. 사실상, HDL의 높은 혈청 수준이 네가티브 위험 인자로서 간주된다. 높은 수준의 혈장 HDLs는 관상 동맥 질환에 대해 보호성일 뿐만 아니라 죽종 판의 퇴행을 실제로 유도할 수 있는 것으로 가정된다 (예를 들어, 문헌 [Badimon 등, 1992, Circulation 86 (Suppl.III): 86-94; Dansky and Fisher, 1999, Circulation 100: 1762-63; Tangirala 등, 1999, Circulation 100 (17): 1816-22; Fan 등, 1999, Atherosclerosis 147(1): 139-45; Deckert 등, 1999, Circulation 100(11): 1230-35; Boisvert 등, 1999, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19(3): 525-30; Benoit 등, 1999, Circulation 99(1): 105-10; Holvoet 등, 1998, J.Clin.Invest. 102(2): 379-85; Duverger 등, 1996, Circulation 94(4): 713-17; Miyazaki 등, 1995, Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 15(11): 1882-88; Mezdoor 등, 1995, Atherosclerosis 113(2): 237-46; Liu 등, 1994, J.Lipid Res. 35(12): 2263-67; Plump 등, 1994, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 91(20): 9607-11; Paszty 등, 1994, J.Clin.Invest. 94(2): 899-903; She 등, 1992, Chin.Med.J. (Engl). 105(5): 369-73; Rubin 등, 1991, Nature 353 (6341): 265-67; She 등, 1990, Ann.NY Acad.Sci. 598: 339-51; Ran, 1989, Chung HuaPing Li Hsueh Tsa Chih (Zhonghua Bing Li XueZa Zhi 로서 번역됨) 18(4): 257-61; Quezado 등, 1995, J.Pharmacol.Exp.Ther. 272(2): 604-11; Duverger 등, 1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(12): 1424-29; Kopfler 등, 1994, Circulation; 90(3): 1319-27; Miller 등, 1985, Nature 314(6006): 109-11; Ha 등, 1992, Biochim.Biophys.Acta 1125(2): 223-29; Beitz 등, 1992, Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids 47(2): 149-52] 참조). 그 결과로서, HDLs는 "좋은" 콜레스테롤로서 널리 알려지게 되었다 (예를 들어, 문헌[Zhang 등, 2003 Circulation 108: 661-663] 참조).

[0009] HDL의 "보호" 역할은 다수의 연구에서 확인되었다 (예를 들어, 문헌 [Miller 등, 1977, Lancet 1(8019): 965-68; Whayne 등, 1981, Atherosclerosis 39: 411-19] 참조). 이러한 연구에서, 높은 수준의 LDL은 심장혈관 위험의 증가와 연관되는 것으로 보이는 반면, 높은 HDL 수준은 심장혈관 보호를 제공하는 것으로 생각된다. 생체 내 연구는, HDL의 보호 역할을 더욱 증명하였으며, 토끼 내에 HDL 주입이 콜레스테롤 유도 동맥 병변의 발병을 방해할 수 있고 [Badimon 등, 1989, Lab.Invest. 60: 455-61] 및/또는 그들의 퇴행을 유도할 수 있음 [Badimon 등, 1990, J.Clin.Invest. 85: 1234-41]을 보여준다.

[0010] 3.1 역 콜레스테롤 운반, HDL 및 아포지단백질 A-I

[0011] 역 콜레스테롤 운반(RCT) 경로는 대부분의 간외 조직으로부터 콜레스테롤을 제거하는 작용을 하고, 체내 대부분의 세포의 구조 및 기능을 유지하는데 중요하다. RCT는 주로 3개 단계로 구성된다: (a) 콜레스테롤 유출, 즉 다양한 말초 세포의 풀(pool)로부터 콜레스테롤의 초기 제거; (b) 레스틴:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(LCAT)의 작용에 의한 콜레스테롤 에스테르화, 유출된 콜레스테롤의 세포내 재도입 방지; 및 (c) 가수분해를 위해 간 세포 내로 HDL 콜레스테롤 및 콜레스테릴 에스테르의 흡수에 이어서, 담즙에서의 재순환, 저장, 분비, 또는 담즙

산으로의 이화작용.

- [0012] RCT에서의 핵심 효소인 LCAT는 간에 의해 생성되고, HDL 분획과 연계되어 혈장에서 순환한다. LCAT는 세포-유래 콜레스테롤을 콜레스테릴 에스테르로 전환시키고, 이것은 제거될 예정의 HDL 내로 격리된다 (문헌 [Jonas 2000, Biochim.Biophys.Acta 1529 (1-3): 245-56] 참조). 콜레스테릴 에스테르 전달 단백질(CETP) 및 인지질 전달 단백질(PLTP)은 순환하는 HDL 집단의 재형성에 기여한다. CETP는 LCAT에 의해 형성된 콜레스테릴 에스테르를 다른 지단백질, 특히 아포B-포함 지단백질, 예컨대 VLDL 및 LDL로 이동시킨다. PLTP는 레시틴을 HDL에 공급한다. HDL 트리글리세리드는 세포외 간 트리글리세리드 리파제에 의해 이화되고, 지단백질 콜레스테롤은 여러 메커니즘을 통해 간에 의해 제거된다.
- [0013] HDL 입자의 기능적 특징은 아포A-I 및 아포A-II와 같은 주요 아포지단백질에 의해 주로 결정된다. 또한, 소량의 아포C-I, 아포C-II, 아포C-III, 아포D, 아포A-IV, 아포E, 아포J가 HDL과 연관되는 것으로 관찰되었다. HDL는 대사 RCT 캐스케이드 또는 경로 동안에 재형성 상태에 의존하여 다양한 종류의 상이한 크기 및 상기 언급된 성분의 상이한 혼합물로 존재한다.
- [0014] 각각의 HDL 입자는 보통 적어도 1 분자, 보통 2 내지 4 분자의 아포A-I를 포함한다. HDL 입자는 단지 아포E (감마-LpE 입자) 만을 포함할 수도 있고, 게드 아스만 교수 (Prof.Gerd Assmann)에 의하여 기재된 바와 같이 콜레스테롤 유출의 원인이 되는 것으로 알려졌다 (예를 들어, 문헌 [von Eckardstein 등, 1994, Curr Opin Lipidol. 5(6): 404-16] 참조). 아포A-I는 간 및 소장내에 의하여 프리프로아포지단백질 A-I으로서 합성되고, 이것은 프로아포지단백질 A-I (프로아포A-I)로서 분비되고 빨리 절단되어 아포A-I의 혈장 형태, 243개 아미노산의 단일 폴리펩티드 사슬을 생성한다 [Brewer 등, 1978, Biochem.Biophys.Res.Comm. 80:623-30]. 실험적으로 혈류 내에 직접 주입된 프리프로아포A-I는 아포A-I의 혈장 형태로 절단된다 [Klon 등, 2000, Biophys. J. 79(3): 1679-85; Segrest 등, 2000, Curr.Opin.Lipidol.11(2): 105-15; Segrest 등, 1999, J.Biol.Chem. 274(45): 31755-58].
- [0015] 아포A-I는 6 내지 8개 상이한 22개 아미노산 알파-나선 또는 종종 프롤린인 링커 잔기에 의해 간격이 떨어져 있는 기능적 반복단위를 포함한다. 반복 단위는 친양쪽성 나선 형태로 존재하고 [Segrest 등, 1974, FEBS Lett. 38:247-53], 아포A-I의 주요 생물학적 활성, 즉 지질 결합 및 레시틴 콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제(LCAT) 활성화를 부여한다.
- [0016] 아포A-I는 지질과 3가지 유형의 안정한 복합체를 형성한다: 프리-베타-1 HDL이라 일컬어지는, 작은 지질-부족 복합체; 프리-베타-2 HDL이라 일컬어지는, 극성 지질 (인지질 및 콜레스테롤)을 포함한 납작한 원반상 입자; 및 구형 또는 성숙한 HDL (HDL₃ 및 HDL₂)로서 일컬어지는, 극성 및 비극성 지질을 양쪽 모두 포함하는 구형 입자. 순환하는 집단에서 대부분의 HDL은 아포A-I 및 아포A-II ("AI/AII-HDL 분획")를 양쪽 모두 포함한다. 그러나, 단지 아포A-I 만을 포함하는 HDL의 분획 ("AI-HDL 분획")은 RCT에서 더욱 효과적인 것으로 보인다. 특정한 역학적 연구는, 아포-AI-HDL 분획이 항-죽상경화증이라는 가설을 뒷받침한다 ([Parra 등, 1992, Arterioscler, Thromb, 12: 701-07; Decossin 등, 1997, Eur.J. Clin. Invest 27: 299-307] 참조).
- [0017] HDL은 크기, 지질 조성 및 아포지단백질 조성이 상이한 몇 가지 입자 집단으로 만들어진다. 이들은 수화된 밀도, 아포지단백질 조성 및 전하 특징을 포함한 그들의 성질에 따라서 분리될 수 있다. 예를 들어, 프리-베타-HDL은 성숙한 알파-HDL에 비해 낮은 표면 전하를 특징으로 한다. 전하 차이 때문에, 프리-베타-HDL 및 성숙한 알파-HDL은 아가로스 겔에서 상이한 전기영동 이동성을 갖는다 [David 등, 1994, J.Biol.Chem. 269(12): 8959-8965].
- [0018] 또한, 프리-베타-HDL 및 성숙한 알파-HDL의 대사는 상이하다. 프리-베타-HDL은 두 가지 대사 말로를 갖는다: 혈장으로부터의 제거 및 신장에 의한 이화작용, 또는 간에 의해 우선적으로 분해되는 중간-크기 HDL로의 재형성 [Lee 등, 2004, J.Lipid.Res. 45(4): 716-728].
- [0019] 세포 표면으로부터의 콜레스테롤 전달 (즉, 콜레스테롤 유출)의 메커니즘이 알려져 있지 않지만, 지질-부족 복합체, 프리-베타-1 HDL이 RCT에 관련된 말초 조직으로부터 전달되는 콜레스테롤을 위해 바람직한 수용체인 것으로 생각된다. (문헌 [Davidson 등, 1994, J.Biol.Chem. 269: 22975-82; Bielicki 등, 1992, J.Lipid.Res. 33: 1699-1709; Rothblat 등, 1992, J.Lipid Res. 33: 1091-97; 및 Kawano 등, 1993, Biochemistry 32:5025-28; Kawano 등, 1997, Biochemistry 36: 9816-25] 참조). 세포 표면으로부터 콜레스테롤 보충 과정 동안에, 프리-베타-1 HDL이 프리-베타-2 HDL로 빨리 전환된다. PLTP는 프리-베타-2 HDL 원반 형성 속도를 증가시킬 수 있지만, RCT에서 PLTP의 역할을 시사하는 데이터는 아직 없다. LCAT는 원반상의 작은 (프리-베타) 및 구형 (즉, 성

숙한) HDL과 우선적으로 반응하고, 레시틴 또는 다른 인지질의 2-아실 기를 콜레스테롤의 자유 히드록실 잔기로 전달하여 콜레스테릴 에스테르 (HDL에 보유됨) 및 라이소레시틴을 생성한다. LCAT 반응은 활성화제로서 아포A-I을 필요로 하고; 다시말해서 아포A-I는 LCAT를 위한 천연 보조인자이다. HDL에 격리된 콜레스테롤이 그의 에스테르로 전환되는 것은 세포 내로 콜레스테롤의 재-도입을 막고, 최종 결과는 세포로부터 콜레스테롤이 제거되는 것이다.

[0020] 아포A-I-HDL 분획 (즉, 아포A-I 포함 및 비 아포A-II)에서 성숙한 HDL 입자에있는 콜레스테릴 에스테르가 간에 의해 제거되고, 아포A-I 및 아포A-II를 모두 포함하는 HDL(AI/AII-HDL 분획)로부터 유래되는 것에 비해 더욱 효율적으로 담즙으로 처리된다. 이것은 부분적으로 간세포 막에 대한 아포A-I-HDL의 더욱 효과적인 결합에 기인할 수도 있다. HDL 수용체의 존재가 가정되어 왔고, 스캐빈저 수용체, 부류 B 유형 I(SR-BI)이 HDL 수용체로서 확인되었다 [Acton 등, 1996, Science 271: 518-20; Xu등, 1997, Lipid Res. 38: 1289-98]. SR-BI는 스테로이드 생성 조직 (예, 부신) 및 간에서 가장 풍부하게 발현된다 [Landschulz 등, 1996, J.Clin.Invest. 98: 984-95; Rigotti 등, 1996, J.Biol.Chem. 271: 33545-49]. HDL 수용체의 검토를 위하여, 문헌 [Broutin 등, 1988, Anal.Biol.Chem. 46:16-23]을 참조한다.

[0021] ATP-결합 카세트 운반체 AI에 의한 초기 지질화는, 혈장 HDL 형성을 위해, 그리고 콜레스테롤 유출을 위한 프리-베타-HDL 입자의 능력을 위해 중요한 것으로 보인다 [Lee 및 Parks, 2005, Curr.Opin.Lipidol.16(1): 19-25]. 상기 문헌의 저자에 따르면, 이러한 초기 지질화는 프리-베타-HDL이 콜레스테롤 수용체로서 더욱 효율적으로 작용할 수 있도록 하고, 아포A-I가 기존의 혈장 HDL 입자와 빠르게 결합되는 것을 막으며, 그 결과 콜레스테롤 유출을 위한 프리-베타-HDL 입자의 이용가능성이 더욱 높아진다.

[0022] CETP는 RCT에서 중요한 역할을 할 수도 있다. CETP 활성 또는 그의 수용체, VLDL 및 LDL에서의 변화는 HDL 집단을 "재형성"함에 있어서 역할을 한다. 예를 들어, CETP의 부재 하에서, HDL은 깨끗하게 되지 않는 커다란 입자가 된다 (RCT 및 HDLs의 검토를 위하여, 문헌 [Fielding and Fielding, 1995, J.Lipid Res. 36:211-28; Barrans 등, 1996, Biochem. Biophys. Acta 1300: 73-85; Hirano 등, 1997, Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 17(6): 1053-59]을 참조한다).

[0023] HDL은 다른 지질 및 비극성 분자의 역 운반에서, 그리고 해독, 다시말해서 이화작용 및 배출을 위해 세포, 기관 및 조직으로부터 간으로 지질을 운반하는 것에서 역할을 한다. 이러한 지질은 스펡고마이엘린(SM), 산화된 지질, 및 라이소포스파티딜콜린을 포함한다. 예를 들어, 로빈스 및 파슬로 [Robins and Fasulo, 1997, J.Clin.Invest. 99: 380-84]는, HDLs가 간에 의해 식물 스테롤을 담즙 분비로 운반하는 것을 자극한다.

[0024] HDL의 주 성분인 아포A-I는 시험관내에서 SM과 관련될 수 있다. 아포A-I가 시험관내에서 소 뇌 SM (BBSM)과 재구성될 때, 최대 재구성 속도는 28℃에서 일어나고 온도는 대략 BBSM을 위한 상 전이 온도와 가깝다 [Swaney, 1983, J.Biol.Chem. 258(2), 1254-59]. 7.5:1 또는 그 미만의 BBSM:아포A-I 비율 (중량/중량)에서, 입자 당 3 개의 아포A-I 분자를 포함하고 360:1의 BBSM:아포A-I 몰비를 갖는 하나의 재구성된 균일 HDL 입자가 형성된다. 이것은 전자 현미경에서 인지질/단백질의 높은 비율에서 포스파티딜콜린에 의한 아포A-I의 재조합에 의해 수득되는 것과 유사한 원반상 복합체로서 나타난다. 그러나, 15:1(중량/중량)의 BBSM:아포A-I 비율에서, 높은 인지질:단백질 몰비(535:1)를 가진 더욱 큰 직경의 원반상 복합체가 형성된다. 이러한 복합체는 포스파티딜콜린과 함께 형성된 아포A-I 복합체에 비하여 상당히 크고, 더욱 안정하고 변성에 대해 더욱 내성이다.

[0025] 스펡고마이엘린(SM)이 초기 콜레스테롤 수용체 (프리-베타-HDL 및 감마-이동 아포E-포함 지단백질)에서 높아지고, 이것은 SM이 콜레스테롤 유출을 촉진하는 입자의 능력을 향상시킬 수 있음을 시사한다 [Dass and Jessup, 2000, J.Pharm.Pharmacol. 52:731-61; Huang등, 1994, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91: 1834-38; Fielding and Fielding 1995, J.Lipid Res. 36:211-28].

[0026] 3.2 HDL 및 아포A-I의 보호 메카니즘

[0027] HDL의 보호 메카니즘(들)의 최근의 연구는 HDL의 주 성분인 아포지단백질 A-I(아포A-I)에 집중하고 있다. 아포A-I의 높은 혈장 수준이 관상 병변의 부재 또는 감소와 연관된다 [Maciejko 등, 1983, N.Engl.J.Med. 309:385-89; Sedlis 등, 1986, Circulation 73: 978-84].

[0028] 실험용 동물에서 아포A-I 또는 HDL의 주입은 상당한 생화학적 변화를 발휘할 뿐만 아니라, 죽상경화 병변의 정도 및 심각성을 감소시킨다. 문헌 [Maciejko 및 Mao (1982, Arteriosclerosis 2: 407a)]에 의해 초기에 보고된 후에, 바디몬(badimon) 등 [1989, Lab.Invest. 60: 455-61; 1989, J.Clin.Invest. 85:1234-41]은 이들이 HDL를 주입함으로써 죽상경화 병변의 정도 (45%의 감소) 및 콜레스테롤-공급 쥐에서 그들의 콜레스테롤 에스테

르 함량 (58.5%의 감소)를 상당히 감소시킬 수 있음을 알아내었다. 이들은 HDL의 주입이 수립된 병변의 50% 퇴행에 가까이 유도함을 알아내었다. 에스퍼(Esper) 등 (1987, Arteriosclerosis 7: 523a)은, HDL의 주입이, 초기 동맥 병변을 발생시키는 유전된 고콜레스테롤혈증을 가진 와타나베 토끼의 혈장 지단백질 조성을 현저히 변화시킬 수 있음을 밝혀내었다. 이러한 토끼에서, HDL 주입은 보호 HDL과 죽상경화 LDL 간의 비율을 두 배 이상으로 할 수 있다.

- [0029] 동물 모델에서 동맥 질환을 방지하기 위한 HDL의 잠재력은, 아포A-I가 시험관내에서 섬유소용해 활성을 발휘할 수 있다는 관찰에 의해 더욱 이해되었다 [Saku 등, 1985, Thromb.Res. 39:1-8]. 로네버거(Ronneberger) [1987, Xth Int. Congr.Pharmacol., Sydney, 990]는, 아포A-I가 비글 개 및 시노몰로거스(Cynomologous) 원숭이에서 섬유소용해를 증가시킬 수 있음을 증명하였다. 인간 혈장에서 시험관내에서 유사한 활성이 주목될 수 있다. 로네버거는 아포A-I 처리된 동물에서 지질 침착 및 동맥 판 형성의 감소를 입증할 수 있었다.
- [0030] 시험관내 연구는 아포A-I 및 레시틴의 복합체가 배양된 동맥 유연근 세포로부터 자유 콜레스테롤의 유출을 촉진할 수 있음을 나타낸다 [Stein 등, 1975, Biochem. Biophys. Acta, 380: 106-18]. 이러한 메카니즘에 의하여, HDL은 이러한 세포의 증식을 감소시킬 수 있다 [Yoshida 등, 1984, Exp.Mol Pathol. 41:258-66].
- [0031] 아포A-I 또는 아포A-I 모방체 펩티드를 포함한 HDL로의 주입 요법은, ABC1 운반체에 의해 혈장 HDL 수준을 조절하여 심장혈관 질병의 치료에서 효능을 유도함을 밝혀내었다 (예를들어, [Brewer 등 2004, Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 24: 1755-1760] 참조).
- [0032] 아르기닌 잔기가 시스테인으로 돌연변이된, 아포A-I의 2개의 자연 발생적 인간 돌연변이를 단리하였다. 아포지단백질 A-I_{Milano} (아포A-I_M)에서, 이러한 치환은 잔기 173에서 일어나는 반면, 아포지단백질 A-I_{Paris} (아포A-I_P)에서 이러한 치환은 잔기 151에서 일어난다 [Franceschini 등, 1980, J.Clin.Invest. 66: 892-900; Weisgraber 등, 1983, J.Biol.Chem. 258: 2508-13; Bruckert 등, 1997, Atherosclerosis 128: 121-28; Daum 등, 1999, J.Mol.Med. 77: 614-22; Klon 등, 2000, Biophys.J. 79(3): 1679-85]. 아포A-I_M 또는 아포A-I_P의 디설파이드-연결된 단독이량체를 포함하는 재구성된 HDL 입자는, 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC) 에멀전을 제거하는 능력 및 콜레스테롤 유출을 촉진하는 능력의 면에서 야생형 아포A-I를 포함하는 재구성된 HDL 입자와 유사하다 [Calabresi 등, 1997b, Biochemistry 36: 12428-33; Franceschini 등, 1999, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19: 1257-62; Daum 등, 1999, J.Mol.Med. 77: 614-22]. 양쪽 돌연변이에서, 이중접합 개체는 낮은 수준의 HDL을 갖지만, 역설적으로 죽상경화증의 위험이 감소된다 [Franceschini 등, 1980, J.Clin.Invest. 66: 892-900; Weisgraber 등, 1983, J.Biol.Chem. 258: 2508-13; Bruckert 등, 1997, Atherosclerosis 128: 121-28]. 변형체를 포함하는 재구성된 HDL 입자는, 야생형 아포A-I를 포함하는 재구성된 HDL 입자와 비교할 때 감소된 효능을 갖긴 하지만 LACT 활성화를 가능하게 한다 [Calabresi 등, 1997a, Biochem.Biophys.Res.Commun. 232: 345-49; Daum 등, 1999, J.Mol.Med. 77: 614-22].
- [0033] 아포A-I_M 돌연변이는 보통염색체 우성 소질로서 전달되고; 가계 내에서 담체의 8개 세대가 동정되었다 [Gualandri 등, 1984, Am.J.Hum.Genet. 37: 1038-97]. 아포A-I_M 담체 개체의 상태는 HDL-콜레스테롤 수준의 현저한 감소를 특징으로 한다. 이것에도 불구하고, 담체 개체는 동맥 질환의 위험 증가를 명백히 나타내지 않는다. 사실상, 계통학적 기록의 조사에 의하면, 이러한 피시험자는 죽상경화증으로부터 "보호"될 수 있는 것으로 보인다 [Sirtori 등, 2001, Circulation, 103: 1949-1954; Roma 등, 1993, J.Clin.Invest. 91(4): 1445-520].
- [0034] 돌연변이의 담체에서 아포A-I_M의 가능한 보호 효과의 메카니즘은, 하나의 알파-나선의 손실 및 소수성 잔기의 노출 증가와 함께, 돌연변이체 아포A-I_M의 구조에서의 변형과 결부되는 것으로 생각된다 [Franceschini 등, 1985, J.Biol.Chem. 260: 1632-35]. 다수의 알파-나선의 조밀한 구조가 소실되면 분자의 유연성을 증가시키고, 이것은 정상적인 아포A-I에 비하여 지질과 더욱 쉽게 결합된다. 또한, 아포지단백질-지질 복합체는 더욱 쉽게 변성될 수 있고, 따라서 돌연변이체의 경우에 지질 전달이 개선된다는 것을 시사한다.
- [0035] 문헌 [Bielicki 등 (1997, Arterioscler. Thromb.Vasc.Biol. 17(9): 1637-43)]은, 아포A-I_M가 야생형 아포A-I에 비하여 막 콜레스테롤을 보충하는데 제한된 능력을 갖고 있음을 증명하였다. 또한, 아포A-I_M와 막 지질과의 결합에 의해 형성된 발생기 HDL은, 야생형 아포A-I에 의해 형성된 더욱 큰 9- 및 11-nm 복합체보다는 오히려 주로 7.4nm 입자이다. 이러한 관찰은, 아포A-I 주요 서열에서 Arg₁₇₃ → Cys₁₇₃ 치환이 정상적인 세포 콜레스테롤 보

충 및 발생기 HDL 조립 과정을 방해한다는 것을 나타낸다. 돌연변이는 세포로부터 콜레스테롤 제거의 효율 저하와 명백히 연관된다. 따라서, 그의 항죽종형성 성질은 RCT에 관련되지 않을 수도 있다.

- [0036] Arg₁₇₃ → Cys₁₇₃ 치환에 기인하는 가장 놀라운 구조적 변화는 아포A-I_M의 이량체화이다 [Bielicki 등, 1997, Arterioscler. Thromb. Vasc.Biol. 17 (9): 1637-43]. 아포A-I_M는 그 자체와 함께 동종이량체 및 아포A-II와 함께 이종이량체를 형성할 수 있다. 아포지단백질의 혼합물을 포함한 혈액 분획의 연구는, 순환에 이량체 및 복합체가 존재하는 것은 아포지단백질의 제거 반감기 증가의 원인이 될 수 있음을 나타낸다. 이러한 제거 반감기의 증가가 돌연변이 담체의 임상 연구에서 관찰되었다 [Gregg 등, 1988, NATO ARW on HumanApolipoprotein Mutants:From Gene Structure to Phenotypic Expression, Limone S G]. 다른 연구는, 아포A-I_M 이량체 (아포A-I_M/아포A-I_M)가 시험관내에서 HDL 입자의 상호전환에서 억제 인자로서 작용한다는 것을 나타낸다 [Franceschini 등, 1990, J.Biol.Chem. 265: 12224-31].

[0037] 3.3 이상지질혈증 및 관련 질병의 현행 치료법

- [0038] 이상지질혈증은 높은 혈청 콜레스테롤 및 트리글리세리드 수준과 낮은 혈청 HDL:LDL 비율과 관련된 질환이며, 고지질혈증, 특히 고콜레스테롤혈증, 관상 심장 질환, 관상 동맥 질환, 혈관 및 혈관주위 질환, 및 심장혈관 질환, 예컨대 죽상경화증을 포함한다. 동맥 기능부족에 의해 유발된 간헐성 파행과 같은 죽상경화증과 연관된 증상이 또한 포함된다. 이상지질혈증 질병과 관련된 높은 혈청 콜레스테롤 및 트리글리세리드를 낮추기 위하여 다수의 처리법이 현재 이용가능하다. 그러나, 각각은 효능, 부작용 및 제한된 환자 집단의 측면에서 자체의 단점 및 한계를 갖고 있다.

- [0039] 담즙산-결합 수지는 장으로부터 간으로 담즙산의 재순환을 방해하는 약물 부류이고: 예를들어 콜레스티라민 (퀘스트란 라이트(Questran Light)^(R), 브리스톨-마이어스 스кви브) 및 콜레스티폴 히드로클로라이드 (콜레스티드 (Colestid)^(R), 더 업존 컴퍼니)이다. 경구 섭취될 때, 이러한 양-전하 수지가 장 내의 음 하전 담즙산에 결합한다. 수지가 장으로부터 흡수될 수 없기 때문에, 이들은 담즙산을 보유한 채로 배출된다. 그러나, 기껏해야 이러한 수지의 사용은 혈청 콜레스테롤 수준을 단지 약 20% 만큼 낮추고, 변비 및 특정한 비타민 결핍을 포함한 위장 부작용과 연관된다. 또한, 수지가 다른 약물에 결합하기 때문에, 다른 경구 약제들은 수지의 섭취 전 적어도 1 시간 또는 섭취 후 4 내지 6시간에 섭취되어야 하고; 따라서 심장 환자의 약물 섭생법을 복잡하게 한다.

- [0040] 스타틴류는 콜레스테롤 생합성 경로에 관련된 주요 효소인 HMGCoA 환원효소를 억제함으로써 콜레스테롤 합성을 차단하는 콜레스테롤 저하제이다. 스타틴, 예를들어 로바스타틴(메바코르(Mevacor)^(R), 심바스타틴(조코르 (Zocor)^(R), 프라바스타틴(프라바콜(Pravachol)^(R), 플루바스타틴(레스콜(Lescol)^(R) 및 아토르바스타틴(리피토르(Lipitor)^(R))이 담즙산-결합 수지와 조합하여 때때로 사용된다. 스타틴은 혈청 콜레스테롤 및 LDL-혈청 수준을 현저히 감소시키고, 관상 죽상경화증의 진행을 느리게 한다. 그러나, 혈청 HDL 콜레스테롤 수준이 단지 약간 증가한다. LDL 저하 효과의 메카니즘은 VLDL 농도의 감소 및 LDL-수용체의 세포 발현의 유도과 연관될 수 있고, 이것은 LDL의 생성 감소 및/또는 이화작용 증가를 유도한다. 간 및 신장 기능부전을 포함한 부작용은 이러한 약물의 사용과 관련된다 (The Physicians Desk Reference, 제56판, 2002) Medical Economics).

- [0041] 니아신 (니코틴산)은 식이 보충물 및 항고지질혈증 약제로서 사용되는 수용성 비타민 B-복합체이다. 니아신은 VLDL의 생성을 감소시키고 LDL을 저하시키는데 효과적이다. 일부 경우에, 담즙산 결합 수지와 조합하여 사용된다. 니아신은 적절한 투여량으로 사용될 때 HDL을 증가시킬 수 있으나, 높은 투여량으로 사용될 때 심각한 부작용에 의해 그의 유용성이 제한된다. 니아스판(Niaspan)^(R)은 순수한 니아신에 비해 적은 부작용이 일으키는 연장-방출 니아신 형태이다. 니아신/로바스타틴(니코스타틴)^(R)은 니아신 및 로바스타틴 양쪽 모두를 함유하는 제제이고 각 약물의 장점을 조합한다.

- [0042] 피브레이트는 고콜레스테롤혈증과 연관될 수도 있는 다양한 형태의 고지질혈증 (즉, 높은 혈청 트리글리세리드)를 치료하기 위해 사용되는 지질-저하 약물의 부류이다. 피브레이트는 VLDL 분획을 감소시키는 것으로 보이고 HDL을 알맞게 증가시킨다 - 그러나, 혈청 콜레스테롤에 대한 이러한 약물의 효과는 가변적이다. 미국에서, 클로피브레이트 (아트로미드-S^(R)), 페노피브레이트 (트리코르^(R)) 및 벤자피브레이트 (베잘리프^(R))와 같은 피브레이트는 항지혈증 약물로서 사용하기 위해 승인되었으나, 고콜레스테롤혈증 약제로서 승인을 받지 못하였다. 예를 들어, 클로피브레이트는 VLDL 분획을 감소시킴으로써 혈청 트리글리세리드를 저하시키는 작용을 하는 (알

려지지 않은 메카니즘을 통해) 항지혈증 약제이다. 혈청 콜레스테롤이 특정한 환자 소집단에서 감소될 수도 있긴 하지만, 약물에 대한 생화학적 반응이 가변성이고, 환자가 유리한 결과를 얻게 될 것인지를 항상 예측할 수 있는 것이 아니다. 아트로미드-S^(R)는 관상 심장 질환의 예방을 위해 효과적인 것으로 밝혀지지 않았다. 화학적 및 약리학적 관련 약물인 겐피브로질(로피드(Lopid)^(R))는 혈청 트리글리세리드 및 VLDL 콜레스테롤을 알맞게 저하시키고, HDL 콜레스테롤 - HDL₂ 및 HDL₃ 소분획 뿐만 아니라 아포A-I 및 A-II (즉, AI/AMT-HDL 분획)을 알맞게 증가시키는 지질 조절 약제이다. 그러나, 지질 반응은 특히 상이한 환자 집단 중에서 불균일하다. 또한, 기존의 관상 심장 질환의 병력 또는 증상을 갖지 않은 40 내지 55세 사이의 남성 환자에게서 관상 심장 질환의 예방이 관찰된 반면, 이러한 발견이 다른 환자 집단 (예를 들어, 여성, 더 나이가 많은 남성 및 더 젊은 남성)에 어느 정도까지 추정될 수 있는지는 명백하지 않다. 사실상, 확립된 관상 심장 질환을 가진 환자에서 효능이 관찰되지 않았다. 악성종양 (특히, 위장 암), 당뇨병 및 비-관상 사망율의 발생 증가와 같은 독성을 포함하여 심각한 부작용이 피브레이트의 사용과 관련된다.

[0043] 폐경후 여성에서 중등도 고콜레스테롤혈증에 대해 경구 에스트로겐 대체 요법이 고려될 수도 있다. 그러나, HDL의 증가가 트리글리세리드의 증가에 수반될 수도 있다. 물론, 에스트로겐 치료는 특정한 환자 집단 (폐경후 여성)에 제한되고 악성 신생물, 당뇨병, 혈전색전성 질환, 간 샘종, 높은 혈압, 포도당 불내성 및 고칼슘혈증을 포함한 심각한 부작용과 관련된다.

[0044] 고지질혈증의 치료를 위해 유용한 다른 약제는 콜레스테롤 흡수를 봉쇄하거나 억제하는 에제티미브 (제티아 (Zetia)^(R); 머어크)를 포함한다. 그러나, 에제티미브의 억제제는 특정한 독성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

[0045] 따라서, 혈청 콜레스테롤을 낮추고, HDL 혈청 수준을 증가시키고, 이상지질혈증 및/또는 이상지질혈증과 연관된 질환, 상태 및/또는 질병을 예방 및/또는 치료하는데 더욱 효능이 있는, 더욱 안전한 약물이 요구되고 있다.

[0046] 예를 들어, HDL 뿐만 아니라 인지질과 복합체화된 아포A-I의 재조합 형태는 비극성 또는 양극성 분자, 예를 들어 콜레스테롤 및 유도체 (옥시스테롤, 산화된 스테롤, 식물 스테롤 등), 콜레스테롤 에스테르, 인지질 및 유도체 (산화된 인지질), 트리글리세리드, 산화 생성물 및 지질다당류(LPS)를 위한 싱크/스캐빈저로서 작용할 수 있다 (예를 들어, 문헌[Casas 등, 1995, J.Surg.Res. Nov 59(5): 544-52] 참조). HDL은 TNF-알파 및 기타 림포카인을 위한 스캐빈저로서 작용할 수 있다. 또한 HDL은 인간 혈청 파라옥소나제, 예를 들어 PON-1, -2, -3을 위한 담체로서 작용할 수 있다. HDL과 연관된 에스테라제인 파라옥소나제는 산화에 대해 세포 성분을 보호하기 위해 중요하다. 산화 능력 동안에 발생하는 LDL의 산화는 죽상경화증의 발생에 직접 연관되는 것으로 보인다 [Aviram, 2000, Free Radic.Res. 33 Suppl:S85-97]. 파라옥소나제는 죽상경화증 및 심장혈관 질환에 대한 감수성에서 역할을 하는 것으로 보인다 [Aviram, 1999, Mol.Med.Today 5(9): 381-86]. 인간 혈청 파라옥소나제 (PON-1)는 고-밀도 지단백질(HDLs)에 결합된다. 그의 활성은 죽상경화증에 역으로 관계된다. PON-1은 유기포스페이트를 가수분해하고, HDL 및 저-밀도 지단백질(LDL)의 산화의 억제에 의하여 죽상경화증에 대해 보호할 수도 있다 [Aviram, 1999, Mol.Med.Today 5(9): 381-86]. 실험적 연구는, 이러한 보호가 산화된 지단백질에서 특정한 지질 퍼옥시드를 가수분해하기 위한 PON-1의 활성과 관련된다는 것을 시사한다. PON-1 활성을 보존하거나 향상시키는 기술은 죽상경화증 및 관상 심장 질환의 개시를 지연시키는데 도움이 될 수도 있다.

[0047] HDL은 항혈전제 및 섬유소원 감소제로서, 그리고 출혈 쇼크에서의 약제로서 역할을 한다 [Cockerill 등, WO 01/13939, 2001년 3월 1일 공개]. HDL, 및 특히 아포A-I는 패혈증에 의해 생성된 지질다당류가 아포A-I를 포함한 지질 입자로 교환되는 것을 촉진하여 그 결과 지질다당류의 기능적 중화를 일으킨다는 것을 나타낸다 [Wright 등, WO 9534289, 1995년 12월 21일 공개; Wright 등, 미국 특허 5,928,624호, 1999년 7월 27일 특허발행; Wright 등, 미국 특허 5,932,536호, 1999년 8월 3일 특허발행].

[0048] 그러나, 치료적 투여를 위해 요구되는 다량의 아포지단백질 및 낮은 생산 총 수율을 고려한 단백질 생산 비용에 의하여, 아포A-I, 아포A-I_M, 아포A-I_P 및 기타 변형체 뿐만 아니라 재구성된 HDL의 치료적 용도가 현재 제한되고 있다. 초기 임상 시험에 의하여, 투여량 범위는 심장혈관 질환의 치료를 위해 1회 관주 당 1.5 내지 4g의 단백질임이 제안되었다. 완전한 치료를 위해 요구되는 관주 횟수는 알려져 있지 않다 (예를 들어, 문헌 [Eriksson 등, 1999, Circulation 100(6): 594-98; Carlson, 1995, Nutr.Metab.Cardiovasc.Dis.5:85-91; Nanjee 등, 2000, Arterioscler. Thromb Vasc. Biol. 20(9): 2148-55; Nanjee 등, 1999, Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol. 19(4): 979-89; Nanjee 등, 1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(9): 1203-14] 참조). 따라서, 이상지질혈증 질환, 상태 및/또는 질병의 치료 및/또는 예방을 위해 새로운 방법을 개발할 것이 요구되

고 있다.

[0049] 항목 2 및 본 출원의 기타 다른 항목에서 참고문헌의 인용 또는 확인은, 이러한 참고문헌이 본 발명의 선행 기술로서 이용될 수 있음을 승인하는 것으로 해석되어서는 안된다.

발명의 내용

[0050] 4. 요약

[0051] 본 개시내용은 하전된 지단백질 복합체, 복합체를 포함하는 조성물, 및 이상지질혈증을 포함한 각종 질병 및 상태, 및/또는 이와 관련된 각종 질환, 질병 및/또는 상태를 치료 및/또는 예방하기 위한 복합체의 사용 방법을 제공한다. 복합체는 일반적으로 2가지 분획, 즉 아포지단백질 분획 및 지질 분획을 포함하고, 특정한 양의 하전된 인지질 (또는 2 이상의 상이한, 전형적으로 유사-하전의 인지질의 혼합물)을 핵심 성분으로 포함하는 지단백질이다. 하전된 인지질(들)은 생리학적 pH에서 양 또는 음 하전될 수 있으나, 많은 구현양태에서 음 하전된다. 일부 구현양태에서, 하전된 인지질은 하나 이상의 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤 및/또는 포스파티딘산을 포함한다.

[0052] 아포지단백질 분획은 복합체에 포함될 때 콜레스테롤을 동원할 수 있는 하나 이상의 단백질, 펩티드 또는 펩티드 유사체를 포함한다 ("아포지단백질"이라 불림). 이러한 아포지단백질의 특정한 예는 아포A-I이다. 다른 특정한 예는 이하에서 더욱 설명된다.

[0053] 지질 분획은 일반적으로 하나 이상의 천연 인지질 및 하전된 인지질을 포함하고, 임의로 추가의 지질, 예를 들어 트리글리세리드, 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 라이소인지질 및 그의 다양한 유사체 및/또는 유도체를 포함할 수 있다. 일부 구현양태에서, 하전된 지단백질 복합체는 이러한 임의적인 지질을 포함하지 않는다.

[0054] 중성 인지질(들)은 생리학적 pH에서 약 0의 순 전하를 가진 인지질일 수 있다. 일부 구현양태에서, 중성 인지질은 생리학적 pH에서 약 0의 순 하전을 가진 양쪽성이온이다. 일부 구현양태에서, 중성 인지질은 레시틴 (또한 포스파티딜콜린 또는 "PC"로 알려짐)을 포함한다. 일부 구현양태에서, 중성 인지질은 스핑고마이엘린 ("SM")을 포함한다. 일부 구현양태에서, 중성 인지질은 레시틴과 SM의 혼합물을 포함한다. 지질 분획이 레시틴 또는 SM, 적어도 하나의 하전된 인지질(들) 및 임의로 기타 지질을 포함하는 것인 하전된 지단백질 복합체의 구현양태는 3개의 "주" 성분: 아포지단백질, 레시틴 또는 스핑고마이엘린 및 하전된 인지질(들)을 포함하기 때문에 "3원" 복합체라 불리운다. 지질 분획이 양쪽 모두의 레시틴 및 SM, 적어도 하나의 하전된 인지질(들) 및 임의로 기타 지질을 포함하는 하전된 지단백질 복합체의 구현양태는 "4원" 복합체라 불리운다.

[0055] 하전된 지단백질 복합체의 지질 분획에 포함되는 하전된 인지질(들)의 총량은 변할 수 있지만, 전형적으로 약 0.2 내지 10중량%의 범위이다. 일부 구현양태에서, 지질 분획은 약 0.2 내지 2중량%, 0.2 내지 3중량%, 0.2 내지 4중량%, 0.2 내지 5중량%, 0.2 내지 6중량%, 0.2 내지 7중량%, 0.2 내지 8중량% 또는 0.2 내지 9중량%의 총 하전된 인지질(들)이다. 일부 구현양태에서, 지질 분획은 약 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0중량%의 총 하전된 인지질(들)을 포함하고/하거나, 이러한 값을 끝점으로 포함하는 범위이다. 일부 구현양태에서, 지질 분획은 약 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0중량%의 총 하전된 인지질(들) 내지 약 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10중량%의 총 하전된 인지질(들)을 포함한다.

[0056] 지질 분획에 포함되는 중성 인지질(들)의 총량은 변할 수 있고, 하전된 인지질(들)의 양 및 포함된 임의의 임의적인 지질의 양에 의존할 것이다. 임의적인 지질을 포함하지 않는 구현양태에서, 지질 분획은 일반적으로 약 90 내지 99.8중량%의 총 중성 인지질(들)을 포함할 것이다.

[0057] 상기 언급된 바와 같이, 중성 인지질은 레시틴, SM 또는 레시틴과 SM의 혼합물을 포함할 수 있다. 레시틴 및/또는 SM은 중성 인지질의 대부분을 구성할 수 있고, 또는 대안적으로 중성 인지질은 레시틴 및/또는 SM 외에 추가의 중성 인지질을 포함할 수 있다. 중성 인지질이 SM이 아니라 레시틴을 포함하는 구현양태에서, 중성 인지질은 전형적으로 약 5 내지 100중량%의 레시틴을 포함할 것이다. 일부 구현양태에서, 중성 인지질은 100중량%의 레시틴을 포함한다.

[0058] 중성 인지질이 레시틴이 아니라 SM을 포함하는 구현양태에서, 중성 인지질은 일반적으로 약 5 내지 100중량%의 SM을 포함할 것이다. 일부 구현양태에서, 중성 인지질은 100중량%의 SM을 포함한다.

- [0059] 중성 인지질이 레시틴 및 SM의 혼합물을 포함하는 구현양태에서, 전체 중성 인지질에 포함되는 혼합물의 양, 및 혼합물을 구성하는 레시틴 및 SM의 상대 양 (즉, 레시틴: SM 몰비)가 변할 수 있다. 전형적으로, 중성 인지질은 레시틴/SM 혼합물을 약 5 내지 100중량% 포함할 것이다. 일부 구현양태에서, 중성 인지질은 전체가 레시틴 및 SM으로 구성된다 (즉, 레시틴 및 SM의 혼합물 100중량%).
- [0060] 레시틴 대 SM의 몰비 (레시틴:SM)가 변할 수 있지만, 전형적으로 약 20:1 내지 1:20의 범위이다. 일부 구현양태에서, 레시틴:SM 몰비는 약 10:3 내지 10:6의 범위이다. 다른 구현양태에서, 레시틴:SM 몰비는 약 1:20 내지 3:10의 범위이다.
- [0061] 포함된다면, 임의적인 지질은 지질 분획의 약 50중량% 이하를 구성할 것이다. 일부 구현양태에서, 지질 분획은 약 30중량% 미만의 총 임의적 지질을 포함한다. 특정한 구현양태에서, 지질 분획은 전체 임의적 지질을 약 5중량%, 10중량% 또는 20중량% 미만 포함한다.
- [0062] 하전된 지단백질 복합체의 지질-대-아포지단백질 몰비는 다양하게 변할 수 있다. 일부 구현양태에서, 하전된 지단백질 복합체는 약 2:1 내지 약 200:1 범위의 지질:아포지단백질 몰비를 포함한다. 일부 구현양태에서, 지질:아포지단백질 몰비는 약 50:1이다.
- [0063] 본 명세서에 기재된 하전된 지단백질 복합체는, 미포 구조로부터 천연-발생 프리-베타 HDL 입자에 유사한 작은 원반상 입자까지, 천연-발생 알파-HDL 입자에 유사한 더욱 큰 원반상 입자까지, 천연-발생 HDL₂ 또는 HDL₃에 유사한 더욱 큰 구형 입자까지의 범위에 걸쳐 다양한 종류의 형상, 크기 및 형태를 취할 수 있다. 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체의 원하는 크기 및 형상은, 당 기술분야에 공지된 바와 같이, 지질 분획을 포함한 지질의 성분 및 중량 (또는 몰)비뿐만 아니라 지질:아포지단백질 몰비를 조절함으로써 제어될 수 있다 (예를 들어, [Barter 등, 1996, J.Biol.Chem. 271: 4243-4250] 참조).
- [0064] 일부 구현양태에서, 하전된 지단백질 복합체는, 지질 분획이 실질적으로 약 90 내지 99.8중량%의 총 중성 인지질(들) 및 약 0.2 내지 10중량%의 총 음 하전 인지질(들)로 구성되어진, 원반상 입자의 형태이다. 원반상 입자는 크거나 (예를 들어, 약 10 내지 14nm의 편원 직경을 가짐) 또는 작을 (예를 들어, 약 5 내지 10nm의 편원 직경을 가짐) 수 있다. 당 기술분야에 공지된 바와 같이 (예를 들어, 문헌[Barter 등, 1996, 상동] 참조), 원반상 입자의 크기는 지질:아포지단백질 몰비를 조절함으로써 제어될 수 있다. 입자의 크기는 예를 들어 크기 배제 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 결정될 수 있다.
- [0065] 제약학적 조성물은 일반적으로 여기에 기재된 바와 같은 하전된 지단백질 복합체를 포함하고, 하나 이상의 제약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및/또는 희석제를 임의로 포함할 수도 있다. 일부 구현양태에서, 제약학적 조성물을 투여를 위해 적절한 단위 투여량으로 포장한다. 예를 들어, 일부 구현양태에서, 조성물은 밀봉된 바이알에 포장된 단위 투여량의 건조된 (예를 들어, 동결건조된) 하전된 지단백질 복합체를 포함한다. 이러한 조성물은 물, 생리학적 용액 (예를 들어, 염수) 또는 완충액과의 재구성, 및 주사를 통한 투여를 위해 적절하다. 이러한 조성물은 임의로 하전된 복합체의 재구성을 촉진하기 위하여 하나 이상의 고화 방지 및/또는 응집 방지제, 또는 재구성된 현탁액의 pH, 삼투성 및/또는 염도를 조절하기 위해 고안된 하나 이상의 완충제, 당류 또는 염류 (예, 염화나트륨)를 포함할 수도 있다.
- [0066] 본 명세서에 기재된 하전된 지단백질 복합체 및 조성물은 콜레스테롤 유출 및/또는 제거를 실행하고/하거나 촉진하는 것으로 기대되고, 따라서 예를 들어 이상지질혈증 및/또는 이상지질혈증과 관련되거나 지질의 소모, 축적 또는 제거 (예, 지방 침착, 세포 분해)/또는 독소, 생체이물 등과 같은 비극성 분자와 관련된 질환, 상태 및/또는 질병을 포함하여 다양한 상태 및 질병을 치료 및/또는 예방하는데 유용한 것으로 기대된다. 본 명세서에 기재된 하전된 지단백질 복합체 및 조성물로 치료 또는 예방될 수 있는 이러한 질환, 질병 및/또는 관련된 상태의 비-제한적인 예는, 말초 혈관 질환, 고혈압, 염증, 알츠하이머병, 재협착, 죽상경화증, 및 죽상경화증의 무수한 임상적 표현, 예를 들어 졸중, 허혈성 졸중, 일과성 허혈 발작, 심근경색증, 급성 관상 증후군, 협심증, 신혈관 고혈압, 신혈관 기능저하, 간헐성 파행, 임계 사지 허혈, 안정시 동통 및 괴저를 포함한다.
- [0067] 방법은 일반적으로 특정한 증상을 치료 또는 예방하기 위해 효과적인 것으로 본 명세서에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 제약학적 조성물의 양을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 복합체 및/또는 조성물은 단독으로 (단일약물요법 (monotherapy))로 투여될 수 있거나, 또는 대안적으로 이상지질혈증 및/또는 이와 관련된 상태, 질환 및/또는 질병을 치료 및/또는 예방하기 위해 유용한 다른 치료제와 부수적으로 투여할 수 있다. 본 명세서에 기재된 하전된 지단백질 복합체 및 조성물을 부수적으로 투여할 수 있는 치료제의 비-제한적인 예는 담즙산-결합 수지, HMG CoA-환원효소 억제제(스타틴), 니아신, 수지, 콜레스테롤 흡수 억제제 및 피브레이트를 포함

한다.

[0068] 어떠한 작동 이론에 의해 구속되길 원하지 않지만, 지질 분획을 구성하는 하전된 인지질은, 본 명세서에 기재된 하전된 지단백질 복합체 및 조성물에 통상적인 지단백질 복합체에 비해 개선된 치료 특성을 부여할 것으로 생각된다. 신장에서 분해되는 작은 원반상 프리-베타 HDL와, 그들의 콜레스테롤이 저장되거나, 순환되거나, 대사되거나 (담즙 산으로서) 또는 제거되는 (담즙에서) 간에 의해 인식되어지는 큰 원반상 및/또는 구형 HDL 간의 주요 차이점의 하나는 입자의 전하이다. 작은 원반상 프리-베타 HDL은 음으로 하전된 큰 원반상 및/또는 구형 HDL에 비하여 낮은 음 표면 전하를 갖는다. 어떠한 작동 이론에 의해 구속되길 원하지 않지만, 더욱 높은 음 전하는 간에 의한 입자의 인식을 유발하는 인자의 하나이고, 따라서 신장에 의한 입자의 이화작용을 피하는 것으로 생각된다. 부분적으로 하전된 인지질(들)의 존재에 기인하여, 본 명세서에 기재된 하전된 지단백질 복합체 및 조성물은 통상적인 지단백질 복합체에 비해 더욱 긴 순환으로 머무르거나, 또는 전하가 전하-의존적 방식으로 지단백질의 반감기에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 그들의 긴 순환 (체류) 시간은 (콜레스테롤을 축적하기 위해 더 많은 시간을 복합체에 제공함으로써) 콜레스테롤 이동을 촉진하고 (LCAT가 에스테르화 반응을 촉매화하기 위해 더 많은 시간을 제공함으로써) 에스테르화를 촉진할 것으로 기대된다. 전하는 콜레스테롤 포획 및/또는 제거 비율을 증가시킬 수도 있고, 이에 의해 더욱 다량으로 콜레스테롤의 제거를 촉진한다. 그 결과, 본 명세서에 기재된 하전된 지단백질 복합체 및 조성물은, 투여되어야 하는 복합체 및/또는 조성물이 더 소량이고, 덜 빈번히 투여되기 때문에 통상적인 지단백질 요법에 비해 치료적 장점을 제공할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0069] 5. 도면의 간단한 설명

도 1은 프로아포-AI (33중량%) 및 스펡고마이엘린 (67중량%)로 구성된 비하전된 지단백질 복합체의 크로마토그램을 제공한다.

도 2는 프로아포-AI (33중량%), 스펡고마이엘린 (65중량%) 및 포스파티딜글리세롤 (2중량%)로 구성된 하전된 지단백질 복합체의 구현양태의 크로마토그램을 제공한다.

도 3은 여기에 기재된 대조, 비하전된 지단백질 복합체 (IIA로 표시된 곡선) 또는 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체의 구현양태 (IIB로 표시된 곡선)를 투여 한 후에 토끼에서 시간의 함수로서 측정된 HDL 중의 자유 콜레스테롤의 총량을 나타내는 그래프를 제공한다.

도 4는 대조, 비하전된 지단백질 복합체 (군 IIA; 2마리 동물) 또는 여기에 기재된 것과 같은 하전된 지단백질 복합체의 구현양태 (군 IIB; 2마리 동물)를 투여한 토끼에서 시간의 함수로서 측정된 HDL 중의 자유 콜레스테롤의 평균량을 나타내는 그래프를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 6. 발명의 상세한 설명

[0071] 본 발명의 개시내용은 우선 이상지질혈증 및/또는 이상지질혈증과 관련된 질환, 질병 및/또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위해 유용한 하전된 지단백질 복합체 및 조성물을 제공한다. 요약 항목에 언급된 바와 같이, 상기 하전된 지단백질 복합체는 2개 주요 분획, 즉 아포지단백질 분획 및 지질 분획을 포함하고, 특정한 양의 하나 이상의 하전된 인지질을 핵심 성분으로서 포함한다.

[0072] 하전된 지단백질 복합체는 천연 원료로부터, 예컨대 인간 혈청으로부터 분리될 수 있고 (이하, "단리된 하전된 지단백질 복합체"라 언급됨) 또는 이들은 개개의 성분으로부터 만들어지거나 재구성될 수 있다 (이하, "재구성된 하전된 지단백질 복합체"라 언급됨). 당업자에 의해 인지될 수 있듯이, 재구성된 하전된 지단백질 복합체는, 각종 성분의 종류와 양을 선택적으로 제어할 수 있기 때문에 많은 용도에서 유리할 수 있다.

[0073] 6.1 아포지단백질 및 아포지단백질 펩티드

[0074] 하전된 지단백질 복합체의 아포지단백질 분획을 구성하는 아포지단백질의 성질이 성공을 위해 중요하지는 않다. 본 명세서에 기재된 치료적 및/또는 예방적 장점을 제공하는 거의 모든 아포지단백질 및/또는 그의 유도체 또는 유사체가 하전된 복합체에 포함될 수 있다. 또한, LCAT를 활성화할 수 있거나 지질과 연합되면 원반상 입자를 형성한다는 점에서 아포지단백질 (예를 들어, 아포A-I)의 활성을 "모방"하는 알파-나선 펩티드 또는 펩티드 유사체, 또는 다른 유형의 분자가 하전된 복합체에 포함될 수 있고, 따라서 "아포지단백질"의 정의 내에 포함된다. 적절한 아포지단백질의 예는, 이에 한정되지 않지만, 아포A-I, 아포A-II, 아포A-IV, 아포A-IV, 아포

A-V 및 아포E의 프리프로아포지단백질 형태; 인간 아포A-I, 아포A-II, 아포A-IV 및 아포E의 프로- 및 성숙한 형태; 및 활성 다형태, 이소형태, 변형체 및 변이체 뿐만 아니라 끝이 절단된 형태를 포함하고, 그의 가장 일반적인 것은 아포A-I_M (아포A-I_M) 및 아포A-I_P (아포A-I_P)이다. 시스템인 잔기를 함유하는 아포지단백질 변이체가 또한 공지되어 있고 또한 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 2003/0181372 참조). 아포지단백질은 단량체 또는 이량체의 형태일 수도 있고, 이것은 동종이량체 또는 이종이량체일 수도 있다. 예를 들어, 프로- 및 성숙한 아포A-I의 동중- 및 이종이량체 (실행가능하다면) [Duverger 등, 1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(12): 1424-29], 아포A-I_M [Franceschini 등, 1985, J.Biol.Chem. 260:1632-35], 아포A-I_P [Daum 등, 1999, J.Mol.Med. 77:614-22], 아포A-II [Shelness 등, 1985, J.Biol.Chem. 260(14): 8637-46; Shelness 등, 1984, J.Biol.Chem. 259(15): 9929-35], 아포A-IV [Duverger 등, 1991, Euro.J.Biochem.201(2): 373-83], 아포E [McLean 등, 1983, J.Biol.Chem. 258(14): 8993-9000], 아포J 및 아포H가 사용될 수도 있다. 아포지단백질은, 아포지단백질이 복합체에 포함될 때 생물학적 활성을 보유하는 한, 그의 단리를 촉진하는 요소에 상응하는 잔기, 예컨대 His 꼬리표 또는 다른 목적을 위해 설계된 다른 요소를 포함할 수도 있다.

[0075] 이러한 아포지단백질은 동물 공급원 (특히, 인간 공급원)으로부터 정제될 수 있거나, 또는 당 기술분야에 공지된 바와 같이 재조합에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Chung 등, 1980, J.Lipid.Res. 21(3): 284-91; Cheung 등, 1987, J.Lipid Res. 28(8): 913-29] 참조. 또한, 미국 특허 5,059,528호, 5,128,318호, 6,617,134호 및 미국 공개번호 2002/0156007, 2004/0067873, 2004/0077541 및 2004/026660 참조.

[0076] 여기에 기재된 하전된 복합체 및 조성물에서 아포지단백질로서 사용하기 위해 적절한, 아포지단백질에 상응하는 펩티드 및 펩티드 유사체뿐만 아니라 아포A-I, 아포A-I_M, 아포A-II, 아포A-IV 및 아포E의 활성을 모방하는 작용질의 비-제한적인 예는 미국 특허 6,004,925, 6,037,323 및 6,046,166 (Dasseux 등에게 특허발행됨), 미국 특허 5,840,688호 (Tso에게 특허발행됨), 미국 공개 2004/0266671, 2004/0254120, 2003/0171277 및 2003/0045460 (Fogelman) 및 미국 공개 2003/0087819 (Bielićki)에 개시되어 있으며, 그의 개시내용은 그 전체가 참고문헌으로 포함된다. 이러한 펩티드 및 펩티드 유사체는 L-아미노산 또는 D-아미노산 또는 L- 및 D-아미노산의 혼합물로 구성될 수 있다. 이들은 하나 이상의 비-펩티드 또는 아미드 결합을 포함할 수도 있고, 예컨대 하나 이상의 공지된 펩티드/아미드 동배체를 포함할 수 있다. 이러한 "펩티드 및/또는 펩티드 모방체" 아포지단백질은 미국 특허 6,004,925, 6,037,323 및 6,046,166호에 기재된 기술을 포함하여 당 기술분야에 공지된 펩티드 합성을 위한 기술을 사용하여 합성되거나 제조될 수 있다.

[0077] 하전된 복합체는 단일 유형의 아포지단백질 또는 2 이상의 상이한 아포지단백질의 혼합물을 포함할 수 있고, 이것은 동일하거나 상이한 종으로부터 유래될 수 있다. 요구되지는 않지만, 하전된 지단백질 복합체는, 요법에 대한 면역 반응을 유도하는 것을 피하기 위하여, 처리되는 동물 종으로부터 유래되거나 또는 그의 아미노산 서열에 상응하는 아포지단백질을 포함하는 것이 바람직하다. 펩티드 모방체 아포지단백질의 사용은 면역 반응을 감소시키거나 피할 수 있다.

[0078] 6.2 인지질

[0079] 하전된 복합체 및 조성물의 지질 분획은 2가지 유형의 인지질: 중성 인지질 및 하전된 인지질을 포함한다. 여기에서 사용된 "중성 인지질"은 생리학적 pH에서 약 0의 순 전하를 갖는 인지질이다. 다른 유형의 순 중성 인지질이 공지되어 있고 사용될 수 있긴 하지만 많은 구현양태에서 중성 인지질은 양쪽성이온이다. 중성 인지질은 레시틴 및/또는 SM의 하나 또는 양쪽 모두를 포함하고, 다른 중성 인지질을 임의적으로 포함할 수도 있다. 일부 구현양태에서, 중성 인지질은 레시틴을 포함하지만 SM을 포함하지 않는다. 다른 구현양태에서, 중성 인지질은 SM을 포함하지만 레시틴을 포함하지 않는다. 또 다른 구현양태에서, 중성 인지질은 레시틴 및 SM 양쪽 모두를 포함한다. 이러한 특정한 예시적 구현양태 모두는 레시틴 및/또는 SM에 추가로 중성 인지질을 포함할 수 있지만 많은 구현양태에서 추가의 중성 인지질을 포함하지 않는다.

[0080] 사용된 SM의 정체는 성공을 위해 중요하지 않다. 따라서, 여기에 사용된 바와 같이 표현 "SM"은 천연 공급원으로부터 유래된 스핑고마이엘린 뿐만 아니라 천연 발생 SM에서와 같이 LCAT에 의한 가수분해에 손상되지 않는 천연 발생 SM의 유사체 및 유도체를 포함한다. SM은 레시틴과 구조적으로 매우 유사한 인지질이지만, 레시틴과 달리 글리세롤 주쇄를 갖지 않고 따라서 아실 사슬에 부착되는 에스테르 결합을 갖지 않는다. 오히려, SM은 아실 잔기에 연결된 아미드 결합을 가진 세라미드 주쇄를 갖는다. SM은 LCAT를 위한 기질이 아니고, 일반적으로 그것에 의해 가수분해될 수 없다. 그러나, 이것은 LCAT의 억제제로서 작용할 수 있거나 지질 인지질의 농도를 희석함으로써 LCAT 활성을 저하시킬 수 있다. SM이 가수분해되지 않기 때문에, 이것은 순환에서 더 오랫동안

유지된다. 이러한 특징은, SM을 포함하는 하전된 지단백질 복합체가 더욱 장기간의 약리학적 효과를 갖고 (콜레스테롤의 이동), SM을 포함하지 않는 아포지단백질 복합체에 비하여 더 많은 지질, 특히 콜레스테롤을 취하는 것을 가능하게 할 것으로 기대된다 (예를 들어, 미국 공개 2004/0067873호에 기재된 아포지단백질 복합체, 그의 개시내용은 그 전체가 참고문헌으로 포함된다). 이러한 효과는 SM을 포함하지 않는 지단백질 복합체에서 요구되는 것보다 치료를 위해 덜 빈번하거나 더 작은 투여량이 필요하게 할 것이다.

[0081] SM은 실제로 어떠한 공급원으로부터 유래될 수도 있다. 예를 들어, SM이 우유, 계란 또는 뇌로부터 수득될 수도 있다. 또한, SM 유사체 또는 유도체가 사용될 수도 있다. 유용한 SM 유사체 및 유도체의 비-제한적인 예는, 이에 한정되지 않지만 팔미토일스핑고마이엘린, 스테아로일스핑고마이엘린, D-에리트로-N-16:0-스핑고마이엘린 및 그의 디히드로 이성질체, D-에리트로-N-16:0-디히드로-스핑고마이엘린을 포함한다.

[0082] 천연 공급원으로부터 단리된 스핑고마이엘린은 하나의 특정한 포화 또는 불포화 아실 잔기에서 인공적으로 풍부하게 될 수도 있다. 예를 들어, 우유 스핑고마이엘린 (미국 알라바마주 알라바스터의 아반티 포스포리피드)은 긴 포화 아실 사슬 (즉, 20개 이상의 탄소 원자를 가진 아실 사슬)을 특징으로 한다. 반대로, 계란 스핑고마이엘린은 짧은 포화 아실 사슬 (즉, 20개보다 적은 탄소 원자를 가진 아실 사슬)을 특징으로 한다. 예를 들어, 단지 약 20%의 우유 스핑고마이엘린이 C16:0 (16개 탄소, 포화) 아실 사슬을 포함하는 반면, 약 80%의 계란 스핑고마이엘린이 C16:0 아실 사슬을 포함한다. 용매 추출을 사용하여, 우유 스핑고마이엘린의 조성물이 계란 스핑고마이엘린에 필적하는 아실 사슬 조성물을 갖도록 풍부하게 될 수 있거나, 또는 그 역이 성립된다.

[0083] SM은 특정한 아실 사슬을 갖는 반-합성일 수도 있다. 예를 들어, 우유 스핑고마이엘린은 우유로부터 첫 번째로 정제될 수 있고, 이어서 하나의 특정한 아실 사슬, 예를 들어 C16:0 아실 잔기가 다른 아실 사슬에 의해 절단되고 대체될 수 있다. SM은 예를 들어 대규모 합성에 의하여 완전히 합성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,220,043호 (발명의 명칭: D-에리트로-스핑고마이엘린의 합성, 1993년 6월 15일 특허발행); 문헌 [Weis, 1999, Chem.Phys.Lipids 102(1-2):3-12] 참조.

[0084] 반-합성 또는 합성 SM을 포함하는 아실 사슬의 길이 및 포화 수준이 선택적으로 변할 수 있다. 아실 사슬은 포화 또는 불포화일 수 있고, 약 6 내지 약 24개 탄소 원자를 함유할 수 있다. 각각의 사슬은 동일한 수의 탄소 원자를 함유할 수 있거나, 또는 대안적으로 각각의 사슬이 상이한 수의 탄소 원자를 함유할 수도 있다. 일부 구현양태에서, 반-합성 또는 합성 SM은 하나의 사슬이 포화이고 하나의 사슬이 불포화인 혼합된 아실 사슬을 포함한다. 혼합된 아실 사슬 SM에서, 사슬 길이는 동일하거나 상이할 수 있다. 다른 구현양태에서, 반-합성 또는 합성 SM의 아실 사슬은 양쪽 모두 포화이거나 또는 양쪽 모두 불포화이다. 다시, 사슬은 동일하거나 상이한 수의 사슬 원자를 함유할 수 있다. 일부 구현양태에서, 반-합성 또는 합성 SM을 포함하는 아실 사슬이 양쪽 모두 동일하다. 특정한 구현양태에서, 사슬은 천연 지방산, 예를 들어 올레산, 팔미트산 또는 스테아르산의 아실 사슬에 상응한다. 다른 특정한 구현양태에서, 아실 사슬 양쪽 모두가 포화이고, 6 내지 24개 탄소 원자를 함유한다. 반-합성 및 합성 SM에 포함될 수 있는 일반적으로 발생하는 지방산에 존재하는 아실 사슬의 비-제한적인 예를 하기 표 1에 제공한다:

표 1

길이:불포화 결합의 수	일반명
14:0	미리스틴산
16:0	팔미트산
18:0	스테아르산
18:1 시스 Δ^9	올레산
18:2 시스 $\Delta^{9,12}$	리놀레산
18:3 시스 $\Delta^{9,12,15}$	리노넨산
20:4 시스 $\Delta^{5,8,11,14}$	아라키돈산
20:5 시스 $\Delta^{5,8,11,14,17}$	에이코사펜타엔산 (오메가-3 지방산)

[0085]

[0086] SM과 유사하게, 사용된 레시틴의 정체는 성공을 위해 중요하지 않다. 또한, SM과 유사하게, 레시틴은 천연 공급원으로부터 유래되거나 단리될 수 있거나, 또는 합성적으로 수득될 수 있다. 천연 공급원으로부터 단리된 적절한 레시틴의 예는 이에 한정되지 않지만 계란 포스파티딜콜린 및 대두 포스파티딜콜린을 포함한다. 적절한 레시틴의 추가의 비-제한적 예는 디팔미토일포스파티딜콜린, 디미리스토일포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린 1-미리스토일-2-팔미토일포스파티딜콜린, 1-팔미토일-2-미리스토일포스파티딜콜린, 1-팔미토일-2-스테

아로일포스파티딜콜린, 1-스테아로일-2-팔미토일포스파티딜콜린, 1-팔미토일-2-올레오일포스파티딜콜린, 1-올레오일-2-팔미토일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린 및 그의 에테르 유도체 또는 유사체를 포함한다.

[0087] SM과 유사하게, 천연 공급원으로부터 유래되거나 단리된 레시틴은 특정한 아실 사슬을 포함하도록 강화시킬 수 있다. 반-합성 또는 합성 레시틴을 사용하는 구현양태에서, SM과 관련하여 상기 언급된 바와 같이 아실 사슬의 정체를 선택적으로 바꿀 수 있다. 여기에 기재된 하전된 복합체의 일부 구현양태에서, 레시틴 위의 양쪽 아실 사슬이 동일하다. SM과 레시틴을 모두 포함하는 하전된 지단백질 복합체의 일부 구현양태에서, SM 및 레시틴의 아실 사슬이 모두 동일하다. 특정한 한 구현양태에서, 아실 사슬은 미리스트, 팔미트, 올레 또는 스테아르산의 아실 사슬에 상응한다.

[0088] 지질 분획은 하전된 인지질을 또한 포함한다. 여기에서 사용된 바와 같이 "하전된 인지질"은 생리학적 pH에서 순 전하를 가진 인지질이다. 하전된 인지질은 하나의 유형의 하전된 인지질 또는 2 이상의 상이한, 전형적으로 유사-하전된 인지질의 혼합물을 포함할 수도 있다. 일부 구현양태에서, 하전된 인지질은 음 하전 글리세로인지질이다. 하전된 인지질(들)의 정체(들)는 성공을 위해 중요하지 않다. 적절한 음 하전 인지질의 특정한 예는, 이에 한정되지 않지만 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤 및 포스파티딘산을 포함한다. 일부 구현양태에서, 음 하전 인지질은 하나 이상의 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤 및/또는 포스파티딘산을 포함한다.

[0089] SM 및 레시틴과 유사하게, 음 하전 인지질은 천연 공급원으로부터 유래되거나 또는 화학 합성에 의해 제조될 수 있다. 합성 음 하전 인지질을 사용하는 구현양태에서, 아실 사슬의 정체는 SM과 관련하여 상기 언급된 바와 같이 선택적으로 변화시킬 수 있다. 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체의 일부 구현양태에서, 음 하전 인지질 위의 양쪽 아실기가 동일하다. 여기에 기재된 삼원 및 사원 하전된 지단백질 복합체의 일부 구현양태에서, SM, 레시틴 및 음 하전 인지질 위의 아실 사슬이 모두 동일하다. 특정한 구현양태에서, 하전된 인지질(들) 및/또는 SM은 모두 C16:0 또는 C16:1 아실 사슬을 갖는다. 다른 특정한 구현양태에서, 하전된 인지질(들), 레시틴 및/또는 SM의 아실 사슬은 팔미트산의 아실 사슬에 상응한다. 또 다른 특정한 구현양태에서, 하전된 인지질(들), 레시틴 및/또는 SM의 아실 사슬은 올레산의 아실 사슬에 상응한다.

[0090] 하전된 복합체에 포함되는 음 하전 인지질(들)의 총량은 변할 수 있다. 전형적으로, 지질 분획은 약 0.2 내지 10중량%의 음 하전 인지질(들)을 포함할 것이다. 일부 구현양태에서, 지질 분획은 약 0.2 내지 1중량%, 0.2 내지 2중량%, 0.2 내지 3중량%, 0.2 내지 4중량%, 0.2 내지 5중량%, 0.2 내지 6중량%, 0.2 내지 7중량%, 0.2 내지 8중량% 또는 0.2 내지 9중량%의 총 음 하전 인지질(들)을 포함한다. 일부 구현양태에서, 지질 분획은 약 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0중량%의 총 음 하전 인지질(들), 및/또는 이러한 값을 끝점으로 포함하는 범위를 포함한다. 일부 구현양태에서, 지질 분획은 약 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0중량%의 총 음 하전 인지질(들) 내지 약 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10중량%의 총 음 하전 인지질(들)을 포함한다.

[0091] 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체에서 음 하전 인지질의 포함은, 통상적인 복합체에 비하여 더욱 큰 안정성 (용액 중) 및 더욱 긴 제품 저장 수명을 가진 복합체를 제공할 것으로 기대된다. 또한, 음 하전 인지질의 사용은 입자 응집 (예, 전하 반발에 의한)을 최소화하고 이에 의해 주어진 투여 섭생법에 존재하는 이용가능한 복합체의 수를 효과적으로 증가시키고 간에 의해 인지되지만 신장에 의해 인지되지 않는 복합체의 표적화를 돕는다.

[0092] 일부 아포지단백질은 생체 내에서 하나의 지단백질 복합체로부터 다른 복합체로 교환된다 (이것은 아포지단백질 아포A-I의 경우 사실이다). 이러한 교환 과정 동안에, 아포지단백질은 전형적으로 하나 이상의 인지질 분자를 함께 데려간다. 이러한 성질에 기인하여, 본 명세서에 기재된 하전된 지단백질 복합체는 내인성 HDL에 음 하전 인지질을 "접종"하고 이에 의해 신장에 의한 제거에 대해 더욱 저항성인 알파 입자로 이들을 변형시킬 것으로 기대된다. 따라서, 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 및 조성물의 투여는 HDL의 혈청 수준을 증가시키고/시키거나 내인성 HDL 반감기 뿐만 아니라 내인성 HDL 대사를 변경시킬 것으로 기대된다. 이것은 콜레스테롤 대사 및 역 지질 운반에 변동을 가져올 것으로 기대된다.

[0093] 중성 및 하전된 인지질(들)에 추가로, 지질 분획은 추가의 지질을 포함할 수도 있다. 실제로, 이에 한정되지 않지만 라이소인지질, 갈락토세레브리시드, 강글리오시드, 세레브로시드, 글리세리드, 트리글리세리드 및 콜레스테롤 및 그의 유도체를 포함하는 어떠한 유형의 지질이 사용될 수도 있다.

- [0094] 포함될 때, 일부 경우에 더 많은 임의적인 지질이 포함될 수 있긴 하지만, 이러한 임의적인 지질은 전형적으로 지질 분획의 약 50중량% 미만을 구성할 것이다. 일부 구현양태에서, 하전된 지단백질 복합체의 지질 분획은 임의적인 지질을 포함하지 않는다.
- [0095] 요약 부분에 나타난 바와 같이, 하전된 지단백질 복합체의 지질 분획에 포함되는 중성 인지질(들)의 총량은 변할 수 있고, 전형적으로 포함된 하전된 인지질(들)의 총량과 임의적인 지질이 포함되는지의 여부에 따라 약 50 내지 99.8중량%의 범위이다. 임의적인 지질이 포함되지 않는 특정한 구현양태는 전형적으로 총 중성 인지질(들)을 약 90 내지 99.8중량% 포함할 것이다. 레시틴 및 SM을 모두 포함하는 지질 분획을 위해 적절한 레시틴:SM 물비를 요약 부분에 설명한다.
- [0096] 특정한 구현양태에서, 하전된 지단백질 복합체는, 지질 분획이 실질적으로 약 90 내지 99.8중량%의 SM 및 약 0.2 내지 10중량%의 음 하전 인지질, 예를 들어 약 0.2 내지 1중량%, 0.2 내지 2중량%, 0.2 내지 3중량%, 0.2 내지 4중량%, 0.2 내지 5중량%, 0.2 내지 6중량%, 0.2 내지 7중량%, 0.2 내지 8중량%, 0.2 내지 9중량% 또는 0.2 내지 10중량%의 총 음 하전 인지질(들)로 구성되는 삼원 복합체이다. 다른 특정한 구현양태에서, 하전된 지단백질 복합체는 지질 분획이 실질적으로 약 90 내지 99.8중량%의 레시틴 및 약 0.2 내지 10중량%의 음 하전 인지질, 예를 들어 약 0.2 내지 1중량%, 0.2 내지 2중량%, 0.2 내지 3중량%, 0.2 내지 4중량%, 0.2 내지 5중량%, 0.2 내지 6중량%, 0.2 내지 7중량%, 0.2 내지 8중량%, 0.2 내지 9중량% 또는 0.2 내지 10중량%의 총 음 하전 인지질(들)로 구성되는 삼원 복합체이다.
- [0097] 또 다른 특정한 구현양태에서, 하전된 지단백질 복합체는, 지질 분획이 실질적으로 약 9.8 내지 90중량%의 SM, 약 9.8 내지 90중량%의 레시틴 및 약 0.2 내지 10중량%의 음 하전 인지질, 예를 들어 약 0.2 내지 1중량%, 0.2 내지 2중량%, 0.2 내지 3중량%, 0.2 내지 4중량%, 0.2 내지 5중량%, 0.2 내지 6중량%, 0.2 내지 7중량%, 0.2 내지 8중량%, 0.2 내지 9중량%, 0.2 내지 10중량%의 총 음 하전 인지질(들)로 구성되는 4원 복합체이다.
- [0098] 복합체는 임의로 다른 단백질, 예를 들어 과라옥소나제(PON) 또는 LCAT, 산화방지제, 시클로텍스트린 및/또는 복합체의 코어 또는 표면에 있는 콜레스테롤을 포획하는데 도움이 되는 기타 물질을 포함할 수도 있다. 복합체는 경우에 따라 순환 반감기를 증가시키기 위해 PEG화될 수 있다 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 또는 기타 중합체로 덮힘).
- [0099] 당업자에 의해 인식될 수 있듯이, 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체의 지질 분획 내 아포지단백질 분획의 물비는 변할 수 있으며, 무엇보다도 아포지단백질 분획을 구성하는 아포지단백질의 정체(들), 지질 분획을 구성하는 하전된 인지질의 정체 및 양, 및 하전된 지단백질 복합체의 원하는 크기에 의존한다. 아포A-I와 같은 아포지단백질의 생물학적 활성은 아포지단백질을 구성하는 양극성 나선에 의해 매개되는 것으로 생각되기 때문에, 아포A-I 단백질 당량을 사용하여 지질:아포지단백질 물비의 아포지단백질 분획을 표현하는 것이 편리하다. 일반적으로, 아포A-I는 나선을 계산하기 위해 사용되는 방법에 의존하여 6 내지 10개 양극성 나선을 함유하는 것으로 인정된다. 다른 아포지단백질은 이들이 함유하는 양극성 나선의 수를 기초로 하여 아포A-I 당량으로 표현될 수 있다. 예를 들어, 아포A- I_M 의 각각의 분자가 아포A-I 분자의 2배에 해당하는 양극성 나선을 함유하기 때문에, 전형적으로 디설파이드-다리걸침 이량체로서 존재하는 아포A- I_M 는 아포A-I 2 당량으로 표현될 수 있다. 역으로, 하나의 양극성 나선을 함유하는 펩티드 아포지단백질은 각각의 분자가 아포A-I 분자의 1/10 내지 1/6에 해당하는 양극성 나선을 함유하기 때문에, 1/10 내지 1/6 아포A-I 당량으로 표현될 수 있다. 일반적으로, 하전된 지단백질 복합체의 지질:아포A-I 당량 물 비 (여기에서 "R_i"로 정의됨)는 약 2:1 내지 100:1의 범위일 것이다. 일부 구현양태에서, R_i는 약 50:1이다. 인지질에 대해 약 650 내지 800의 MW를 사용하여 중량비가 수득될 수 있다.
- [0100] 하전된 지단백질 복합체의 크기는 R_i를 변화시킴으로써 제어될 수 있다. 다시 말해서, R_i가 더 작을수록 원반이 더 작아진다. 예를 들어, 큰 원반상 원반은 전형적으로 약 200:1 내지 100:1 범위의 R_i를 갖는 반면, 작은 원반상 원반은 전형적으로 약 100:1 내지 30:1 범위의 R_i를 갖는다.
- [0101] 특정한 구현양태에서, 하전된 지단백질 복합체는 아포A-I 2-4 당량 (예를 들어, 2 내지 4 분자의 아포A-I, 1 내지 2 분자의 아포A- I_M 이량체, 또는 6 내지 10개의 단일-나선 펩티드 분자), 1 분자의 하전된 인지질 및 400 분자의 총 중성 인지질을 함유하는 큰 원반상 원반이다. 다른 특정한 구현양태에서, 하전된 지단백질 복합체는 아포A-I 2 내지 4 당량, 1 분자의 하전된 인지질 및 200 분자의 총 중성 인지질을 함유하는 작은 원반상 원반이다.

- [0102] 하전된 지단백질 복합체를 구성하는 다양한 아포지단백질 및/또는 인지질 분자를, 안정한 동위원소 (예를 들어, ^{13}C , ^{15}N , ^2H 등); 방사능 동위원소 (예를 들어, ^{14}C , ^3H , ^{125}I 등); 형광단; 화학발광제; 또는 효소 마커를 포함하여 공지된 검출가능한 마커로 표지화할 수 있다.
- [0103] **6.3. 하전된 지단백질 복합체의 제조 방법**
- [0104] 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체를 이에 한정되지 않지만 소포, 리포솜, 단백질리포솜, 미포 및 원반상 입자를 포함하는 다양한 형태로 제조할 수 있다. 하전된 지단백질 복합체를 제조하기 위하여 당업자에게 공지된 다양한 방법을 사용할 수 있다. 리포솜 또는 단백질리포솜을 제조하기 위해 이용가능한 다수의 기술이 사용될 수도 있다. 예를 들어, 복합체를 형성하기 위하여 아포지단백질을 적절한 인지질과 동시-초음파처리할 수 있다 (옥조 또는 프로브 초음파처리장치 사용). 대안적으로, 아포지단백질을 미리형성된 지질 소포와 조합하여 하전된 지단백질 복합체가 자발적으로 형성되게 할 수 있다. 세제 투석 방법에 의하여; 예를 들어, 아포지단백질, 하전된 인지질(들) SM 및/또는 레시틴 및 세제, 예컨대 콜레이트의 혼합물을 투석하여 세제를 제거하고 재구성하여 하전된 지단백질 복합체를 형성함으로써 (예를 들어 [Jonas 등, 1986, Methods in Enzymol. 128: 553-82] 참조), 또는 압출기 장치를 사용함으로써, 또는 균질화에 의하여, 하전된 지단백질 복합체를 형성할 수 있다.
- [0105] 일부 구현양태에서, 미국 공개 2004/0067873 (그의 개시내용이 참고문헌으로 포함된다)의 실시예 1에 기재된 콜레이트 분산 방법에 의하여 하전된 지단백질 복합체를 제조할 수 있다. 간략하게, 무수 지질을 NaHCO_3 완충액에 수화시킨 다음 와류시키고 모든 지질이 분산될 때까지 초음파처리한다. 콜레이트 용액을 첨가하고, 투명해질 때까지 주기적으로 와류시키고 초음파처리하면서 혼합물을 30분 동안 항온처리하고, 이것은 지질 콜레이트 미포가 형성됨을 나타낸다. NaHCO_3 완충액 중의 프로아포A-I를 첨가하고, 약 37°C 내지 50°C 의 온도에서 용액을 1 시간 동안 항온처리한다. 용액 중의 지질:프로아포A-I의 비율은 1:1 내지 200:1 (몰/몰)일 수 있지만, 일부 구현양태에서 비율은 약 2:1의 지질 중량 대 단백질 중량이다 (wt/wt).
- [0106] 당 기술분야에 공지된 방법에 의하여 콜레이트를 제거할 수 있다. 예를 들어, 투석, 한외여과에 의해 또는 친화성 비드 또는 수지 상에 흡착 흡수에 의한 콜레이트 분자의 제거에 의해 콜레이트를 제거할 수 있다. 하나의 구현양태에서, 콜레이트를 흡착시키기 위하여, 친화성 비드, 예를 들어 바이오-비드(BIO-BEADS)^(R) (바이오-래드 래보러토리즈)를 하전된 지단백질 복합체 및 콜레이트의 제조에 첨가한다. 다른 구현양태에서, 친화성 비드로 충전된 컬럼에 걸쳐, 하전된 지단백질 복합체 및 콜레이트의 제제, 예를 들어 미포 제제를 통과시킨다.
- [0107] 특정한 구현양태에서, 주사기 내에서 바이오-비드^(R) 위에 제제를 부하함으로써 하전된 지단백질 복합체의 제조로부터 콜레이트를 제거한다. 이어서, 주사기를 차단 필름으로 밀봉하고 4°C 에서 밤새 진동시키면서 항온처리한다. 사용 전에, 바이오-비드^(R)를 통해 용액을 주입함으로써 콜레이트를 제거하고, 여기에서 비드에 의해 콜레이트가 흡착된다.
- [0108] 하전된 지단백질 복합체는 복합체가 HDL, 특히 프리-베타-1 또는 프리-베타-2 HDL 집단에서의 HDL과 유사한 크기 및 밀도를 가질 때 순환에서 증가된 반감기를 갖는 것으로 예상된다. 긴 저장 수명을 가진 안정한 제제는 동결건조에 의해 만들어질 수 있다. 예를 들어, 하기 기재된 동시-동결건조 절차는 안정한 제제 및 제형/입자 제조 공정의 용이성을 제공한다. 동시-동결건조 방법은 미국 특허 6,287,590호 (발명의 명칭: 동시-동결건조에 의한 펩티드/지질 복합체 형성, Dasseux, 2001년 9월 11일 특허발행) (전체 내용이 참고문헌으로 포함된다)에 기재되어 있다. 제약학적 재제형을 위한 벌크 공급을 제조하기 위하여, 또는 환자에게 투여하기 전에 멸균수 또는 적절한 완충 용액으로 재수화함으로써 재구성될 수 있는 개개의 부분표본 또는 투여 단위를 제조하기 위하여, 동결건조된 하전된 지단백질 복합체가 사용될 수 있다.
- [0109] 미국 특허 6,004,925호, 6,037,323호, 6,046,166호 및 6,287,590호 (여기에서 전체내용이 참고문헌으로 포함됨)는, HDL과 유사한 특징을 가진 하전된 지단백질 복합체의 간단한 제조 방법을 개시하고 있다. 유기 용매 (또는 용매 혼합물) 중에서 아포지단백질 및 지질 용액의 동시-동결건조 및 동결건조된 분말의 수화 동안에 하전된 지단백질 복합체의 형성과 연관된 이 방법은, (1) 방법이 매우 적은 단계를 필요로 하고; (2) 방법이 저렴한 용매(들)를 사용하며; (3) 계획된 복합체를 형성하기 위해 포함된 성분의 대부분 또는 전부가 사용되어, 다른 방법과 공통적인 출발 물질의 소모를 피할 수 있고; (4) 사용 직전에 복합체가 재구성될 수 있도록 저장 동안에 매우 안정한 동결건조 복합체가 형성되고; (5) 얻어지는 복합체가 형성 후 및 사용 전에 더욱 정제될 필요가 없고; (6) 콜레이트와 같은 세제를 포함한 독성 화합물을 피할 수 있고; (7) 제조 방법이 쉽게 규모를 늘

릴 수 있고 (다시말해서, 무-내독소 환경에서) GMP 제조를 위해 적절하다는 장점을 갖는다.

- [0110] 일부 구현양태에서, 하전된 지단백질 복합체를 제조하기 위하여 당 기술분야에 공지된 동시-동결건조 방법이 사용된다. 간략하게, 동시-동결건조 단계는 아포지단백질 ("아포") 및 인지질을 유기 용매 또는 용매 혼합물 중에서 함께 용해시키거나, 아포 및 인지질을 별도로 용해시킨 다음 이들을 함께 혼합하는 것을 포함한다. 용매 또는 용매 혼합물의 바람직한 특징은, (i) 소수성 지질 및 양극성 단백질을 용해시킬 수 있는 중간 상대 극성, (ii) 잔류 유기 용매와 관련된 잠재적인 독성을 피하기 위하여, FDA 용매 지침에 따른 부류 2 또는 3의 용매 (Federal Register, Volume 62, No.247), (iii) 동결건조 동안에 용매 제거의 용이성을 보장하기 위한 낮은 비점, (iv) 더욱 빠른 동결, 더욱 높은 응축장치 온도 및 동결-건조장치의 낮은 도기를 대비하기 위한 높은 융점이다. 바람직한 구현양태에서, 빙초산이 사용된다. 예를 들어, 메탄올, 빙초산, 크실렌 또는 시클로헥산의 조합이 사용될 수도 있다.
- [0111] 이어서, 아포/지질 용액을 동결건조하여 균질한 아포/지질 분말을 수득한다. 동결건조된 아포/지질 분말 중에서 최소량의 잔류 용매를 갖도록 용매를 빠르게 증발시키기 위해 동결건조 조건을 최적화할 수 있다. 동결-건조 조건의 선택은 당업자에 의해 결정될 수 있고 용매의 성질, 용기, 예를 들어 바이알의 종류 및 치수, 유지 용액, 충전 부피 및 사용된 동결-건조장치의 특징에 의존된다. 유기 용매 제거 및 복합체의 성공적인 형성을 위하여 동결건조에 앞서서 지질/아포 용액의 농도는 10 내지 50mg/ml 농도의 아포A-I 당량 및 20 내지 100mg/ml 농도의 지질의 범위일 수 있다.
- [0112] 적절한 pH 및 삼투압의 수성 매질로 아포-지질 동결건조 분말을 수화한 후에 아포-지질 복합체가 자발적으로 형성된다. 일부 구현양태에서, 매질은 슈크로스, 트레할로스, 글리세린 등과 같은 안정화제를 함유할 수도 있다. 일부 구현양태에서, 용액을 복합체가 형성되는 지질의 전이 온도 이상에서 여러 번 가열해야 한다. 하전된 지단백질 복합체의 성공적인 형성을 위하여 지질 대 단백질의 몰 비는 2:1 내지 200:1일 수 있고 (아포A-I 당량으로 표현됨), 바람직하게는 약 2:1의 지질 중량 대 단백질 중량 (wt/wt)이다. 아포A-I 단백질 당량으로 표현되는 약 5 내지 30mg/ml의 최종 복합체 농도를 수득하기 위하여 분말을 수화시킨다.
- [0113] 일부 구현양태에서, NH_4CO_3 수용액 중에서 아포 용액을 동결-건조시킴으로써 아포 분말을 수득한다. 빙초산 중에서 분말 및 아포를 용해시킴으로써 아포 및 지질의 균질한 용액을 형성한다. 이어서 용액을 동결건조시키고, 동결건조된 분말을 수성 매질과 수화함으로써 HDL-유사 하전된 지단백질 복합체를 형성한다.
- [0114] 일부 구현양태에서, 아포-지질 복합체를 제조하기 위해 균질화를 사용한다. 아포 대두-PC 복합체를 제조하기 위해 이러한 방법을 사용할 수도 있고, 아포A-III-POPC 복합체의 형성을 위해 보통 사용된다. 하전된 지단백질 복합체의 형성을 위하여 균질화가 쉽게 순응될 수 있다. 간략하게, 이 방법은 울트라투렉스(Ultratux)TM에 의하여 아포의 수용액 중에서 지질의 현탁액을 형성하고, 현탁액이 투명-유백색 용액이 되고 복합체가 형성될 때까지 고압 균질화장치를 사용하여 형성된 지질-단백질 현탁액을 균질화한다. 균질화 동안에 지질 전이 온도보다 높은 온도를 사용한다. 연장된 시간 1 내지 14시간 동안 높은 압력에서 용액을 균질화한다.
- [0115] 일부 구현양태에서, 펩티드 또는 단백질 용액 또는 현탁액과 인지질을 동시-동결건조함으로써 하전된 지단백질 복합체를 형성할 수 있다. 유기 용매 또는 유기 용매 혼합물 중에서 펩티드/단백질, 하전된 인지질, SM 및/또는 레시틴 (+ 선택되는 다른 인지질)의 균질한 용액을 동결건조할 수 있고, 동결건조된 분말을 수성 완충액으로 수화함으로써 자발적으로 하전된 지단백질 복합체를 형성할 수 있다. 유기 용매 또는 그의 혼합물의 예는, 이에 한정되지 않지만 아세트산, 아세트산 및 크실렌, 아세트산 및 시클로헥산, 및 메탄올 및 크실렌을 포함한다.
- [0116] 얻어진 복합체가 적절한 물리적 및 화학적 성질을 갖도록; 다시 말해서 보통 (반드시 필요하지는 않지만) HDL과 크기가 유사하도록, 지질에 대한 단백질 (펩티드)의 적절한 비율을 실험적으로 결정할 수 있다. 용매 중에서 아포 및 지질의 혼합물을 동결시키고 건조상태로 동결건조시킨다. 때때로, 동결건조를 촉진하기 위하여 추가의 용매를 혼합물에 첨가해야 한다. 이러한 동결건조된 생성물은 장 기간동안 저장할 수 있고 안정하게 유지될 수 있는 것으로 기대된다.
- [0117] 하전된 지단백질 복합체의 용액 또는 현탁액을 수득하기 위하여 동결건조된 생성물을 재구성할 수 있다. 이것 때문에, 예를 들어 정맥 주사를 위해 편리한 적절한 부피 (전형적으로 5 내지 20mg 하전된 지단백질 복합체/ml)까지, 동결 건조된 분말을 수성 용액으로 재수화한다. 바람직한 구현양태에서, 동결건조된 분말을 인산염 완충 염수, 염수 중탄산염 또는 생리학적 염 용액으로 재수화한다. 재수화를 촉진하기 위하여 혼합물을 교반하거나 와류시킬 수 있다. 일반적으로, 복합체의 액체 성분의 상 전이 온도와 동일하거나 그보다 높은 온도에서 재구성 단계를 수행해야 한다. 수분의 재구성 내에, 재구성된 하전된 지단백질 복합체의 투명한 제제가 얻어져

야 한다.

- [0118] 다른 방법은 분무-건조를 포함하고, 이 방법에서는 용액을 분무하고 용매를 증발시킨다 (높은 온도에서 또는 감압 하에). 액체 및 아포지단백질을 동일한 용매 중에 또는 상이한 용매 중에 용해시킬 수 있다. 이어서, 바이알을 충전하기 위하여 분말 충진을 사용할 수 있다.
- [0119] 아포지단백질 및 지질로부터 동결건조된 분말을 기계적으로 혼합할 수 있다. 적절한 크기 및 적절한 지질:아포지단백질 물비의 복합체를 자발적으로 형성하기 위하여 아포지단백질 및 지질을 함유하는 균질한 분말을 수화시킬 수 있다.
- [0120] 얻어지는 재구성 제제를 분취하여 제제 중의 복합체가 바람직한 크기 분포, 예를 들어 HDL의 크기 분포를 갖는 것을 확인하기 위해 분석할 수 있다. 이에 한정되지 않지만 크기 배제 여과, 겔 여과, 컬럼 여과, 겔 투과 크로마토그래피 및 비-변성 겔 전기영동을 포함하여, 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 재구성된 제제의 분석을 수행할 수 있다.
- [0121] 예를 들어, 동결건조된 하전된 지단백질 분말의 수화 후에 또는 균질화 또는 콜레이트 투석의 마지막에, 형성된 아포-지질 HDL 유사 입자는 그들의 크기, 농도, 최종 pH 및 용액의 삼투성에 대해 분석되고, 일부 경우에 지질 및/또는 아포지단백질의 무결성을 분석한다. 얻어지는 하전된 지단백질 입자의 크기는 그들의 효능을 결정하고 따라서 이러한 측정이 입자의 분석에 포함된다.
- [0122] 일부 구현양태에서, 겔 투과 크로마토그래피 (GPC), 예를 들어 1×30cm 슈퍼텍스™ 컬럼 (파마시아 바이오테크) 및 UV-검출기와 장착된 고압 액체 크로마토그래피 시스템을 사용할 수 있다. 0.5ml/분 유동 속도로 전달되는 140 mM NaCl 및 20 mM 중탄산나트륨으로 이루어진 중탄산염 완충 염수로 복합체를 용출시킨다. 주입된 복합체의 전형적인 양은 단백질 중량을 기준으로 하여 0.1 내지 1mg이다. 280nm에서의 흡광도에 의하여 복합체를 검사할 수 있다.
- [0123] 하전된 지단백질 입자 용액의 단백질 및 지질 농도는, 이에 한정되지 않지만 단백질 및 인지질 분석 뿐만 아니라 HPLC, 겔 여과 크로마토그래피, 질량 분광분석법을 포함하여 다양한 검출장치와 결합된 GC, UV 또는 다이오드-분석, 형광체, 탄성 광 산란 및 기타 방법을 포함하여 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 동일한 크로마토그래피 기술 뿐만 아니라 펩티드 지도화, SDS-PAGE 겔, 단백질에 대한 N- 및 C-말단 서열결정, 및 지질에 대한 지질 산화를 결정하기 위한 표준 분석에 의하여 지질 및 단백질의 무결성이 결정될 수 있다.
- [0124] 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물의 균일성 및/또는 안정성은, 이에 한정되지 않지만 겔 여과 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 방법을 포함하는 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현양태에서, 하나의 피크 또는 제한된 수의 피크가 안정한 복합체와 결합될 수 있다. 시간에 걸쳐 새로운 피크의 외관을 검사함으로써 복합체의 안정성이 결정될 수 있다. 새로운 피크의 외관은 입자의 불안정성에 기인하여 복합체 중에서 재편성을 나타내는 징후이다.
- [0125] 이에 한정되지 않지만 겔 전기영동 이동성 분석, 크기 배제 크로마토그래피, HDL 수용체와의 상호작용, ATP-결합 카세트 운반체에 의한 인지 (ABCA1), 간에 의한 흡수, 및 약동학/약력학을 포함하는 당 기술분야에 공지된 다수의 기능적 분석을 사용하여, 하전된 복합체에서 인지질 대 아포지단백질(들)의 최적 비율을 결정할 수 있다. 예를 들어, 하전된 복합체에서 인지질 대 아포지단백질의 최적 비율을 결정하기 위해 겔 전기영동 이동성 분석을 사용할 수 있다. 여기에 기재된 하전된 복합체는 천연 프리-베타-HDL 또는 알파-HDL 입자와 유사한 전기영동 이동성을 나타내어야 한다. 따라서, 일부 구현양태에서, 하전된 복합체의 이동성을 결정하기 위하여 천연 프리-베타-HDL 또는 알파-HDL 입자가 표준으로서 사용될 수 있다.
- [0126] 다른 예로서, 천연 프리-베타-HDL 입자에 비하여 여기에 기재된 하전된 복합체의 크기를 결정하기 위하여 크기 배제 크로마토그래피가 사용될 수 있다. 천연 프리-베타-HDL 입자는 일반적으로 크기가 10 내지 12 nm 이하이고, 원반상 입자는 보통 7 내지 10 nm 부근이다.
- [0127] 다른 예로서, 어떠한 복합체가 천연 프리-베타-HDL 입자에 가장 가까운지를 확인하기 위하여 또는 어떠한 복합체가 세포로부터 콜레스테롤 또는 지질을 제거 및/또는 이동시키는데 가장 효과적인지를 확인하기 위하여 HDL 수용체가 작용 분석에서 사용될 수 있다. 하나의 분석에서, ABCA-1 수용체를 결합하는 능력에 대하여 복합체를 시험할 수 있다. 이러한 분석은 콜레스테롤의 독립적 제거에 의존하여 ABCA-1을 구별할 수 있다. 아포A-I가 이러한 분석을 위해 최선의 리간드로 간주된다 하더라도, 작은 미포 또는 작은 원반상 입자와 같은 복합체가 강력한 ABCA-I 리간드이다. 사용될 수 있는 ABCA-1 결합 분석은 문헌 [Brewer 등, 2004,

Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 24: 1755-1760]에 기재되어 있다.

- [0128] 다른 예로서, ABCA1 발현 세포는 자유 아포A-1를 인식하고 더 적은 정도로 천연 프리-베타-HDL 입자를 인식하는 것으로 알려져 있다 [Brewer 등, 2004, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24:1755-1760]. 이러한 구현양태에서, 천연 프리-베타-HDL 입자의 ABCA1 세포의 인식은 천연 프리-베타-HDL 입자와 가장 근접하게 닮은 복합체를 확인하기 위하여 여기에 기재된 하전된 복합체의 어느 하나와 비교될 수 있다.
- [0129] 천연 프리-베타-HDL 입자를 가장 근접하게 닮은 하전된 복합체를 확인하기 위해 비교적 간단한 접근법은, 재구성된 하전된 복합체를 함유하는 용액으로 간을 관류시키고 간에 의해 흡수된 양을 측정하는 것이다.
- [0130] 일부 구현양태에서, 토끼에서 1회 주사 후에 하전된 복합체의 약동학/약력학(PK/PD)을 측정할 수 있다. 이러한 구현양태에서, 아포A-1의 농도가 동력학의 마커로서 사용된다. 단일 주사 후 기준선 위로 이동된 콜레스테롤의 양 뿐만 아니라 HDL 분획에서의 콜레스테롤 양으로서 약력학을 측정할 수 있다. PK 및 PD는 인지질의 성질, 인지질의 조성, 지질:아포지단백질 물비 및 복합체의 인지질 농도에 의존한다. 예를 들어, 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC)/아포A-1 복합체는 계란 포스파티딜콜린(EPC)/아포A-I 복합체에 비해 더욱 긴 반감기를 갖는다. 스팅고마이엘린/아포A-1 복합체는 EPC/아포A-1 복합체에 비해 더욱 긴 반감기를 갖는다. 인간에서 인간 아포A-1의 반감기는 약 5 내지 6일이다.
- [0131] 다른 구현양태에서, 하전된 복합체의 약력학은 시간에 걸쳐 HDL 분획에서 콜레스테롤 에스테르화 속도에 의해 측정될 수 있다. LCAT는 혈액 중에서 콜레스테롤 에스테르화의 원인이 되는 유일한 효소이다. 콜레스테롤 에스테르화 속도는 입자의 품질을 평가하기 위해 양호한 매개변수이다. LCAT는 분자 프로브로서 작용하고, 4원 복합체가 LCAT에 의해 인식된다면 에스테르화 속도가 더 높을 것이다. 이것은, 표면이 이상적이고 전하가 이상적이고 형태학이 이상적이고 2개의 기질 (LCAT는 먼저 인지질로부터 아실 사슬을 가수분해하고 (에스테라제 활성), 이어서 콜레스테롤로부터 자유 OH를 에스테르화하여 (에스테라제 활성) 콜레스테릴 에스테르를 형성한다)을 적절한 농도로 이용할 수 있음을 의미한다. 또한, 이것은, 입자가 반응 생성물, 즉 라이소인지질 및 콜레스테릴 에스테르를 용해하고 포획하도록 하는 크기를 갖고 구성됨을 의미하며, 그렇지 않으면 반응이 정지될 것이다.
- [0132] **6.4 제약학적 조성물**
- [0133] 본 개시내용에 의해 계획되는 제약학적 조성물은 생체내에서 투여 및 전달을 위해 적절한 제약학적으로 허용가능한 담체 내에 활성 성분으로서 하전된 지단백질 복합체를 포함한다. 펩티드는 산성 및/또는 염기성 말단 및/또는 측쇄를 포함할 수 있기 때문에, 펩티드 모방체 아포지단백질이 자유 산 또는 염기의 형태로, 또는 제약학적으로 허용가능한 염의 형태로 조성물에 포함될 수 있다. 아마이드화, 아실화, 아세틸화 또는 PEG화 단백질과 같은 개질 단백질이 또한 사용될 수 있다.
- [0134] 주사가능한 조성물은 수성 또는 유성 부형제 중에 활성 성분의 멸균 현탁액, 용액 또는 에멀전을 포함한다. 조성물은 제형화 제, 예컨대 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 포함할 수 있다. 주사용 조성물이 단위 투여 형태, 예를 들어 앰플 또는 다용량 용기에 존재할 수 있고, 첨가된 보존제를 포함할 수 있다. 주입을 위하여 조성물은 하전된 지단백질 복합체와 상용가능한 물질, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트 또는 당 기술분야에 공지된 다른 상용성 물질로 만들어진 주입 주머니로 공급될 수 있다.
- [0135] 대안적으로, 주사가능한 조성물은, 이에 한정되지 않지만 무균 무 발열물질 물, 완충액, 텍스트로스 용액 등을 포함하여 적절한 부형제로 사용 전에 재구성하기 위한 분말 형태로 제공될 수 있다. 이를 위하여, 아포가 동결 건조될 수 있거나 또는 동시-동결건조된 하전된 지단백질 복합체가 제조될 수 있다. 저장된 조성물은 단위 투여 형태로 공급될 수 있고 사용 전에 생체내에서 재구성될 수 있다.
- [0136] 장기간의 전달을 위하여, 활성 성분을 이식, 예를 들어 피하, 피내 또는 근육내 주사에 의하여 투여를 위한 데포 조성물로서 제형할 수 있다. 예를 들어, 아포-지질 복합체 또는 아포지단백질 단독은 적절한 중합체 또는 소수성 물질 (예를 들어, 허용가능한 오일 중의 에멀전으로서)과 함께 또는 인지질 발포체 또는 이온 교환 수지 중에서 제형화될 수도 있다.
- [0137] 대안적으로, 경피 흡수를 위해 활성 성분을 느리게 방출하는 접착 원반 또는 패치로서 제조된 피부통과 전달 체계가 사용될 수 있다. 이를 위하여, 활성 성분의 피부통과 침투를 촉진하기 위하여 침투 증진제가 사용될 수 있다. 특정한 장점은, 허혈성 심장 질환 및 고콜레스테롤혈증을 가진 환자에서 사용하기 위한 니트로글리세린 패치 내에 여기에 기재된 하전된 복합체를 혼입함으로써 달성될 수 있다.

- [0138] 대안적으로, 카테터 또는 관류장치를 사용하여 (혈관벽 내에서) 전달을 국소적으로 또는 같은 곳에서 수행할 수 있다 (예를 들어, 미국 공개 2003/0109442 참조).
- [0139] 원한다면, 활성 성분을 포함하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 포함할 수도 있는 팩 또는 분배장치에 조성물이 존재할 수 있다. 팩은 예를 들어 금속 또는 플라스틱 호일, 예컨대 블리스터 팩을 포함할 수 있다. 팩 또는 분배장치는 투여를 위한 지시를 수반할 수 있다.
- [0140] **6.5 치료 방법**
- [0141] 사실상 지단백질 복합체가 유용한 것으로 밝혀진 모든 목적을 위하여 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 및 조성물을 사용할 수 있다. 특정한 구현양태에서, 이상지질혈증 및/또는 이상지질혈증과 관련된 임의의 질환, 상태 및/또는 질병을 치료 또는 예방하기 위하여 복합체 및 조성물이 사용될 수 있다. 여기에 사용된 바와 같이, 용어 "이상지질혈증" 또는 "이상지질혈증의"는 이에 한정되지 않지만 하기 상태: 관상 심장 질환; 관상 동맥 질환; 심장혈관 질환, 고혈압, 재협착, 혈관 또는 혈관주위 질환; 이상지질혈증; 이상지질단백혈증; 높은 수준의 저밀도 지단백질 콜레스테롤; 높은 수준의 초 저밀도 지단백질 콜레스테롤; 낮은 수준의 고밀도 지단백질; 높은 수준의 지단백질 Lp(a) 콜레스테롤; 높은 수준의 아포지단백질 B; 죽상경화증 (죽상경화증의 치료 및 예방 포함); 고지질혈증; 고콜레스테롤혈증; 가족성 고콜레스테롤혈증(FH); 가족성 조합 고지질혈증(FCH); 지단백질 리파제 결핍증, 예컨대 고트리글리세리드혈증, 저알파지단백혈증 및 고콜레스테롤혈증지단백질과 연관된 변경된 지질 수준을 포함하여, 혈액 혈장에서 비정상적으로 높거나 낮은 수준의 지질을 가리킨다.
- [0142] 이상지질혈증과 관련된 질병은 이에 한정되지 않지만 관상 심장 질환, 관상 동맥 질환, 급성 관상 증후군, 심장 혈관 질환, 고혈압, 재협착, 혈관 또는 혈관주위 질환; 이상지질혈증; 이상지질단백혈증; 높은 수준의 저밀도 지단백질 콜레스테롤; 높은 수준의 초 저밀도 지단백질 콜레스테롤; 낮은 수준의 고밀도 지단백질; 높은 수준의 지단백질 Lp(a) 콜레스테롤; 높은 수준의 아포지단백질 B; 죽상경화증 (죽상경화증의 치료 및 예방 포함); 고지질혈증; 고콜레스테롤혈증; 가족성 고콜레스테롤혈증(FH); 가족성 조합 고지질혈증(FCH); 지단백질 리파제 결핍증, 예컨대 고트리글리세리드혈증, 저알파지단백혈증 및 고콜레스테롤혈증지단백질을 포함한다.
- [0143] 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 및 조성물을 사용하여, 당 기술분야에 공지된 유효 투여량에 비하여 약 2- 내지 25-배 적은 (아포A-I 당량으로) 범위의 인지질 투여량이, 질환을 치료 또는 예방하거나 또는 개선 효과를 일으키는데 효과적인 것으로 기대된다.
- [0144] 하나의 구현양태에서, 방법은 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물을 투여 후 적어도 1일 동안 투여 전의 기준선 (초기)에 비해 약 10 mg/dL 내지 300 mg/dL 높은 범위에 있는 자유 또는 복합체화 아포지단백질의 혈청 수준을 달성하기 위해 효과적인 양으로 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 이상지질혈증과 관련된 질환의 치료 또는 예방 방법을 포함한다.
- [0145] 다른 구현양태에서, 방법은 투여 전의 초기 HDL-콜레스테롤 분획에 비하여 적어도 약 10% 높은, 투여 후 적어도 1일 동안 HDL-콜레스테롤 분획의 순환 혈장 농도를 달성하기에 효과적인 양으로 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 이상지질혈증과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.
- [0146] 다른 구현양태에서, 방법은 투여 후 5분 내지 1일에 30 내지 300 mg/dL의 HDL-콜레스테롤 분획의 순환 혈장 농도를 달성하기에 효과적인 양으로 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 이상지질혈증과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.
- [0147] 다른 구현양태에서, 방법은 투여 후 5분 내지 1일에 30 내지 300 mg/dL의 콜레스테롤 에스테르의 순환 혈장 농도를 달성하기에 효과적인 양으로 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 이상지질혈증과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.
- [0148] 또 다른 구현양태에서, 방법은 투여 후 적어도 1일 동안 투여 전의 기준선 (초기) 수준보다 적어도 약 10% 상승된 대변 콜레스테롤 배출 증가를 달성하기에 효과적인 양으로 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 이상지질혈증과 관련된 질환의 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.
- [0149] 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물을 단독으로 또는 상기 상태를 치료 또는 예방하기 위해 사용되는 다른 약물과의 조합 요법으로 사용할 수 있다. 이러한 요법은, 이에 한정되지 않지만 관련된 약물의 동시 또는 연속 투여를 포함한다. 예를 들어, 고콜레스테롤혈증 또는 죽상경화증의 치료에서, 하전된 지단백질 제제를 통상 사용되는 콜레스테롤 저하 요법: 예를 들어, 담즙산 수지, 니아신, 스타틴, 콜레스테롤 흡수 억제

제 및/또는 피브레이트의 어느 하나 또는 그 이상과 함께 투여할 수 있다. 각각의 약물이 콜레스테롤 합성 및 운반에서 상이한 표적에 작용하기 때문에 이러한 조합 섭생법은 특히 유리한 치료 요법을 생성할 수 있다; 다시 말해서, 담즙산 수지는 콜레스테롤 재순환, 킬로마이크론 및 LDL 집단에 영향을 미치고; 니아신은 주로 VLDL 및 LDL 집단에 영향을 미치고; 스타틴은 콜레스테롤 합성을 억제하여 LDL 집단을 감소 (아마도 LDL 수용체 발현을 증가시킴)시키는 반면; 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체는 RCT에 영향을 미치고 HDL을 증가시키고 콜레스테롤 유출을 촉진한다.

[0150] 다른 구현양태에서, 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물을 관상 심장 질환, 관상 동맥 질환, 심장혈관 질환, 고혈압, 재협착, 혈관 또는 혈관주위 질환; 이상지질혈증; 이상지질단백혈증; 높은 수준의 저밀도 지단백질 콜레스테롤; 높은 수준의 초 저밀도 지단백질 콜레스테롤; 낮은 수준의 고밀도 지단백질; 높은 수준의 지단백질 Lp(a) 콜레스테롤; 높은 수준의 아포지단백질 B; 죽상경화증 (죽상경화증의 치료 및 예방 포함); 고지질혈증; 고콜레스테롤혈증; 가족성 고콜레스테롤혈증(FH); 가족성 조합 고지질혈증(FCH); 지단백질 리파제 결핍증, 예컨대 고티리글리세리드혈증, 저알파지방단백혈증 및 고콜레스테롤혈증지단백질을 치료 또는 예방하기 위해 피브레이트와 함께 사용할 수도 있다. 일례의 제형 및 치료 섭생법을 하기에 설명한다.

[0151] 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물은 순환에서 생체이용가능성을 보장하기에 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. SM을 포함하는 중요한 특징 구현양태는, 하전된 지단백질 복합체를, 단독으로 투여된 아포 지단백질(아포) 또는 아포 펩티드를 위해 효과적인 것으로 기대되는 유효 투여량의 1 내지 10% 미만의 투여량으로, 그리고 아포-대두 PC (또는 아포-계란 PC 또는 아포-POPC) 투여를 위해 필요한 유효 투여량의 2 내지 25배 미만의 투여량으로 투여할 수 있다는 것이다. 현재 이용가능한 치료 섭생법에 의해 다량의 아포지단백질 (매 2 내지 5일마다 투여 당 20 mg/kg 내지 100 mg/kg, 평균 체격 1인 당 1.4 g 내지 8 g)이 요구되는 것이 아니라, 매 2 내지 10일마다 개인 당 약 40 mg 내지 2 g 정도로 낮은 아포지단백질의 투여가 요구된다.

[0152] 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물을 작은 HDL 분획, 예를 들어 프리-베타, 프리-감마 및 프리-베타-유사 HDL 분획, 알파 HDL 분획, HDL3 및/또는 HDL2 분획을 증가시키는 투여량으로 투여할 수 있다. 일부 구현양태에서, 이 투여량은 자기 공명 영상화(MRI) 또는 혈관내 초음파(IVUS)와 같은 영상화 기술에 의해 측정될 때 죽상경화증 플라크 감소를 달성하기에 효과적이다. IVUS에 의해 추적하는 매개변수는, 이에 한정되지 않지만 기준선으로부터 퍼센트 죽종 부피의 변화 및 전체 죽종 부피의 변화를 포함한다. MRI에 의해 추적하는 매개변수는, 이에 한정되지 않지만 IVUS에 대한 것과 지질 조성 및 플라크의 석회화를 포함한다.

[0153] 환자를 자체적 대조군으로 사용하여 플라크 퇴행을 측정할 수 있다 (마지막 주입이 끝났을 때 시간 0 대 시간 t, 또는 마지막 주입 후 수 주일 내, 또는 치료 시작 후 3개월, 6개월 또는 1년 이내).

[0154] 정맥내(IV), 근육내(IM), 피내, 피하(SC) 및 복강내(IP) 주사를 포함하여, 비경구 투여 경로에 의해 투여를 달성할 수 있다. 특정한 구현양태에서, 관류장치, 침투장치 또는 카테터에 의해 투여한다. 일부 구현양태에서, 비경구 투여를 통해 획득되는 것과 동일한 순환 혈청 농도를 달성하는 양으로, 주사에 의해, 피하 이식가능한 펌프에 의해 또는 데포 제제에 의해 하전된 지단백질 복합체를 투여한다. 예를 들어 스텐트 또는 기타 장치에서 복합체가 흡수될 수 있다.

[0155] 각종 상이한 치료 섭생법을 통해 투여를 달성할 수 있다. 예를 들어, 주사의 누적 총 부피가 1일 독성 용량에 이르르지 않게 하면서, 하루 동안에 몇 번의 정맥내 주사를 주기적으로 투여할 수 있다. 대안적으로 약 3 내지 15일마다, 바람직하게는 약 5 내지 10일마다, 가장 바람직하게는 약 10일마다 한 번의 정맥 주사를 투여할 수 있다. 또 다른 대안에서, 투여 당 50 내지 200 mg의 투여량에서 약 1 내지 5회 투여로 시작하여 투여 당 200 mg 내지 1 g의 반복된 투여량까지 점증하는 투여량을 투여할 수 있다. 환자의 요구에 의존하여, 1시간 이상의 지속 기간 동안 느리게 주입한 다음 1시간 이하로 빠르게 주입하거나 단일 일시(bolus) 주사함으로써 투여할 수 있다.

[0156] 일부 구현양태에서, 주사 공급으로서 투여를 행할 수 있고 이어서 6개월 내지 1년 동안 멈춘 다음 다른 계열을 시작하였다. 이어서 매 1년마다 또는 매 3 내지 5년마다 주사의 지속 계열을 투여할 수 있다. 주사의 계열을 1일 (특정한 혈장 수준의 복합체를 유지하기 위해 관류), 수 일 (예를 들어, 8일의 기간에 걸쳐 4회 주사) 또는 수 주일 (예, 4주의 기간에 걸쳐 4회 주사)에 걸쳐 행할 수 있고, 이어서 6개월 내지 1년 후에 다시 시작한다.

[0157] 다른 투여 경로를 사용할 수 있다. 예를 들어, 경구 점막, 위 및/또는 소장의 거친 환경에서 활성 성분의 분해를 피하거나 최소화하기 위하여 적절한 제형 (예, 장내 코팅)이 사용된다면, 경구 투여 경로 (이에 한정되지 않지만 섭취, 흡착 및 설하 경로를 포함)에 의해 위장관을 통한 흡수를 달성할 수 있다. 대안적으로, 위장관에서

분해를 피하거나 최소화하기 위하여 질 및 직장 투여 방식과 같은 점막 조직을 통한 투여가 사용될 수도 있다. 다른 구현양태에서, 본 발명의 제제를 경피(transcutaneously) (예를 들어, 피부통과(transdermally))에 의해 또는 흡입에 의해 투여할 수 있다. 바람직한 경로는 수용자의 상태, 연령 및 합병증에 따라 변할 수 있는 것으로 이해된다.

[0158] 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 또는 조성물의 실제 투여량은 투여 경로에 따라 변할 수 있다.

[0159] 미국 특허 6,004,925호, 6,037,323 및 6,046,166 (Dasseux 등에게 특허발행, 여기에서 전체내용이 참고문헌으로 포함됨)에 기재된 동물 모델 체계에서 수득된 데이터는, 아포A-I 펩티드가 HDL 성분과 관련되고 인간에서 약 5일의 계획된 반감기를 갖는다는 것을 나타낸다. 따라서, 일부 구현양태에서, 평균 체격의 사람 당 2 내지 10 일마다 투여 당 약 0.1 g 내지 1 g의 하전된 지단백질 복합체의 투여량으로 정맥내 주사에 의해 하전된 지단백질 복합체를 투여할 수 있다.

[0160] LD50 (집단의 50%에 대해 치사 용량) 및 ED50 (집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량)을 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물에 표준 제약학적 절차를 사용하여 다양한 하전된 지단백질 복합체의 독성 및 치료 효능을 결정할 수 있다. 독성과 치료 효과 간의 용량 비율은 치료 지수이고, 이것은 비율 LD50/ED50으로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 하전된 지단백질 복합체가 바람직하다. 추적될 수 있는 매개변수의 비-제한적인 예는 간 기능 트랜스아미나제를 포함한다 (2X 정상 기준선 수준 이하). 이것은, 너무 많은 콜레스테롤이 간으로 보내지고 이러한 양을 동화할 수 없음을 나타낸다. 적혈구로부터 콜레스테롤의 이동은 이들을 약하게 만들거나 이들의 형태에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 적혈구에 대한 효과를 검사할 수 있다.

[0161] 의료 시술 (예, 예방적 치료) 전에 또는 의료 시술 동안 또는 후에, 수 일 내지 수 주일 동안 환자를 치료할 수 있다. 다른 침습 요법, 예컨대 동맥성형술, 목동맥 절제, 로토블래더 또는 기관 이식 (예, 심장, 신장, 간 등)과 부수적으로 또는 동시에 투여가 이루어질 수 있다.

[0162] 특정한 구현양태에서, 콜레스테롤 합성이 스타틴 또는 콜레스테롤 합성 억제제에 의해 제어되는 환자에게 하전된 지단백질 복합체를 투여한다. 다른 구현양태에서, 담즙산 분비를 증가시키고 혈액 콜레스테롤 농도를 낮추기 위하여, 결합 수지, 예를 들어 반-합성 수지, 예컨대 콜레스티라민으로 처리되거나 또는 섬유, 예를 들어 식물 섬유로 처리되는 환자에게 하전된 지단백질 복합체를 투여한다.

[0163] 6.6 기타 용도

[0164] 예를 들어 진단 목적을 위해 혈청 HDL을 측정하기 위하여 시험관내 분석에서 여기에 기재된 하전된 지단백질 복합체 및 조성물을 사용할 수 있다. 아포A-I, 아포A-II 및 아포 펩티드가 혈청의 HDL 성분과 관련되기 때문에, 하전된 지단백질 복합체를 HDL 집단, 및 프리-베타 1 및 프리-베타 2 HDL 집단의 "마커"로서 사용할 수 있다. 또한, 하전된 지단백질 복합체는 RCT에서 효과적인 HDL의 소집단의 마커로서 사용될 수 있다. 이를 위하여, 하전된 지단백질 복합체를 환자 혈청 샘플에 첨가하고 이와 혼합할 수 있고; 적절한 항온처리 시간 후에, 혼입된 하전된 지단백질 복합체를 검출함으로써 HDL 성분을 분석할 수 있다. 이것은 표지화 하전된 지단백질 복합체 (예, 방사성동위원소, 형광 라벨, 효소 라벨, 염료 등)를 사용하여 달성되거나, 또는 하전된 지단백질 복합체에 특이적인 항체 (또는 항체 단편)를 사용하는 면역분석법에 의해 달성될 수 있다.

[0165] 대안적으로, 순환계를 가시화하거나, 또는 RCT를 검사하거나, 또는 HDL이 콜레스테롤 유출에 활성일 지방 줄무늬, 죽상경화 병변 등에서 HDL의 축적을 가시화하기 위하여 촬영 절차 (예, CAT 스캔, MRI 스캔)에서 표지화된 하전된 지단백질 복합체를 사용할 수 있다.

[0166] 특정한 아포A-1 지질 복합체의 제조 및 특징화와 관련된 실시예 및 데이터는 미국 특허공개 2004/0067873에 기재되어 있고, 그의 개시내용은 여기에서 그 전체가 참고문헌으로 포함된다.

[0167] 특정한 프로아포A-1 지질 복합체를 사용하여 동물 모델 체계에서 수득된 데이터는 미국 특허 공개 2004/0067873 (그의 개시내용은 여기에서 그 전체가 참고문헌으로 포함된다)에 기재되어 있다.

[0168] 7. 실시예

[0169] 실시예 1: 프로아포A-I, 스펡고마이엘린 및 포스파티딜글리세롤의 제조

[0170] 약 90 mg의 단백질을 함유하는 동결건조된 개별 100 mL 플라스크로, 유니테 데 바이오테크놀로지 (Unite de Biotechnologie, Institut Meurice, Hte Ecole LuciaDe Brouckere) (벨기에 B-1070 안텔레크트 애브뉴 에밀 그리존 1)에서 단백질 프로아포A-I을 공급받았다. 배치 번호는 20060202였다. 사용시까지 단백질을 약 4°C로 유

지하였다. 동결건조 전에, 프로아포A-I의 함량은 3.225 mg/mL이고 우레아 함량은 약 0.011 mg/mL였다. 25.6 mL의 아세트산/물 5% 중에 약 630 mg의 프로아포A-I를 용해시켜 프로아포A-I의 용액을 만들었다. 용액의 최종 농도는 25 mg/mL였다.

[0171] 계란으로부터의 스펡고마이엘린 (코트솜(Coatsome)^(R) NM-10)을 NOF 코포레이션 (일본 660-0095 아마가사끼시 오오하마쵸 1-56)에서 공급받았다. 배치 번호는 0502ES1이었다. 스펡고마이엘린을 사용 시까지 약 -20℃에서 유지하였다. 스펡고마이엘린의 순도는 99.1%였다. 799.4mg의 정제된 스펡고마이엘린을 16mL의 아세트산/물 5%에 용해시킴으로써 스펡고마이엘린의 용액을 제조하여, 50mg/mL의 최종 농도를 수득하였다.

[0172] 소듐 염으로서 1,2-디팔미토일-SN-글리세로-3-포스파티딜 글리세롤 (DPPG-Na, 코트솜^(R) MG-6060LS)을 NOF 코포레이션 (일본 660-0095 아마가사끼시 오오하마쵸 1-56)에서 공급받았다. 배치 번호는 0309651L이었다. DPPG-Na를 사용시까지 약 -20℃에서 유지하였다. DPPG-Na의 순도는 99.2%였다. 50 mg/mL의 최종 농도를 수득하기 위하여 1mL 아세트산/물 5% 중에 49.1mg의 DPPG-Na를 용해시킴으로써 DPPG-Na의 용액을 제조하였다.

[0173] 실시예 2: 대조 비하전된 지단백질 복합체의 제조

[0174] 프로아포-AI (33중량%) 및 스펡고마이엘린(67%)으로 구성된 대조 비하전된 지단백질 복합체를 하기 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0175] 100 mL 유리 플라스크(들)에서 5.6mL의 프로아포A-I (25 mg/mL)를 약 5.6 mL의 스펡고마이엘린 (50 mg/mL)과 혼합함으로써 대조 비하전된 지단백질 복합체의 제제를 제조하였다. 얻어진 혼합물을 0.22 μ m 나일론 필터를 통해 여과하였다. 혼합물을 약 50℃에서 가열한 다음 손으로 교반하면서 액체 질소에서 동결하였다. 동결 직후에, 플라스크를 15시간 동안 동결건조기에 놓았다. 동결건조 후에, 플라스크를 약 40℃에서 4시간 동안 진공하에 놓아 두었다. 얻어진 제제를 사용시까지 약 4℃에서 저장하였다.

[0176] 140mM NaCl 및 20mM NaHCO₃를 함유하는 14mL의 용액을, 대조 비하전된 지단백질 복합체의 동결건조된 제제를 함유하는 유리 플라스크에 첨가하였다. 20mL의 용액 중에 0.75mL 1M NaOH를 첨가함으로써 얻어진 용액을 염기성 pH로 조절하였다. 용액을 손으로 교반하고 약 50℃에서 가열한 다음 적어도 1시간 동안 초음파 욕에 놓아 두었다. 얻어진 제제 중에 프로아포A-I의 농도는 10 mg/mL였다. 제제(들)을 HPLC 시스템으로 주입하여 비하전된 지단백질 복합체의 존재를 검사하였다. 도 1은 여기에 기재된 것과 같이 만들어진 비하전된 지단백질 복합체에 대한 HPLC 크로마토그램의 예를 나타낸다.

[0177] 실시예 3: 시험 하전된 지단백질 복합체의 제조

[0178] 프로아포A-I (33중량%), 스펡고마이엘린 (65중량%) 및 포스파티딜글리세롤 (2중량%)로 구성된 하전된 지단백질 복합체를 하기 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0179] 5.6 mL의 프로아포A-I (25 mg/mL)를 대략 5.6 mL의 스펡고마이엘린 (50 mg/mL)와 혼합하고, 100 mL 유리 플라스크(들)내에서 0.15 mL의 DPPG-NA (50 mg/mL)를 혼합하고, 이어서 0.22 μ m 나일론 필터를 통해 혼합물을 여과함으로써 하전된 지단백질 복합체의 제제를 제조하였다. 혼합물을 대략 50℃에서 가열하고 손으로 교반하면서 액체 질소에서 동결하였다. 동결 직후에, 플라스크를 동결건조기에서 15시간 동안 놓아두었다. 동결건조 후에, 플라스크를 약 40℃에서 4시간 동안 진공 하에 놓아 두었다. 얻어진 제제를 사용 시까지 대략 4℃에서 보관하였다.

[0180] 140mM NaCl 및 20mM NaHCO₃의 14mL를 상기 기재된 동결건조된 제제를 함유하는 유리 플라스크에 첨가하였다. 20mL 용액 중에 0.75 mL 1M NaOH를 첨가함으로써 얻어진 용액을 염기성 pH로 조절하였다. 용액을 손으로 교반하고 약 50℃에서 가열한 다음, 적어도 1시간 동안 초음파 욕에 놓아 두었다. 얻어진 제제 중에서 프로아포A-I의 농도는 10 mg/mL였다. 비하전된 지단백질 복합체의 존재에 대해 검사하기 위하여 제제(들)을 HPLC 시스템으로 주입하였다. 도 2는 여기에 기재된 바와 같이 만들어진 하전된 지단백질 복합체에 대한 HPLC 크로마토그램의 예를 제공한다.

[0181] 실시예 4: 동물 모델 체계

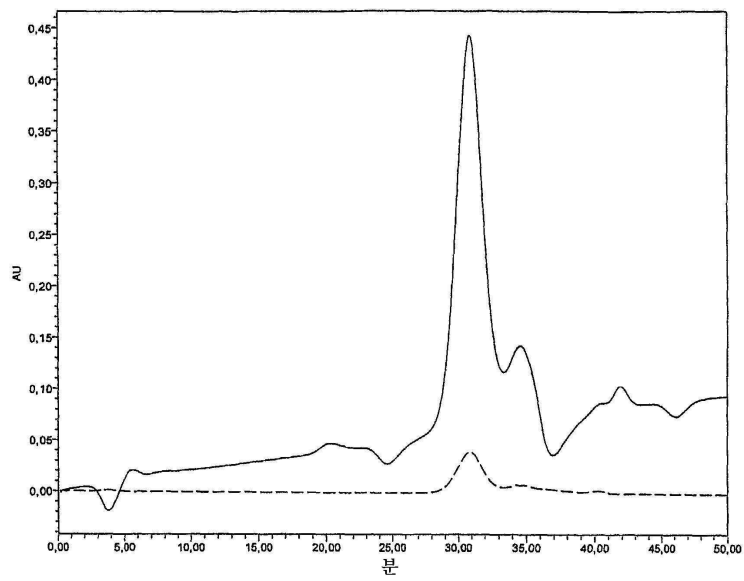
[0182] 상기 기재된 비하전된 및 하전된 복합체에 의해 콜레스테롤 이동성을 시험하기 위하여, 3 내지 4kg 체중의 뉴질랜드 수컷 토끼를 사용하였다. 동물은 CEGAV (프랑스)에 의해 공급되고, 특유의 귀 문신으로 개별적으로 확인하였다. 토끼를 아보가드로(Avogadro) (프랑스) 동물 시설에서 개별 우리에 수용시켰다. 동물 수용 및 보호는

지시 86/609/EEC의 추천에 따랐다. 아보가드로의 동물 시설은 프랑스 수의학 기관으로부터 받은 승인 번호 B 31 188 01을 갖고 있다. 모든 동물을 아보가드로에서 보급되어 있는 관행 및 현행 표준 작업 절차(SOP)에 따라서 동물의 복지에 관해 적당히 고려하면서 유사하게 관리하였다. 적절한 간격으로 장치 및 동물 집을 청소하였다.

- [0183] 동물 실내 조건은 다음과 같았다: 온도: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대 습도: $55 \pm 15\%$ 및 12 시간 빛/12 시간 어둠 주기. 온도 및 상대 습도를 매일 기록하고 연구 자료와 함께 보관하였다. 각각의 토끼를 하루 한번 관찰하고, 비정상적인 결과를 관찰한 대로 기록하고 연구 관리자에게 보고하였다.
- [0184] 연구 시작 전에 적어도 7일 동안 동물을 순응시켰다. 동물들이 1일 기준에서 제어된 펠릿 식사를 원하는 대로 먹게 하였다. 연구 전체에 걸쳐 물을 원하는 대로 먹을 수 있었다.
- [0185] 복합체의 투여 전에, 동물을 밤새 단식시켰다. 복합체의 투여 직전에 동물을 체중을 재었다. 복합체를 1.5 mL/kg에 상응하는 15 mg/kg의 용량비로 정맥내 투여하였다. 투여된 부피는 중량을 기준으로 하였다. 복합체 투여 후 대략 6 시간에 급식을 재개하였다. 기록된 처리 세부사항은 투여량 계산, 투여된 용량, 날짜 및 투여 시간을 포함하였다.
- [0186] 혈액 샘플의 수집에 앞서서, 동물을 밤새 단식시켰다. 혈액 샘플을 목정맥 또는 귀의 변연정맥으로부터 빼내었다. EDTA와 함께 바늘이 설치된 주사기를 사용하여 목정맥으로부터 혈액을 빼내었다 (샘플채취 시간 당 약 1 mL의 혈액). 수집 직후에, 혈액 샘플의 변경을 피하기 위하여 혈액 샘플을 약 4°C 에서 유지하였다. 혈액 견본을 원심분리하였다 (3500g, 대략 5°C 에서 10분 동안). 혈장 견본을 분리하고 부분표본화하고 (적어도 $200\mu\text{L}$ 의 3개 부분표본 (부분표본 A, B, C)), 대략 -80°C 에서 저장하였다. 나머지 혈액 덩어리를 버렸다.
- [0187] **실시예 5: 하전된 지단백질 복합체는 콜레스테롤을 이동시킨다**
- [0188] 대조 지단백질 복합체 (제제 IIA) 또는 하전된 지단백질 복합체 (제제 IIB)을 상기 기재된 바와 같이 제조하고, 1군 당 2마리의 토끼에 투여하였다 (15mg 복합체/kg 체중).
- [0189] 혈액 샘플 (1 mL)를 투여 전, 투여 후 5분, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간 및 6시간에 취하였다. 공개된 방법 (예를 들어, Usui, S. 등, 2002, J.Lipid. Res., 43: 805-14)에 따라서 혈장 샘플을 총 콜레스테롤, 자유 콜레스테롤 및 트리글리세리드에 대해 분석하였다. 총 콜레스테롤 함량으로부터 자유 콜레스테롤 함량을 뺀으로써 에스테르화 콜레스테롤 농도를 계산하였다. 각각의 동물에 대하여 HDL 결과 중의 자유 콜레스테롤을 도 3에 나타낸다. 대조 군 (군 IIA) 및 시험 군 (군 IIB)을 포함하는 2개 동물의 평균 값을 도 4에 나타낸다.
- [0190] 예상대로, 대조 및 시험 지단백질 복합체 양쪽 모두가 콜레스테롤을 이동시켰으며, 시험 군의 평균은 대조군의 평균에 비하여 증가된 이동을 나타낸다.
- [0191] 각각의 공고, 특허 또는 특허출원이 구체적 및 개별적으로 모든 목적을 위해 그 전체내용이 참고문헌으로 포함되었다고 표시되어 있는 바와 같이, 모든 인용된 참고문헌은 그 전체내용이 모든 목적을 위해 동일한 정도까지 참고문헌으로 포함된다.
- [0192] 공고의 열거는 본 출원일 이전에 그들이 발표되었음을 나타낸 것이며, 본 발명이 선행 발명에 의하여 공개가 앞선 권리가 있지 않음을 시인하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0193] 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 발명의 의도 및 범위에서 벗어나지 않으면서 본 발명의 많은 변형 및 변화를 행할 수 있다. 특정한 구현양태는 단지 일례로 주어진 것이며, 본 발명은 첨부된 청구의 범위 및 이러한 청구의 범위가 속하는 전체 균등 범위의 경계에 의해서만 한정된다.

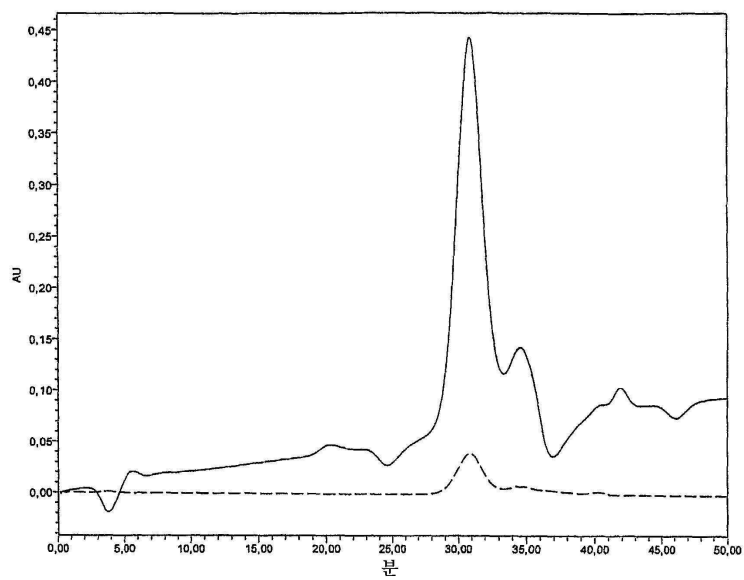
도면

도면1



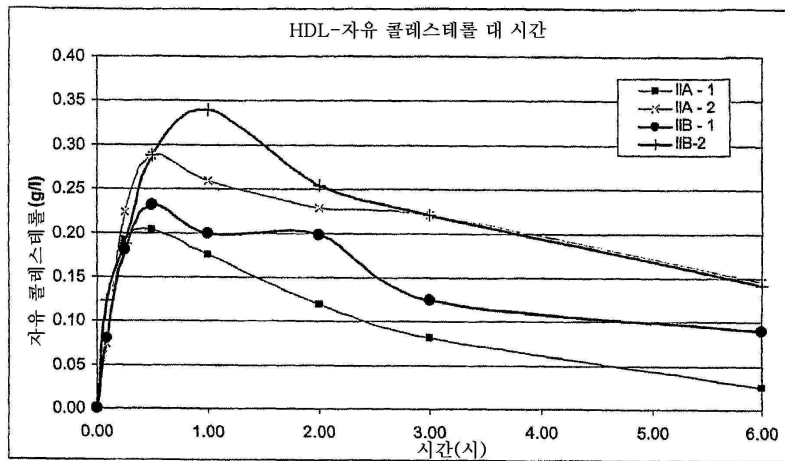
—— 지질 (220 nm)
 ---- 단백질 (280 nm)

도면2



—— 지질 (220 nm)
 ---- 단백질 (280 nm)

도면3



도면4

