(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2014-509646
(P2014-509646A)
(43)公表日　平成26年4月21日(2014.4.21)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	4C076
A61K 38/45	(2006.01)	A61K	37/52	4C084
A61K 38/55	(2006.01)	A61K	37/64	
A61K 38/46	(2006.01)	A61K	37/54	
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 43 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-502649 (P2014-502649)
(86)(22)出願日　平成24年3月23日 (2012.3.23)
(85)翻訳文提出日　平成25年11月25日 (2013.11.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/030401
(87)国際公開番号　WO2012/135046
(87)国際公開日　平成24年10月4日 (2012.10.4)
(31)優先権主張番号　61/467,723
(32)優先日　平成23年3月25日 (2011.3.25)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　592104782
ザ・トラスティーズ・オブ・コランビア・ユニバーシティー・イン・ザ・シティー・オブ・ニューヨーク
THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK
アメリカ合衆国、ニューヨーク州　１００２７、ニューヨーク、ウエスト・ワンハンドレッドシックスティーンス・ストリート・アンド・ブロードウエイ（番地無し）
(74)代理人　100108855
弁理士　蔵田　昌俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ペグ化ヒトＨＤＬ粒子およびその製造方法

(57)【要約】
ペグ化高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）粒子を含む組成物、ペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物の製造方法、およびペグ化ＨＤＬ粒子を使用した多様な疾患および病態の治療方法が提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
アポリポタンパク質Ａ－Ｉ（ＡｐｏＡ－Ｉ）を含むペグ化高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）粒子を含む組成物であって、前記組成物中の前記ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも５０％が、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである組成物。
【請求項２】
前記組成物中の前記ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも９０％が、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記組成物が、マルチペグ化ＡｐｏＡ－Ｉを本質的に含まない、請求項１または２に記載の組成物。
【請求項４】
前記組成物が、胆汁酸塩を本質的に含まない、請求項１～３の何れか1項に記載の組成物。
【請求項５】
前記組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも７０％が、Ｎ末端でペグ化されている、請求項１～４の何れか１項に記載の組成物。
【請求項６】
前記組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの約８０％が、Ｎ末端でペグ化されている、請求項５に記載の組成物。
【請求項７】
前記モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉが、ＡｐｏＡ－Ｉに共有結合したポリエチレングリコールを含み、前記ポリエチレングリコールが、１９，０００～２１，０００ダルトンの分子量を有する、請求項１～６の何れか１項に記載の組成物。
【請求項８】
前記ポリエチレングリコールが、約２０，０００ダルトンの分子量を有する、請求項７に記載の組成物。
【請求項９】
前記ペグ化ＨＤＬ粒子が、ペグ化組換えＨＤＬ粒子またはペグ化突然変異ＨＤＬ粒子である、請求項１～８の何れか１項に記載の組成物。
【請求項１０】
前記ペグ化ＨＤＬ粒子が、ペグ化再構成ＨＤＬ粒子である、請求項１～９の何れか１項に記載の組成物。
【請求項１１】
前記ペグ化ＨＤＬ粒子が、ペグ化天然ＨＤＬ粒子である、請求項１～８の何れか１項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記ペグ化ＨＤＬ粒子が、ペグ化ヒトＨＤＬ粒子である、請求項１～１１の何れか１項に記載の組成物。
【請求項１３】
ペグ化タンパク質を含むペグ化高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）粒子を含む組成物であって、前記ペグ化タンパク質が、アポリポタンパク質Ａ－ＩＩ（ａｐｏ　Ａ－ＩＩ）、アポリポタンパク質Ａ－ＩＶ（ＡｐｏＡ－ＩＶ）、アポリポタンパク質Ａ－Ｖ（Ａｐｏ　Ｖ）、アポリポタンパク質Ｃ－Ｉ（Ａｐｏ　Ｃ－Ｉ）、アポリポタンパク質Ｃ－ＩＩ（Ａｐｏ　Ｃ－ＩＩ）、アポリポタンパク質Ｃ－ＩＩＩ（Ａｐｏ　Ｃ－ＩＩＩ）、アポリポタンパク質Ｄ（Ａｐｏ　Ｄ）、アポリポタンパク質Ｅ（Ａｐｏ　Ｅ）、アポリポタンパク質Ｆ（Ａｐｏ　Ｆ）、アポリポタンパク質Ｍ（Ａｐｏ　Ｍ）、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＬＣＡＴ）、コレステリルエステル転送タンパク質（ＣＥＴＰ）、リン脂質転送タンパク質（ＰＬＴＰ）、パラオキソナーゼ、血小板活性化因子アシルヒドロラーゼ（ＰＡＦ－ＡＨ）、クラステリン（ａｐｏ　Ｊ）、血清アミロイドＡ（ＳＡＡ）

および組織因子経路インヒビター（ＴＦＰＩ）の少なくとも１つを含む組成物。
【請求項１４】
前記組成物中の前記タンパク質の少なくとも５０％が、モノペグ化タンパク質である、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
前記組成物中の前記タンパク質の少なくとも９０％が、モノペグ化タンパク質である、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
ペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物の調製方法であって、
（ａ）ＨＤＬ粒子をポリエチレングリコール源と混合して、混合物を形成すること；
（ｂ）工程（ａ）由来の前記混合物を、ＨＤＬ粒子のタンパク質とポリエチレングリコールの分子との共有結合の形成を許容する条件下で、インキュベートすること；および
（ｃ）ペグ化ＨＤＬ粒子を含む前記組成物をこれにより調製するように、工程（ｂ）の生成物からペグ化ＨＤＬ粒子を分離すること
を含む方法。
【請求項１７】
前記ＨＤＬ粒子が、組換えＨＤＬ粒子または突然変異ＨＤＬ粒子である、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記ＨＤＬ粒子が、再構成ＨＤＬ粒子である、請求項１６または１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記ＨＤＬ粒子が、天然ＨＤＬ粒子である、請求項１６に記載の方法。
【請求項２０】
前記ＨＤＬ粒子が、ヒトＨＤＬ粒子である、請求項１６～１９の何れか１項に記載の方法。
【請求項２１】
前記ポリエチレングリコールが、１９，０００～２１，０００ダルトンの分子量を有する、請求項１６～２０の何れか１項に記載の方法。
【請求項２２】
前記ポリエチレングリコールが、約２０，０００ダルトンの分子量を有する、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記ポリエチレングリコール源が、メトキシポリ(エチレングリコール)である、請求項１６～２２の何れか１項に記載の方法。
【請求項２４】
ポリエチレングリコールとＨＤＬ粒子とのモル比が、２：１～１０：１である、請求項１６～２３の何れか１項に記載の方法。
【請求項２５】
ポリエチレングリコールとＨＤＬ粒子とのモル比が、約８：１である、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
工程ａ）において、前記混合物の前記ＨＤＬ粒子の濃度が、１．２５～１２．５ｍｇ／ｍｌである、請求項１６～２５の何れか１項に記載の方法。
【請求項２７】
工程（ａ）において、前記混合物の前記ＨＤＬ粒子の濃度が、約５ｍｇ／ｍｌである、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
工程（ｂ）において、前記ＨＤＬおよび前記ポリエチレングリコール源が、２～４８時間インキュベートされる、請求項１６～２７の何れか１項に記載の方法。
【請求項２９】

工程（ｂ）において、前記ＨＤＬおよび前記ポリエチレングリコール源が、約２０時間インキュベートされる、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
工程（ｂ）において、前記ＨＤＬおよび前記ポリエチレングリコール源が、２℃～３７℃でインキュベートされる、請求項１６～２９の何れか１項に記載の方法。
【請求項３１】
工程（ｂ）において、前記ＨＤＬおよび前記ポリエチレングリコール源が、４℃～６℃でインキュベートされる、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
工程（ｂ）が、約１Ｍグリシンを添加することにより前記混合物をクエンチングする工程を更に含む、請求項１６～３１の何れか１項に記載の方法。
【請求項３３】
工程（ｂ）が、グリシンを５ｍＭ～７５ｍＭのグリシン濃度になるように添加することにより前記混合物をクエンチングする工程を更に含む、請求項１６～３１の何れか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記混合物が、約１０ｍＭのグリシン濃度になるようにクエンチングされる、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記混合物が、約５０ｍＭのグリシン濃度になるようにクエンチングされる、請求項３３に記載の方法。
【請求項３６】
工程（ｃ）において、前記ペグ化ＨＤＬ粒子が、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、工程（ｂ）の前記生成物から分離される、請求項１６～３５の何れか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記方法が、胆汁酸塩の非存在下で行われる、請求項１６～３６の何れか１項に記載の方法。
【請求項３８】
請求項１６～３７の何れか１項に記載の方法により調製される組成物。
【請求項３９】
アポリポタンパク質Ａ－Ｉ（ＡｐｏＡ－Ｉ）を含む請求項３８に記載の組成物であって、前記組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも５０％が、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである組成物。
【請求項４０】
前記組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも９０％が、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである、請求項３９に記載の組成物。
【請求項４１】
前記組成物が、マルチペグ化ＡｐｏＡ－Ｉを本質的に含まない、請求項３８～４０の何れか１項に記載の組成物。
【請求項４２】
前記組成物が、胆汁酸塩を本質的に含まない、請求項３８～４１の何れか１項に記載の組成物。
【請求項４３】
前記組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも７０％が、Ｎ末端でペグ化されている、請求項３８～４２の何れか１項に記載の組成物。
【請求項４４】
前記組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの約８０％が、Ｎ末端でペグ化されている、請求項４３に記載の組成物。
【請求項４５】
炎症性血管疾患に罹患した被検体の治療方法であって、前記被検体を治療するのに効果

的な量の請求項１～１５および３９～４４の何れか１項に記載の組成物を前記被検体に投与することを含む方法。
【請求項４６】
前記炎症性血管疾患が、アテロームまたはアテローム性動脈硬化症である、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記炎症性血管疾患が、アテローム血栓性心臓血管疾患である、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
脂質異常症に罹患した被検体の治療方法であって、前記被検体を治療するのに効果的な量の請求項１～１５および３９～４４の何れか１項に記載の組成物を前記被検体に投与することを含む方法。
【請求項４９】
被検体における血漿ＨＤＬレベルを増大させる方法であって、被検体における血漿ＨＤＬレベルを増大させるのに効果的な量の請求項１～１５および３９～４４の何れか１項に記載の組成物を前記被検体に投与することを含む方法。
【請求項５０】
被検体におけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進する方法であって、被検体におけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進するのに効果的な量の請求項１～１５および３９～４４の何れか１項に記載の組成物を前記被検体に投与することを含む方法。
【請求項５１】
被検体における白血球の量を減少させる方法であって、被検体における白血球の量を減少させるのに効果的な量の請求項１～１５および３９～４４の何れか１項に記載の組成物を前記被検体に投与することを含む方法。
【請求項５２】
前記白血球が、単球、好中球またはその両方を含む、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
炎症性血管疾患に罹患した被検体を治療する際に使用するための、請求項１～１５および３９～４４の何れか１項に記載の組成物。
【請求項５４】
脂質異常症に罹患した被検体を治療する際に使用するための、請求項１～１５および３９～４４の何れか１項に記載の組成物。
【請求項５５】
被検体における血漿高密度リポタンパク質レベルを増大させる際に使用するための、請求項１～１５および３９～４４の何れか１項に記載の組成物。
【請求項５６】
被検体におけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進する際に使用するための、請求項１～１５および３９～４４の何れか１項に記載の組成物。
【請求項５７】
被検体における白血球の量を減少させる際に使用するための、請求項１～１５および３９～４４の何れか１項に記載の組成物。
【請求項５８】
被検体に化合物を投与する方法であって、前記被検体に前記化合物をこれにより投与するように、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した前記化合物を含む組成物のある量を前記被検体に投与することを含む方法。
【請求項５９】
前記化合物が、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＬＣＡＴ）である、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】

前記化合物が、野生型ＡｐｏＬ－１（ＡｐｏＬ－１　ＷＴ）である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
被検体におけるＬＣＡＴ量を増大させる方法であって、被検体におけるＬＣＡＴ量を増大させるのに効果的な量の、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物を前記被検体に投与することを含む方法。
【請求項６２】
アテローム性動脈硬化症に罹患した被検体の治療方法であって、前記被検体を治療するのに効果的な量の、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物を前記被検体に投与することを含む方法。
【請求項６３】
あるタイプの腎疾患に罹患しているかまたはあるタイプの腎疾患のリスクがある被検体の治療方法であって、前記被検体を治療するかまたは前記被検体における腎疾患のリスクを低減もしくは除去するのに効果的な量の、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴまたはＡｐｏＬ－１　ＷＴを含む組成物を前記被検体に投与することを含む方法。
【請求項６４】
被検体に化合物を投与する際に使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した化合物を含む組成物。
【請求項６５】
被検体におけるＬＣＡＴ量を増大させる際に使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物。
【請求項６６】
アテローム性動脈硬化症に罹患した被検体を治療する際に使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物。
【請求項６７】
あるタイプの腎疾患に罹患した被検体を治療するかまたは被検体における腎疾患のリスクを低減もしくは除去する際に使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴまたはＡｐｏＬ－１　ＷＴを含む組成物。
【発明の詳細な説明】
【発明の開示】
【０００１】
本出願は、２０１１年３月２５日に出願された米国特許仮出願第６１／４６７，７２３号に基づく優先権を主張するものであり、同文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本出願を通して、多様な刊行物および公開された特許が参照される。これらの公表物についての書誌情報は、「特許請求の範囲」の直前の「参考文献」の項に掲載してある。これらの公表物の開示内容は、本発明が属する最新技術をより十分な形で説明するために、参照によりその全体が本出願文書に組み込まれる。
【０００３】
本明細書において開示する研究は、米国国立衛生研究所から助成金番号Ｈｌ５４５９１として政府支援を受けて行われた。したがって、米国政府は、本発明における一定の権利を有する。
【発明の背景】
【０００４】
血漿ＨＤＬコレステロールレベルは、心臓血管疾患のリスクに逆相関し、このことから、その保護的な役割が示唆される。ヒトにおいては、再構成ＨＤＬ粒子の潜在的な抗アテローム硬化特性が臨床試験で調査されており、これらの試験から、再構成ＨＤＬ粒子は冠動脈アテローム性動脈硬化症の退縮をもたらすことが実際に示されている。
【０００５】

現在、組換えヒトＨＤＬ粒子を作り出すためには、組換えまたは天然の形態いずれかの精製ヒトアポリポタンパク質Ａ－Ｉ（ＡｐｏＡ－Ｉ）がリン脂質および胆汁酸塩と組み合わせて使用されている。ＨＤＬ粒子は、タンパク質および脂肪から構成されており、コレステロールを肝臓に輸送し、コレステロールは肝臓で体から除去される。胆汁酸塩の両親媒性の性質は組換えＨＤＬ粒子の形成を容易にするが、組換えＨＤＬ調製物中の残留胆汁酸塩は、ヒトにおいて有害作用を引き起こす可能性があり、したがって、使用可能な組換えＨＤＬ粒子の量は限定される。血漿ＨＤＬ粒子の初期レベル、および適切な期間にわたるその十分な治療濃度の維持が、ＨＤＬ粒子療法の有効性を決定し得ると考えられる。

【０００６】

血漿ＨＤＬ粒子が代謝回転を担う機序は、依然としてあまり明確になっていない。肝臓および腎臓は、ＨＤＬ粒子の異化作用の調節に関与する主要な器官である。血漿ＨＤＬ粒子またはそのアポリポタンパク質のクリアランスを低下させることができれば、ＨＤＬ粒子の用量を低下させても十分な治療濃度が達成できると考えられる。

【発明の概要】

【０００７】

本発明は、アポリポタンパク質Ａ－Ｉ（ＡｐｏＡ－Ｉ）を含むペグ化高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）粒子を含む組成物であって、該組成物中の該ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも５０％が、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである、組成物を提供する。

【０００８】

本発明は、ペグ化高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）粒子を含む組成物であって、ペグ化ＡｐｏＡ－１以外のペグ化タンパク質を含む組成物も提供する。

【０００９】

本発明は、ペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物の調製方法であって、（ａ）ＨＤＬ粒子をポリエチレングリコール源と混合して、混合物を形成すること；（ｂ）工程（ａ）由来の該混合物を、ＨＤＬ粒子のタンパク質とポリエチレングリコールの分子との共有結合の形成を許容する条件下で、インキュベートすること；および（ｃ）ペグ化ＨＤＬ粒子を含む該組成物をこれにより調製するように、工程（ｂ）の生成物からペグ化ＨＤＬ粒子を分離することを含む方法も提供する。

【００１０】

本発明は、本明細書に記載の方法により調製される組成物も提供する。

【００１１】

本発明は、炎症性血管疾患に罹患した被検体の治療方法であって、該被検体を治療するのに効果的な量の本明細書に記載の組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。

【００１２】

本発明は、脂質異常症に罹患した被検体の治療方法であって、該被検体を治療するのに効果的な量の本明細書に記載の組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。

【００１３】

本発明は、被検体における血漿ＨＤＬレベルを増大させる方法であって、被検体における血漿ＨＤＬレベルを増大させるのに効果的な量の本明細書に記載の組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。

【００１４】

本発明は、被検体におけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進する方法であって、被検体におけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進するのに効果的な量の本明細書に記載の組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。

【００１５】

本発明は、被検体における白血球の量を減少させる方法であって、被検体における白血球の量を減少させるのに効果的な量の本明細書に記載の組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。

【００１６】
本発明は、炎症性血管疾患に罹患した被検体を治療する際に使用するための、本明細書に記載の組成物も提供する。本発明は、脂質異常症に罹患した被検体を治療する際に使用するための、本明細書に記載の組成物も提供する。本発明は、被検体における血漿高密度リポタンパク質レベルを増大させる際に使用するための、本明細書に記載の組成物も提供する。本発明は、被検体におけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進する際に使用するための、本明細書に記載の組成物も提供する。本発明は、被検体における白血球の量を減少させる際に使用するための、本明細書に記載の組成物も提供する。
【００１７】
本発明は、被検体に化合物を投与する方法であって、該被検体に該化合物をこれにより投与するように、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した該化合物を含む組成物のある量を該被検体に投与することを含む方法も提供する。
【００１８】
本発明は、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した化合物を含む組成物、および被検体におけるＬＣＡＴ量を増大させる方法であって、被検体におけるＬＣＡＴ量を増大させるのに効果的な量の、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。
【００１９】
本発明は、アテローム性動脈硬化症に罹患した被検体の治療方法であって、該被検体を治療するのに効果的な量の、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。
【００２０】
本発明は、あるタイプの腎疾患に罹患しているかまたはあるタイプの腎疾患のリスクがある被検体の治療方法であって、該被検体を治療するかまたは該被検体における腎疾患のリスクを低減もしくは除去するのに効果的な量の、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴまたはＡｐｏＬ－１　ＷＴを含む組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。
【００２１】
本発明は、被検体に化合物を投与する送達ビヒクルとして使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した該化合物を含む組成物も提供する。
【００２２】
本発明は、被検体におけるＬＣＡＴ量を増大させる際に使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物も提供する。
【００２３】
本発明は、アテローム性動脈硬化症に罹患した被検体を治療する際に使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物も提供する。
【００２４】
本発明は、あるタイプの腎疾患に罹患した被検体を治療するかまたは該被検体における腎疾患のリスクを低減もしくは除去する際に使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴまたはＡｐｏＬ－１　ＷＴを含む組成物も提供する。
【図面の簡単な説明】
【００２５】
【図１】図１Ａおよび図１Ｂ：　ヒトａｐｏＡ－Ｉのペグ化を示す図。精製ヒトａｐｏＡ－Ｉは、活性化ＰＥＧを用いず（Ａ１、Ｂ１もしくは Ｂ２）または用いて（Ａ２、Ｂ３、Ｂ４）、４℃（図１Ａ）または室温（図１Ｂ）で約１６時間ペグ化し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびクーマシーブルー染色により分析した。温度が低ければ、部分的にペグ化する結果となり、温度が高ければ、ａｐｏＡ－Ｉのマルチペグ化がもたらされる。４℃でインキュベーション時間を長くした場合も、マルチペグ化する結果となる（図示していない）。
【図２】図２Ａおよび図２Ｂ：　マクロファージ細胞からのコレステロール流出を示すグラフ。マウス腹膜マクロファージを５０μｇ／ｍｌのアセチル－ＬＤＬと、アセチル－Ｌ

ＤＬ調製物中に組み込まれた１μＣｉ／ｍｌの［^{3}Ｈ］コレステロールとで一晩標識した。コレステロール流出は、細胞を洗浄した後、指示濃度でａｐｏＡ－ＩまたはＰＥＧ－ａｐｏＡ－Ｉを添加することにより開始させた。流出比（％）は、培地における数／（培地＋細胞における数）×１００として決定した。図２Ａで使用しているＰＥＧ－ａｐｏＡ－Ｉは、図１Ａのものと同様に調製（部分的なペグ化）したものであり、図１Ｂのものと同様に調製（マルチペグ化）したＰＥＧ－ａｐｏＡ－Ｉは、図２Ｂに示す流出に使用した。

【図３】図３：　ヒトＨＤＬのペグ化を示す図。ヒトＨＤＬは、活性化ポリエチレングリコールの存在下または非存在下でインキュベートした。非修飾天然ＨＤＬまたはペグ化ＨＤＬをＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析にかけた。ゲルをクーマシーブリリアントブルー染色したものを示す。

【図４】図４：　天然ヒトＨＤＬおよびペグ化ヒトＨＤＬがマクロファージからのコレステロール流出を促進することを示すグラフ。マウスのマクロファージ様ＲＡＷ細胞を、１０％ウシ胎仔血清を含有する細胞培養培地中で再構成させた［^{3}Ｈ］コレステロールで標識した。洗浄の後、指示量のＨＤＬを添加して、コレステロール流出を開始させた。コレステロールの流出比（％）は、記載したとおりに決定した。

【図５】図５：　非ペグ化ＨＤＬのｉｎ　ｖｉｖｏにおける代謝回転を示す図。０．８ｍｇのＨＤＬタンパク質を、尾静脈を介してマウスに注射した。注射後、指示時点で、一定分量の血液をマウスから採取した。各試料由来の血漿０．１μｌをウェスタン分析にかけた。その結果を示す。

【図６】図６：　ペグ化ＨＤＬのｉｎ　ｖｉｖｏにおける代謝回転を示す図。１ｍｇのＰＥＧ－ＨＤＬタンパク質調製物を、尾静脈を介してマウスに注射した。注射後、指示時点で、一定分量の血液をマウスから採取した。各試料由来の血漿０．１μｌをウェスタン分析にかけた。その結果を示す。

【図７】図７：　ＰＥＧ－ｒＨＤＬは、ＷＴＤを与えたＡｐｏｅ$^{-/-}$マウスにおいて、総白血球（Ｗｂｃ）数を減少させる点でｒＨＤＬより効果的であることを示すグラフ（例５）。Ａｐｏｅ$^{-/-}$マウスに、９週間ＷＴＤを与えてから、食塩水、ｒＨＤＬ（４０ｍｇ／ｋｇ）またはＰＥＧ－ｒＨＤＬ（４０ｍｇ／ｋｇ）の注入を行った。２週間後、マウスに２回目の注入（同じ条件）を行い、６日後に総白血球数を測定した。*ｐ＜０．０（対食塩水）。

【図８】図８：　単球および好中球を、フローサイトメトリーによって調べ、全血球分析で得られた数を用いて細胞／μｌに転換させたグラフ（例５）。データは平均値±ＳＥＭとして示してある。*Ｐ＜０．０５（対食塩水）。

【図９】図９：　大動脈弓を切断し、汚れを落とし、病変の定量化のためにＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏで染色した（例５）。データを平均病変面積率（％）±ＳＥＭとして示すグラフ。*Ｐ＜０．００５（対食塩水）。

【図１０】図１０：　ヒトのＰＥＧ－ＨＤＬおよび天然ＨＤＬが、５時間および２４時間時点でマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出に影響を及ぼす能力の検査結果を示すグラフ（例６）。

【発明の詳細な説明】

【００２６】

出願人らは、これまでに、精製ヒトａｐｏＡ－Ｉを活性化メトキシポリ（エチレングリコール）（ｍＰＥＧ）でペグ化してヒトａｐｏＡ－Ｉの血漿中半減期を長期化させる方法を開発しており、このペグ化形態のヒトａｐｏＡ－Ｉは、その重大な生物活性、すなわち、マクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出の促進を依然として保っていた（ＰＣＴ国際出願公開ＷＯ２０１０／１４１０９７号）。ＷＯ２０１０／１４１０９７において開示されている方法を用いると、モノペグ化種は観察されたものの、調製物中に依然として相当量の天然ａｐｏＡ－Ｉが存在していたことから、反応は不完全であった（図１Ａ）。より完全なペグ化がもたらされるように活性化ＰＥＧの反応時間を長くするかまたは量を増加させると、マルチペグ化種の混合物が得られるかまたはペグ化途中（underpegylation）であることが観察された（ＷＯ２０１０／１４１０９７の３０ページ、１４～２

０行、および図１Ｂ）。結果として、ＷＯ２０１０／１４１０９７の方法では、４０％～５０％を超えるモノペグ化ａｐｏＡ－Ｉを含有する組成物は製造されなかった。

【００２７】

モノペグ化種は、天然およびマルチペグ化ａｐｏＡ－Ｉより好ましい［マルチペグ化ａｐｏＡ－Ｉは、マクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出促進能の低下により示されるように、機能が喪失していることが実証された（ＷＯ２０１０／１４１０９７の３３ページ、６～８行、および図１Ｂ、図２Ｂ）］ことから、より高い濃度のモノペグ化ａｐｏＡ－Ｉ種を製造することができる改良されたペグ化方法が必要とされる。

【００２８】

本明細書に記載のように、タンパク質ペグ化のための基材として、その脱脂アポリポタンパク質ではなくＨＤＬ粒子を使用する新規の方法は、ＷＯ２０１０／１４１０９７による方法に勝るいくつかの利点を有する。

【００２９】

具体的には、本明細書において提供されるペグ化方法を用いると、５０％超のモノペグ化ａｐｏＡ－Ｉを含有していながら、あまり望ましくないマルチペグ化種を本質的に含まないＨＤＬ粒子組成物を製造することができる。天然ＨＤＬ（ＡｐｏＡ－Ｉ）をペグ化のための基材として使用すると、標的ペグ化（targeted pegylation）の特異性および効率性も向上するが、これは、ＨＤＬを形成するための脂質付加にａｐｏＡ－Ｉの必須アミノ酸残基が必要とされ、ＨＤＬ粒子中の脂質分子により、ＨＤＬの機能がペグ化から保護される傾向があると考えられるからである。他の利点として、一貫性の改良、コスト削減（必要な材料が少ない）、胆汁酸塩の非存在、および分離の容易さ（勾配遠心分離が使用できる）が挙げられる。これに対し、ＷＯ２０１０／１４１０９７において開示されている方法にはスケールアップの問題があり、これは一部、分離が困難であることによる。

【００３０】

本発明は、アポリポタンパク質Ａ－Ｉ（ＡｐｏＡ－Ｉ）を含むペグ化高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）粒子を含む組成物であって、該組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも５０％がモノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである組成物を提供する。一態様において、組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも７０％または少なくとも８０％は、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである。別の態様において、組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも９０％は、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである。また別の態様において、組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも９８％または少なくとも９９％は、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである。

【００３１】

一態様において、該組成物は、マルチペグ化ＡｐｏＡ－Ｉを本質的に含まない。別の態様において、該組成物は、胆汁酸塩を本質的に含まない。

【００３２】

一態様において、組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも５０％は、Ｎ末端でペグ化されている。別の態様において、組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも６０％は、Ｎ末端でペグ化されている。別の態様において、組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも７０％は、Ｎ末端でペグ化されている。別の態様において、組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも８０％は、Ｎ末端でペグ化されている。別の態様において、組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉ中の約８０％は、Ｎ末端でペグ化されている。

【００３３】

一態様において、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉは、ＡｐｏＡ－Ｉに共有結合したポリエチレングリコールを含み、該ポリエチレングリコールは、１０，０００～３０，０００ダルトンの分子量を有する。別の態様において、該ポリエチレングリコールは、１５，０００～２５，０００ダルトンの分子量を有する。別の態様において、該ポリエチレングリコールは、１９，０００～２１，０００ダルトンの分子量を有する。別の態様において、該ポリエチレングリコールは、約２０，０００ダルトンの分子量を有する。

【００３４】

一態様において、ペグ化ＨＤＬ粒子は、ペグ化組換えＨＤＬ粒子またはペグ化突然変異ＨＤＬ粒子である。別の態様において、ペグ化ＨＤＬ粒子は、ペグ化再構成ＨＤＬ粒子である。別の態様において、ペグ化ＨＤＬ粒子は、ペグ化天然ＨＤＬ粒子である。また別の態様において、ペグ化ＨＤＬ粒子は、ペグ化ヒトＨＤＬ粒子である。

【００３５】

本発明は、ペグ化高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）粒子を含む組成物であって、ペグ化ＡｐｏＡ－１以外のペグ化タンパク質を含む組成物も提供する。一態様において、該組成物は、ペグ化ＡｐｏＡ－１および異なるペグ化タンパク質を含む。別の態様において、該組成物は、ペグ化タンパク質を含み、該ペグ化タンパク質は、アポリポタンパク質Ａ－ＩＩ（ａｐｏ　Ａ－ＩＩ）、アポリポタンパク質Ａ－ＩＶ（ＡｐｏＡ－ＩＶ）、アポリポタンパク質Ａ－Ｖ（Ａｐｏ　Ｖ）、アポリポタンパク質Ｃ－Ｉ（Ａｐｏ　Ｃ－Ｉ）、アポリポタンパク質Ｃ－ＩＩ（Ａｐｏ　Ｃ－ＩＩ）、アポリポタンパク質Ｃ－ＩＩＩ（Ａｐｏ　Ｃ－ＩＩＩ）、アポリポタンパク質Ｄ（Ａｐｏ　Ｄ）、アポリポタンパク質Ｅ（Ａｐｏ　Ｅ）、アポリポタンパク質Ｆ（Ａｐｏ　Ｆ）、アポリポタンパク質Ｍ（Ａｐｏ　Ｍ）、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＬＣＡＴ）、コレステリルエステル転送タンパク質（ＣＥＴＰ）、リン脂質転送タンパク質（ＰＬＴＰ）、パラオキソナーゼ、血小板活性化因子アシルヒドロラーゼ（ＰＡＦ－ＡＨ）、クラステリン（ａｐｏ　Ｊ）、血清アミロイドＡ（ＳＡＡ）および組織因子経路インヒビター（ＴＦＰＩ）の少なくとも１つを含む。

【００３６】

一態様において、該組成物中の該タンパク質の少なくとも５０％は、モノペグ化タンパク質である。別の態様において、該組成物中の該タンパク質の少なくとも７０％または少なくとも８０％は、モノペグ化タンパク質である。別の態様において、該組成物中の該タンパク質の少なくとも９０％は、モノペグ化タンパク質である。また別の態様において、該組成物中の該タンパク質の少なくとも９８％または９９％は、モノペグ化タンパク質である。

【００３７】

本発明は、ペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物の調製方法であって、（ａ）ＨＤＬ粒子をポリエチレングリコール源と混合して、混合物を形成すること；（ｂ）工程（ａ）由来の混合物を、ＨＤＬ粒子のタンパク質とポリエチレングリコールの分子との共有結合の形成を許容する条件下で、インキュベートすること；および（ｃ）ペグ化ＨＤＬ粒子を含む該組成物をこれにより調製するように、工程（ｂ）の生成物からペグ化ＨＤＬ粒子を分離することを含む方法も提供する。

【００３８】

一態様において、ＨＤＬ粒子は、組換えＨＤＬ粒子または突然変異ＨＤＬ粒子である。別の態様において、ＨＤＬ粒子は、再構成ＨＤＬ粒子である。別の態様において、ＨＤＬ粒子は、天然ＨＤＬ粒子である。また別の態様において、ＨＤＬ粒子は、ヒトＨＤＬ粒子である。

【００３９】

一態様において、ポリエチレングリコールは、１０，０００～３０，０００ダルトンの分子量を有する。別の態様において、ポリエチレングリコールは、１５，０００～２５，０００ダルトンの分子量を有する。別の態様において、ポリエチレングリコールは、１９，０００～２１，０００ダルトンの分子量を有する。また別の態様において、ポリエチレングリコールは、約２０，０００ダルトンの分子量を有する。一態様において、ポリエチレングリコール源は、メトキシポリ（エチレングリコール）である。

【００４０】

一態様において、ポリエチレングリコールとＨＤＬ粒子とのモル比は、２：１～１０：１である。別の態様において、ポリエチレングリコールとＨＤＬ粒子とのモル比は、４：１～９：１である。別の態様において、ポリエチレングリコールとＨＤＬ粒子とのモル比は、７：１～９：１である。別の態様において、ポリエチレングリコールとＨＤＬ粒子と

のモル比は、７：１～８：１である。別の態様において、ポリエチレングリコールとＨＤＬ粒子とのモル比は、８：１である。また別の態様において、ポリエチレングリコールとＨＤＬ粒子とのモル比は、約８：１である。

【００４１】

一態様においては、工程ａ）において、該混合物の該ＨＤＬ粒子の濃度は、１．２５～１２．５ｍｇ／ｍｌである。別の態様においては、工程（ａ）において、該混合物の該ＨＤＬ粒子の濃度は、約５ｍｇ／ｍｌである。

【００４２】

一態様においては、工程（ｂ）において、ＨＤＬおよびポリエチレングリコール源は、２～４８時間インキュベートされる。別の態様においては、工程（ｂ）において、ＨＤＬおよびポリエチレングリコール源は、４～４８時間、６～３６時間、８～３０時間、１０～２４時間、１２～２０時間、８～１６時間、１０～１４時間、または約１１時間、インキュベートされる。別の態様においては、工程（ｂ）において、ＨＤＬおよびポリエチレングリコール源は、約２０時間インキュベートされる。

【００４３】

一態様においては、工程（ｂ）において、ＨＤＬ粒子およびポリエチレングリコール源は、２℃～３７℃でインキュベートされる。別の態様において、ＨＤＬ粒子およびポリエチレングリコール源は、２℃～３０℃で、２℃～２０℃で、２℃～１０℃で、または３℃～６℃で、インキュベートされる。別の態様において、ＨＤＬ粒子およびポリエチレングリコール源は、４℃～６℃でインキュベートされる。別の態様において、ＨＤＬ粒子およびポリエチレングリコール源は、約４℃でインキュベートされる。別の態様においては、工程（ｂ）において、ＨＤＬおよびポリエチレングリコール源は、約６℃でインキュベートされる。

【００４４】

一態様において、工程（ｂ）は、約１Ｍグリシンを添加することにより該混合物をクエンチングする工程を更に含む。別の態様において、工程（ｂ）は、グリシンを５ｍＭ～７５ｍＭのグリシン濃度になるように添加することにより該混合物をクエンチングする工程を更に含む。別の態様において、混合物は、約１０Ｍのグリシン濃度になるようにクエンチングされる。別の態様において、混合物は、２５～７５ｍＭのグリシン濃度になるようにクエンチングされる。別の態様において、混合物は、４０～６０ｍＭのグリシン濃度になるようにクエンチングされる。別の態様において、混合物は、４８～５２ｍＭのグリシン濃度になるようにクエンチングされる。また別の態様において、該混合物は、約５０ｍＭのグリシン濃度になるようにクエンチングされる。

【００４５】

一態様においては、工程（ｃ）において、該ペグ化ＨＤＬ粒子は、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、工程（ｂ）の該生成物から分離される。別の態様において、本方法は、胆汁酸塩の非存在下で行われる。

【００４６】

本発明は、本明細書に記載の方法により調製される組成物も提供する。一態様において、該組成物は、モノペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉ（ＡｐｏＡ－Ｉ）を含み、該組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも５０％は、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである。別の態様において、組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも７０％または少なくとも８０％は、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである。別の態様において、組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも９０％は、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである。また別の態様において、組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも９８％または９９％は、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである。

【００４７】

一態様において、該組成物は、マルチペグ化ＡｐｏＡ－Ｉを本質的に含まない。別の態様において、該組成物は、胆汁酸塩を本質的に含まない。

【００４８】

一態様において、組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも５０％は、Ｎ末端

でペグ化されている。別の態様において、組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも６０％は、Ｎ末端でペグ化されている。別の態様において、組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも７０％は、Ｎ末端でペグ化されている。別の態様において、組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも８０％は、Ｎ末端でペグ化されている。別の態様において、組成物中の全モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの約８０％は、Ｎ末端でペグ化されている。

【００４９】

本発明は、炎症性血管疾患に罹患した被検体の治療方法であって、該被検体を治療するのに効果的な量の本明細書に記載の組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。一態様において、炎症性血管疾患は、アテロームまたはアテローム性動脈硬化症である。別の態様において、炎症性血管疾患は、アテローム血栓性心臓血管疾患である。

【００５０】

本発明は、脂質異常症に罹患した被検体の治療方法であって、該被検体を治療するのに効果的な量の本明細書に記載の組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。

【００５１】

本発明は、被検体における血漿ＨＤＬレベルを増大させる方法であって、被検体における血漿ＨＤＬレベルを増大させるのに効果的な量の本明細書に記載の組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。

【００５２】

本発明は、被検体におけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進する方法であって、被検体におけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進するのに効果的な量の本明細書に記載の組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。

【００５３】

本発明は、被検体における白血球の量を減少させる方法であって、被検体における白血球の量を減少させるのに効果的な量の本明細書に記載の組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。一態様において、白血球は、単球、好中球またはその両方を含む。

【００５４】

本発明は、炎症性血管疾患に罹患した被検体を治療する際に使用するための、本明細書に記載の組成物も提供する。本発明は、脂質異常症に罹患した被検体を治療する際に使用するための、本明細書に記載の組成物も提供する。本発明は、被検体における血漿高密度リポタンパク質レベルを増大させる際に使用するための、本明細書に記載の組成物も提供する。本発明は、被検体におけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進する際に使用するための、本明細書に記載の組成物も提供する。本発明は、被検体における白血球の量を減少させる際に使用するための、本明細書に記載の組成物も提供する。

【００５５】

本発明は、被検体に化合物を投与する方法であって、該被検体に該化合物をこれにより投与するように、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した該化合物を含む組成物のある量を該被検体に投与することを含む方法も提供する。一態様において、該化合物は、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＬＣＡＴ）である。別の態様において、該化合物は、野生型ＡｐｏＬ－１（ＡｐｏＬ－１　ＷＴ）である。

【００５６】

本発明は、被検体におけるＬＣＡＴ量を増大させる方法であって、被検体におけるＬＣＡＴ量を増大させるのに効果的な量の、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。

【００５７】

本発明は、アテローム性動脈硬化症に罹患した被検体の治療方法であって、該被検体を治療するのに効果的な量の、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。

【００５８】
本発明は、あるタイプの腎疾患に罹患しているかまたはあるタイプの腎疾患のリスクがある被検体の治療方法であって、該被検体を治療するかまたは該被検体における腎疾患のリスクを低減もしくは除去するのに効果的な量の、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴまたはＡｐｏＬ－１　ＷＴを含む組成物を該被検体に投与することを含む方法も提供する。
【００５９】
本発明は、被検体に化合物を投与する際に送達ビヒクルとして使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した化合物を含む組成物も提供する。
【００６０】
本発明は、被検体におけるＬＣＡＴ量を増大させる際に使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物も提供する。
【００６１】
本発明は、アテローム性動脈硬化症に罹患した被検体を治療する際に使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴを含む組成物も提供する。
【００６２】
本発明は、あるタイプの腎疾患に罹患した被検体を治療するかまたは被検体における腎疾患のリスクを低減もしくは除去する際に使用するための、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＬＣＡＴまたはＡｐｏＬ－１　ＷＴを含む組成物も提供する。
【００６３】
前述の態様について、本明細書において開示する各態様は、他の開示される態様それぞれに適用されるものと企図される。
【００６４】
定義
本明細書において使用する場合、特に明記しない限り、次の用語はそれぞれ、下記の定義を有するものとする。
【００６５】
薬剤を「投与すること」は、当業者に公知の多様な方法および送達系の任意のものを用いて実現するまたは行うことができる。「投与すること」は、限定するものではないが、例えば、静脈内、経口、筋肉内、血管内、動脈内、冠動脈内、心筋内および皮下に投与することであってもよい。
【００６６】
用語「高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）粒子」は、当業者によりそのように呼ばれるＨＤＬ粒子を包括的に含み、プレβ－ＨＤＬ、β－ＨＤＬ、HDL_2（HDL_{2a}およびHDL_{2b}を包含する）、HDL_3を、天然または再構成ＨＤＬ（ｒＨＤＬ）粒子として、包含する。ＨＤＬ粒子は、広範な血漿リポタンパク質群を表し、サイズ、アポリポタンパク質（ａｐｏ）および脂質の組成において相当な多様性を呈する。その構造特性および組成は複雑である可能性があるが、その大半の基本形態において、ＨＤＬは、リン脂質およびアポリポタンパク質（ａｐｏ）を含有する。２０種を超えるタンパク質が、ＨＤＬ粒子と関連があることが示されており、そのいくつかとして、アポリポタンパク質Ａ－Ｉ（ａｐｏ　Ａ－ＩＩ）、アポリポタンパク質Ａ－ＩＩ（ａｐｏ　Ａ－ＩＩ）、アポリポタンパク質Ａ－ＩＶ（ＡｐｏＡ－ＩＶ）、アポリポタンパク質Ａ－Ｖ（Ａｐｏ　Ｖ）、アポリポタンパク質Ｃ－Ｉ（Ａｐｏ　Ｃ－Ｉ）、アポリポタンパク質Ｃ－ＩＩ（Ａｐｏ　Ｃ－ＩＩ）、アポリポタンパク質Ｃ－ＩＩＩ（Ａｐｏ　Ｃ－ＩＩＩ）、アポリポタンパク質Ｄ（ＡｐｏＤ）、アポリポタンパク質Ｅ（Ａｐｏ　Ｅ）、アポリポタンパク質Ｆ（Ａｐｏ　Ｆ）、アポリポタンパク質Ｍ（Ａｐｏ　Ｍ）、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＬＣＡＴ）、コレステリルエステル転送タンパク質（ＣＥＴＰ）、リン脂質転送タンパク質（ＰＬＴＰ）、パラオキソナーゼ、血小板活性化因子アシルヒドロラーゼ（ＰＡＦ－ＡＨ）、クラステリン（ａｐｏ　Ｊ）、血清アミロイドＡ（ＳＡＡ）および組織因子経路インヒビター（ＴＦＰＩ）が挙げられる（ｖｏｎ　Ｅｃｋａｒｄｓｔｅｉｎ、１９９４

）。

【００６７】

最も豊富且つ主要なアポリポタンパク質はａｐｏＡ－Ｉであり（Ｒｙａｎ、２０１０；Ａｓｓｍａｎｎ、１９８２；ｖｏｎ　Ｅｃｋａｒｄｓｔｅｉｎ、１９９４；Ｓｋｉｎｎｅｒ、１９９４；Ａｎａｎｔｈａｒａｍａｉａｈ、１９９１；Ｂｒｏｕｉｌｌｅｔｔｅ、１９９５；Ｂｒｏｕｉｌｌｅｔｔｅ、２００１；Ｆｒａｎｋ　ＰＧ、２０００；Ｓｅｇｒｅｓｔ、２０００；Ｋｌｏｎ、２００２）、ａｐｏＡ－Ｉは、リン脂質およびコレステロールを伴っており、コアであるコレステリルエステルを封入している（Ｓｔｒｏｅｓ、ＵＳ２００８／０２１４４３４　Ａ１）。ＨＤＬは、また、血漿から単離されているかまたは遺伝子工学により製造されている突然変異ＨＤＬアポリポタンパク質から調製された突然変異ＨＤＬであってもよい。

【００６８】

本明細書において使用する場合、「ヒトＨＤＬ粒子」は、ヒト由来の原料から全部または一部が誘導されたＨＤＬ粒子を意味する。ヒトＨＤＬ粒子は、天然のもの、すなわち、ヒト血清から単離されたものであっても、または、再構成されたもの、例えば、ヒトアポリポタンパク質、アポリポタンパク質断片もしくはペプチドをｉｎ　ｖｉｔｒｏでリン脂質ベシクルと共にインキュベートすることにより形成されたものであってもよい。ヒトＨＤＬ粒子は、また、遺伝子操作ヒトアポリポタンパク質から調製された組換えヒトＨＤＬ粒子であっても、または、ヒト血漿から単離されているかもしくは遺伝子工学により製造されている突然変異ヒトＨＤＬアポリポタンパク質から調製された突然変異ヒトＨＤＬであってもよい（Ｒｙａｎ、２０１０；Ｇｉｌｌｏｔｔｅ、１９９６；Ｎｉｓｓｅｎ、２００３；Ｍａｔｓｕｎａｇａ　１９９９；Ｃｈｏ、２００９；Ｚｈａｎｇ、２０１０）。

【００６９】

「ペグ化ＨＤＬ粒子」は、共有結合を介してＨＤＬ粒子のタンパク質に結合した１つ以上のＰＥＧ分子を有するＨＤＬ粒子であり、その点が非ペグ化ＨＤＬ粒子と異なっている。ＨＤＬ粒子のペグ化は、該粒子のタンパク質成分はペグ化するが脂質成分はペグ化しない。したがって、ＨＤＬ粒子、例えば、再構成ＨＤＬ（ｒＨＤＬ）粒子が、アポリポタンパク質Ａ－Ｉのみが存在するようなものである場合には、ペグ化ＨＤＬ粒子中のペグ化タンパク質はすべて、ペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉである。しかし、ＨＤＬ粒子が、アポリポタンパク質Ａ－Ｉ以外のタンパク質、例えば天然のヒトＨＤＬ粒子を含有する場合には、ペグ化ＨＤＬ粒子は、ペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉ以外のペグ化タンパク質を含有してもよい。ペグ化が非選択的なものである場合、ペグ化が他の因子、例えば、タンパク質の相対位置により影響を受けないと仮定すれば、異なるタイプのペグ化タンパク質の比率は同じであってもよい。１つのタンパク質が他のタンパク質と比較してＨＤＬ粒子の外側寄りに位置している場合、より外側のタンパク質の方がより高い比率（％）でペグ化されることができると予想できる。

【００７０】

「モノペグ化（された）」は、ＰＥＧ誘導体化タンパク質に適用される場合、１つ、ただし１つ以下のポリエチレングリコール分子が共有結合を介してタンパク質に結び付いていることを意味するものとする。

【００７１】

「マルチペグ化（された）」は、ＰＥＧ誘導体化タンパク質に適用される場合、２つ以上の、例えば、２つ、３つ、４つ、またはそれを超えるポリエチレングリコール分子が、それぞれ共有結合を介して該タンパク質に結び付いていることを意味するものとする。例えば、共有結合を介して自身に結び付いている２つのポリエチレングリコール分子を有するタンパク質は、マルチペグ化タンパク質である。

【００７２】

本明細書において使用する場合、組成物中のタンパク質の比率（％）、例えば、「組成物中のモノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの比率（％）」は、モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉの重量基準での比率（％）を指してもモル量基準での比率（％）を指してもよい。一態様において、比

率（％）は、モル量基準での比率（％）を指す。例えば、ＡｐｏＡ－Ｉを含むＨＤＬ粒子を含む組成物であって、該組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも５０％がモノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉである組成物、とは、モル量基準で該組成物中のＡｐｏＡ－Ｉの少なくとも５０％がモノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉであることを意味する。

【００７３】

「本質的に含まない」は、マルチペグ化されたＰＥＧ誘導体化タンパク質、例えばマルチペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉについて使用した場合、ある組成物に関して、ある組成物におけるマルチペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉが、存在しないかまたは従来の方法では検出できないレベルであることを意味するものとする。アポリポタンパク質Ａ－Ｉ（ＡｐｏＡ－Ｉ）は、後述するようにこれをペグ化することになるが、野生型アポリポタンパク質またはその変異体［Ａ－Ｉ　Ｍｉｌａｎｏ（Ａｒｇ１７３Ｃｙｓ）またはその変異体（Ａｒｇ１７３Ｐｒｏ）が挙げられる］、ならびに、２００７年５月２９日に交付された米国特許第７，２２３，７２６号（Ｏｄａら）に記載されている変異体であってもよい。

【００７４】

「モノペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉ」は、共有結合を介して自身に結合している単一のＰＥＧ分子を有し、その点がマルチペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉとも非ペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉとも異なっているアポリポタンパク質Ａ－Ｉである。

【００７５】

「Ｎ末端でペグ化されている」は、ＰＥＧ誘導体化されたペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に適用される場合、誘導体化されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のＮ末端領域にポリエチレングリコール分子が共有結合を介して結び付いていることを意味するものとし、Ｎ末端領域とは、直鎖状の形態である場合、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質分子のＮ末端から５０％、２５％または１０％の領域である。一態様において、「Ｎ末端でペグ化されている」とは、ポリエチレングリコール分子が共有結合を介してＮ末端残基（すなわち、Ｎ末端）に結び付いていることを意味するものとする。

【００７６】

本明細書において使用する場合、「単離された」化合物とは、単離という肯定的な行為に従って、未精製の反応混合物または天然源から単離された化合物のことである。単離という行為は、混合物または天然源を構成している他の成分から当該化合物を分離することを必ずしも含んでおらず、何らかの不純物、未知の副生物および残存量の他の成分が残っていてもよい。精製は、単離という肯定的な行為の一例である。

【００７７】

「炎症性血管疾患」は、ヒトの血管または心臓血管系の疾患を意味するものとし、ヒトの、血管系または心臓血管系の組織、例えば血管における炎症応答を含む。一態様において、炎症性血管疾患は、糖尿病性心臓血管疾患である。

【００７８】

「脂質異常症」は、被検体における血漿コレステロール、トリグリセリド（ＴＧ）、もしくはその両方の上昇、または、アテローム性動脈硬化症の発症の一因となる高密度リポタンパク質低値を特徴とする、病理学的状態である。原因は、原発性（遺伝性）のものであっても続発性のものであってもよい。血清コレステロールのレベルが２４０ｍｇ／ｄＬ超（６．２ｍｍｏｌ／Ｌ超）であることが脂質異常症の指標である。したがって、本明細書において使用する場合、用語「脂質異常症」または「脂質異常症の」は、血漿中の脂質レベルの異常な上昇または低下を指し、このような状態としては、限定するものではないが、次の病態に伴う脂質レベルの変質が挙げられる：冠動脈心臓疾患；冠動脈疾患；心臓血管疾患、高血圧、再狭窄、血管または血管周囲の疾患；脂質異常障害；異リポタンパク血症；低密度リポタンパク質コレステロール高値；超低密度リポタンパク質コレステロール高値；高密度リポタンパク質低値；リポタンパク質Ｌｐ（ａ）コレステロール高値；アポリポタンパク質Ｂ高値；アテローム性動脈硬化症（アテローム性動脈硬化症の治療および予防を含む）；高脂血症；高コレステロール血症；家族性高コレステロール血症（ＦＨ

）；家族性複合型高脂血症（ＦＣＨ）；リポタンパク質リパーゼ欠損症、例えば、高トリグリセリド血症、低αリポタンパク血症、および高コレステロール血症リポタンパク。

【００７９】

「胆汁酸塩を本質的に含まない」とは、ある組成物に関して、ある組成物における胆汁酸塩（胆汁酸、コール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸およびリトコール酸ベースの胆汁酸塩を包含する）のレベルが、存在しないレベルまたは従来の方法では検出できないレベルであることを意味するものとする。胆汁酸塩を使用せずに調製しても微量の胆汁酸塩を含有し得る組成物は、この範疇に入る。

【００８０】

アポリポタンパク質Ａ－Ｉ（ａｐｏＡ－Ｉ）は、野生型アポリポタンパク質またはその変異体であってもよく、例としては、Ａ－Ｉ　Ｍｉｌａｎｏ（Ａｒｇ１７３Ｃｙｓ）またはその変異体（Ａｒｇ１７３Ｐｒｏ）、ならびに、例えば米国特許第７，２２３，７２６号、Ｏｄａら（２００７年５月２９日交付）およびＰＣＴ国際出願公開ＷＯ２０１０／０９３９１８号（２０１０年８月１９日公開）に記載されている変異体および模倣体が挙げられ、これらの文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。野生型ヒトＡｐｏＡ－Ｉタンパク質の配列は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿０００００３０で見つけられ、その内容は、本明細書に組み込まれる。アポリポタンパク質Ａ－Ｉは、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＭ＿０００００３９．１でコードされるもの、または、同様に、ＧｅｎＢａｎｋ：ＢＣ００５３８０．１アポリポタンパク質ｃＤＮＡ）でコードされるものであってもよく、この両配列は、本明細書に組み込まれる。

【００８１】

本開示では、アポリポタンパク質Ａ－Ｉ類似体および「モノペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉ類似体」が企図される。そのような野生型類似体は、野生型配列に対して７０％～９９％の配列同一性を有していてもよい。モノペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉ類似体は、当業者に公知の慣例的なアッセイの任意のもの、例えば後述するアッセイにより測定されるように、コレステロール流出（例えば、ヒトマクロファージ泡沫細胞からの）を媒介することが可能である。

【００８２】

アポリポタンパク質Ａ－Ｉの精製方法は、陰イオン交換クロマトグラフィーゲルを用いてＡｐｏＡを精製する方法が米国特許第６，０９０，９２１号および同第６，４２３，８３０号に記載されており、これらの特許は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００８３】

一態様において、ペグ化ＨＤＬ粒子は、参照により組み込まれるＵＳ７，７５９，３１５Ｂ２により特定された用量範囲内で投与される。ＨＤＬの投与量範囲は、０．１～２００ｍｇである。別の態様において、投与量範囲は、１回の治療について、体重１ｋｇ当たりａｐｏＡ－Ｉが２０ｍｇ～体重１ｋｇ当たりａｐｏＡ－Ｉが２００ｍｇである。別の態様において、投与量範囲は、１回の治療について、体重１ｋｇ当たりＨＤＬが１０～８０ｍｇ（アポリポタンパク質に基づく重量）である。例えば、投与されるＨＤＬの投与量は、体重１ｋｇ当たりＨＤＬが約０．２～１００ｍｇ（アポリポタンパク質に基づく重量）であってもよく、投与は、静脈内注射として、および／または、臨床的に必要な期間、例えば数分～数時間の範囲、例えば最長２４時間の期間にわたる注入として行われる。必要に応じ、ＨＤＬ投与は、１回または数回繰り返してもよい。実際の投与量は、治療対象となっている疾患の性質、およびＨＤＬが投与されている速度の両方により決定されよう。用量は、治療期間中に異なる量で投与することができ、例えば、治療の開始時には１回または２回の高用量のボーラス投与とし、その後、より低用量の維持量とする。

【００８４】

再構成ＨＤＬの製造については、例として、米国特許第５，６５２，３３９号に記載がある。組換えＨＤＬの製造については、例として、米国特許第６，５５９，２８４号およびＰＣＴ国際特許出願公開ＷＯ８７／０２０６２号に記載がある（大腸菌、酵母およびＣ

ＨＯ細胞を用いる方法）。これらの文書および米国特許第７，７５９，３１５　Ｂ２号の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【００８５】

ヒトにおいてＨＤＬ粒子を治療的または予防的に使用する場合、血漿中のａｐｏＡ－ＩまたはＨＤＬ粒子のレベルの相当な増大を達成するには、グラム単位の量のＨＤＬ用量が必要である（例えば、米国特許第５，６５２，３３９号を参照のこと）。

【００８６】

一態様において、医薬製剤またはペグ化ＨＤＬ粒子は、約６カ月、約５カ月、約４カ月、約３カ月、約２カ月、または約１カ月にわたり、週１回被検体に投与される。一態様において、医薬製剤またはペグ化ＨＤＬ粒子は、ほぼ毎日、約１日おき、約３日ごと、約４日ごと、約５日ごと、約６日ごと、約７日ごと、約８～１０日ごと、または約１１～１４日ごとに、投与される。

【００８７】

一態様において、ペグ化ＨＤＬ粒子は、約２８０～約３２０ｍＯｓｍのモル浸透圧濃度を有する液体医薬製剤として投与される。一態様において、ペグ化ＨＤＬ粒子は、約２９０ｍＯｓｍのモル浸透圧濃度を有する液体医薬製剤として投与される。

【００８８】

ＨＤＬ粒子中に埋め込まれたモノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉ（野生型または突然変異タンパク質）の送達の１つの方法は、Ｃｈｉｅｓａ　Ｇ、２００２およびＳｉｒｔｏｒｉ、１９９９により記載されているように、大量のタンパク質を患者に静脈内注入することによる。ＨＤＬ粒子中に埋め込まれたモノペグ化ａｐｏＡ－Ｉ（野生型または突然変異タンパク質）は、単独で、または、他の心臓血管薬もしくはトリグリセリド低下薬、例えばスタチンと組み合わせて投与できる。該モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉは、注射用に、滅菌、凍結乾燥、粉末化された形態で、賦形剤および安定化剤を用いた慣用的な方法で調製してもよく、または、経口投与用に、安定化剤、ならびに、ペプチダーゼによる口および胃腸管での代謝を阻害する物質と共に調製してもよい。該モノペグ化ＡｐｏＡ－Ｉは、また、限定するものではないが、静脈内注入、または筋肉内投与などの方法により投与してもよい。一態様において、ペグ化ＨＤＬ粒子は、静脈内注入により被検体の末梢静脈中に投与される。複数の態様において、ペグ化ＨＤＬ粒子（単独であるか医薬組成物の形態であるかを問わない）は、腕窩（fossa of the arm）または胸部正中線（central line into the chest）に静脈内投与される。複数の態様において、医薬製剤は、被検体の腕の肘前窩にある橈側皮静脈または肘正中皮静脈（cephalic or median cubital vessel）中に注入される。

【００８９】

本明細書において使用する場合、「医薬用担体」は、本化合物を動物またはヒトに送達するための薬学的に許容される溶媒、懸濁化剤またはビヒクルである。医薬用担体は、液体、エアロゾル、ゲルまたは固体であってもよく、想定している投与様式の計画に合わせて選択される。一態様において、医薬用担体は、静脈内投与に適した滅菌済の薬学的に許容される溶媒である。

【００９０】

一態様において、滅菌済の液体医薬製剤は、ショ糖－マンニトール担体およびリン酸緩衝液を含む。一態様において、ショ糖－マンニトール担体は、約６．０％～約６．４％のショ糖および約０．８％～約１％のマンニトールを含む。一態様において、ショ糖－マンニトール担体は、約６．２％のショ糖および約０．９％のマンニトールを含む。一態様において、滅菌済の液体医薬製剤のｐＨは、約７．０～約７．８である。一態様において、滅菌済の液体医薬製剤のｐＨは、約７．５である。アポリポタンパク質Ａ－Ｉを有するＨＤＬ粒子の製剤および被検体への投与方法は、米国特許第７，４３５，７１７号に記載されており、同文献の内容は、その全体が本明細書に組み込まれ、同製剤および方法は、本明細書に記載のアポリポタンパク質Ａ－Ｉを有するペグ化ＨＤＬ粒子を得るために使用することができる。

【００９１】

他の注射可能な薬物送達系としては、溶液剤、懸濁剤およびゲル剤が挙げられる。経口送達系としては、錠剤およびカプセル剤が挙げられる。これらは、賦形剤、例えば、結合剤（例：ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピリロドン（pyrilodone）、他のセルロース性材料およびデンプン）、希釈剤（例：乳糖および他の糖、デンプン、リン酸二カルシウムならびにセルロース性材料）、崩壊剤（例：デンプンポリマーおよびセルロース性材料）ならびに滑沢剤（例：ステアレートおよびタルク）を含有できる。

【００９２】

再構成可能な送達系を得るための溶液剤、懸濁剤および散剤は、ビヒクル、例えば、懸濁化剤（例：ガム、ザンタン（zanthan）、セルロース性物質および糖）、湿潤剤（例：ソルビトール）、可溶化剤（例：エタノール、水、ＰＥＧおよびプロピレングリコール）、界面活性剤（例：ラウリル硫酸ナトリウム、Ｓｐａｎ、Ｔｗｅｅｎおよびセチルピリジン）、保存剤および酸化防止剤（例：パラベン、ビタミンＥおよびＣ、ならびにアスコルビン酸）、固化防止剤、コーティング剤およびキレート化剤（例：ＥＤＴＡ）を含む。

【００９３】

一態様において、治療対象となる被検体のＨＤＬ－コレステロールレベルは、男性で４５ｍｇ／ｄｌ未満、または女性で５０ｍｇ／ｄｌ未満である。一態様において、治療対象となる被検体（男性または女性）のＨＤＬ－コレステロールは、４０ｍｇ／ｄＬ未満［１．０４ｍｍｏｌ／Ｌ未満］である。

【００９４】

本明細書に記載の治療方法におけるペグ化ＨＤＬおよび組成物は、効果的な量で使用される。本明細書において使用する場合、用語「効果的な量」は、本発明の様式で使用した際に、所望の治療応答を得るのに十分であり過度の有害副作用（例えば、毒性、刺激またはアレルギー応答）を伴わず、妥当な利益／リスク比に見合う成分量を指す。具体的な効果的な量は、治療対象となる特定の病態、患者の身体状態、治療対象となる哺乳動物のタイプ、治療の継続期間、併用療法（用いるのであれば）の性質、および用いられる特定の製剤、および化合物またはその誘導体の構造などの因子によって変わることになる。

【００９５】

本明細書において使用する場合、「疾患の治療」、または、疾患、障害もしくは病態、例えば心臓血管疾患を「治療すること」は、疾患、障害もしくは病態の阻害、退縮、もしくは静止を誘導すること、または、疾患、障害もしくは病態の症状を改善もしくは緩和することを包括的に含む。一態様において、その症状としてアテロームを有する疾患の治療は、アテロームの体積の減少を含む。非限定的な例としては、アテロームおよびアテローム性動脈硬化症が挙げられる。

【００９６】

本明細書において使用する場合、疾患、病態または障害「に罹患した被検体」は、その疾患、病態または障害を有すると断定的に診断されている被検体を意味する。

【００９７】

本明細書において使用する場合、「ポリエチレングリコール」（ＰＥＧ）は、特に明記しない限り、ペグ化分子に関しては、式$OH-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_n-CH_2-OH$（式中、ヒドロキシ基の１つは、ペグ化対象となる分子との共有結合に置きかえられており、ｎはオキシエチレン基の数である）を有するポリマーを意味する。本発明において有用なポリエチレングリコールは、５，０００～４０，０００の平均分子量を有することができる。各ＰＥＧ分子の実際の分子量は、平均分子量の９０％以上１１０％以下であるべきである。特定の態様において、ＰＥＧの平均分子量は、５，０００、１０，０００、２０，０００、３０，０００および４０，０００である。一態様において、ＰＥＧは、分枝ＰＥＧである。複数の態様において、ＰＥＧは、直鎖、置換または無置換のものであってもよい。

【００９８】

本明細書において使用する場合、「ポリエチレングリコール源」は、分子をペグ化することを目的とした、当技術分野において認知されている任意のＰＥＧ源を意味するものと

する。非限定的な例としては、メトキシＰＥＧ（例：分子量２０，０００のメトキシＰＥＧプロピオンアルデヒドの形態、ＪｅｎＫｅｍ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＵＳＡ、Ａｌｌｅｎ、ＴＸから入手可能）が挙げられる。他のＰＥＧ源としては、ポリエチレングリコール２００、３００、４００、６００、１０００、１４５０、３３５０、４０００、６０００、８０００、２００００、３００００および４００００（ＣＡＳ番号：２５３２２－６８－３）、ならびにトレシルモノメトキシＰＥＧ（ＴＭＰＥＧ）が挙げられる。分枝およびマルチアーム（multiarm）ＰＥＧを使用することもできる。ペグ化の手法は、Ｒｏｂｅｒｔｓら、Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．、２００２年6月１７日、５４（４）、４５９～７６ページにおいて考察されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。－NH_2、－ＯＨまたは－ＳＨを標的とする活性化ＰＥＧを使用できる。

【００９９】

一態様において、ペグ化分子は、次のように作られる：ＰＥＧアルデヒドを、－２０℃で保管し、保管所から取り出して室温と完全に平衡化させてから使用した。ヒトＨＤＬ粒子を、５０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５、１０ｍＭナトリウムシアノボラヒドリド（cyanoborahydride）中で、濃度約４ｍｇ／ｍｌにて再構成させた。使用予定のＰＥＧアルデヒドの量（ＰＥＧ：ＨＤＬタンパク質のモル比＝８：１）を算出し、これを５０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５、１０ｍＭナトリウムシアノボラヒドリドを用いた緩衝液に溶解した。次いで、ＰＥＧ溶液を、穏やかに旋回させながら、タンパク質溶液にゆっくり添加した。この混合物を４℃で一晩インキュベートした。反応物は、グリシンを５０ｍＭになるように添加してクエンチングし、４℃で１６時間インキュベートした。

【０１００】

本明細書において使用する場合、明示された数に関しての「約」は、明示された値の±１％の範囲を包括的に含む。したがって、例としては、約１００ｍｇ／ｋｇには、９９、９９．１、９９．２、９９．３、９９．４、９９．５、９９．６、９９．７、９９．８、９９．９、１００、１００．１、１００．２、１００．３、１００．４、１００．５、１００．６、１００．７、１００．８、１００．９および１０１ｍｇ／ｋｇが含まれる。したがって、約１００ｍｇ／ｋｇには、一態様において、１００ｍｇ／ｋｇが含まれる。

【０１０１】

本明細書において使用する場合、化合物の「量」または「用量」（例えば、ミリグラム単位で測定されるもの）は、医薬品の形態に関わらず、医薬品中に存在する化合物の重量を指す。

【０１０２】

本明細書において使用する場合、被検体における疾患の進行または疾患の併発の「阻害」は、被検体における疾患の進行および／または疾患の併発を予防または抑制することを意味する。

【０１０３】

範囲が示される場合、当該範囲内のすべての整数およびその１０分の１の数も本発明により示されることは理解される。例えば、「０．２～５ｍｇ／ｋｇ」は、０．２ｍｇ／ｋｇ、０．３ｍｇ／ｋｇ、０．４ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、０．６ｍｇ／ｋｇなど、最大５．０ｍｇ／ｋｇを開示していることになる。

【０１０４】

ペグ化ＨＤＬでの治療は、併用療法または補助療法の一部であってもよく、すなわち、この薬物を必要とする被検体または患者に、１つ以上の本化合物と併せて、罹患している疾患のための別の薬物、例えば、スタチン、ナイアシン、エストロゲン、エゼンチミブ（ezemtimibe）、ニコチン酸を処置するかまたは与える。この併用療法は、患者に一方の薬物をまず処置し、次いで、他方のまたはこれら２つの薬物を同時または同時期に与える、逐次療法であってもよい。これらの薬物は、用いられる剤形次第で、同じ経路または２つ以上の異なる投与経路により独立に投与できる。

【０１０５】

本明細書に記載の多様な要素のすべての組合せが、本発明の範囲内である。

【０１０６】
本発明は、次に記載する「実験の詳細」を参照することにより、更によく理解されると思われるが、当業者には、詳細に記載される具体的な実験は、その後に続く「特許請求の範囲」においてより完全な形で記載されるとおり、本発明を例証するものにすぎないことは容易に認識されよう。
【実験の詳細】
【０１０７】
例１：ヒトａｐｏＡ－Ｉのペグ化
ヒトａｐｏＡ－Ｉのペグ化形態は、その重大な生物活性、すなわち、マクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出の促進を保っている。
【０１０８】
メトキシＰＥＧプロピオンアルデヒド（Ｍ－ＰＥＧ－ＡＬＤ）、ＭＷ２００００をＪｅｎＫｅｍ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＵＳＡ（Ａｌｌｅｎ、ＴＸ）から購入した。ＰＥＧの入っている瓶を保管所から取り出し、室温と完全に平衡化させた。５０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５、１０ｍＭナトリウムシアノボラヒドリド中で再構成させたＡｐｏＡ－Ｉを溶解した。ＰＥＧアルデヒドを、ＰＥＧ：ａｐｏＡ－Ｉのモル比１０：１で使用した。必要量のＰＥＧを、５０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５、１０ｍＭナトリウムシアノボラヒドリドのアリコートに溶解した。このＰＥＧ調製物を、穏やかに旋回させながらヒトａｐｏＡ－Ｉ溶液と混合した。ヒトａｐｏＡ－Ｉの最終濃度は、約２～６ｍｇ／ｍｌであった。この混合物を４℃で一晩インキュベートした。マルチペグ化種の形成を最小限にするために、反応物は、１０ｍＭの濃度または５０ｍＭの濃度になるようにＩＭグリシンを添加することによりクエンチングした。これらの条件下では、ａｐｏＡ－ＩはＮ末端で優先的にペグ化された。このペグ化ヒトａｐｏＡ－ＩをＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびクーマシーブリリアントブルー染色により分析したので、結果を図１に示す。
【０１０９】
４℃で約１６時間インキュベーションしたところ、およそ半分のヒトａｐｏＡ－Ｉ分子がペグ化された（図１Ａ）。ペグ化ａｐｏＡ－Ｉは、これらの条件下では、大半が同族の種であるように見えた。モノペグ化種は観察されたものの、調製物中には依然として相当量の天然ａｐｏＡ－Ｉが存在したことから、反応は不完全だった（図１Ａ－２）。インキュベーション温度を室温に変更した場合には、大部分のａｐｏＡ－Ｉがペグ化された（図１Ｂ）。しかし、これらの条件下ではａｐｏＡ－Ｉのマルチペグ化が支配的であるように見えたが、その理由は、より高い分子量を有する複数種のＰＥＧ－ａｐｏＡ－Ｉが生じたからであった（図１Ｂ）。
【０１１０】
例２：マクロファージ細胞からのコレステロール流出
以下の方法により、マウス腹膜マクロファージにコレステロールを担持させた：放射性コレステロールトレーサー（［^{3}Ｈ］コレステロール）の存在下で、修飾されたＬＤＬ調製物（１ｍｌ当たり１００μｇのアセチル－ＬＤＬタンパク質）と共に細胞をインキュベートする。細胞は3回洗浄し、最後の洗浄は、０．２％ウシアルブミン添加細胞培養培地中で３０分間平衡状態にしてから行った。次いで、修飾されていない天然ａｐｏＡ－Ｉまたはペグ化ａｐｏＡ－Ｉ調製物を添加することにより、コレステロール流出を開始させた。この流出アッセイにおける遊離ＰＥＧ分子の潜在的な効果を排除するために、流出アッセイの間、同量のクエンチング済みＰＥＧ調製物を、修飾されていないａｐｏＡ－Ｉ調製物のグループに添加した。結果を図２に示す。
【０１１１】
図示されているように、ヒトａｐｏＡ－Ｉのペグ化は、コレステロール流出を促進するａｐｏＡ－Ｉの活性に悪影響を及ぼさなかった。マクロファージ泡沫細胞からａｐｏＡ－ＩまたはＰＥＧ－ａｐｏＡ－Ｉへのコレステロール流出は、類似の用量応答を示した（図２）。図２の流出アッセイにおいて使用したＰＥＧ－ａｐｏＡ－Ｉ調製物は、図１Ａに示す調製物由来のものであった。しかし、図１Ｂに示すａｐｏＡ－Ｉのマルチペグ化は、マ

クロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出の減少を引き起こした（図２）。したがって、マルチペグ化ａｐｏＡ－Ｉは、マクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出促進能の低下により示されるように、機能が喪失している（図２Ｂ）。

【０１１２】

例３：ヒトＨＤＬのペグ化

方法

１）ＨＤＬ粒子の単離。ヒトＨＤＬを、密度勾配遠心分離によりヒト血漿から単離した。非ＨＤＬリポタンパク質が、ｄ＝１．０６３での密度勾配遠心分離により血漿から１番目に取り出された。次いで、ＨＤＬが、ｄ＝１．２１での密度勾配遠心分離の一番上のリポタンパク質層として回収された。

【０１１３】

２）ＨＤＬのペグ化。手順：メトキシＰＥＧプロピオンアルデヒド（Ｍ－ＰＥＧ－ＡＬＤ）、ＭＷ２００００をＪｅｎＫｅｍ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＵＳＡ（Ａｌｌｅｎ、ＴＸ）から購入した。ＰＥＧを室温と完全に平衡化させた。ヒトＨＤＬを、密度勾配遠心分離によりヒト血漿から単離した。ＨＤＬではないリポタンパク質が、ｄ＝１．０６３での密度勾配遠心分離により血漿から１番目に取り出された。次いで、ＨＤＬが、ｄ＝１．２１での密度勾配遠心分離の一番上のリポタンパク質層として回収された。精製ヒトＨＤＬを、５０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５、１０ｍＭナトリウムシアノボラヒドリド中で再構成させた。使用予定のＰＥＧアルデヒドの量を、ＰＥＧ：ＨＤＬタンパク質のモル比＝８：１として算出した。必要量のＰＥＧを５０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５、１０ｍＭナトリウムシアノボラヒドリドのアリコートに溶解し、穏やかに旋回させながら、このＰＥＧ調製物をヒトＨＤＬ溶液と混合した。ヒトＨＤＬタンパク質の最終濃度は、約５ｍｇ／ｍｌであった。この混合物を４℃で一晩インキュベートした。マルチペグ化種の形成を最小限にするために、１Ｍグリシンを、濃度が５０ｍＭになるように添加することにより、反応物をクエンチングした。これらの条件下では、ＨＤＬタンパク質は、Ｎ末端で優先的にペグ化された。

【０１１４】

３）ペグ化ＨＤＬ粒子の単離。ペグ化ＨＤＬは、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、組み込まれていないＰＥＧ分子から容易に分離し、精製することができる。

【０１１５】

４）クーマシーブルー染色：ゲルを５０％ＭｅＯＨ、１０％ＨｏＡＣ、４０％Ｈ２Ｏの中で３０分間、予め固定（prefix）させた。０．２５％クーマシーブリリアントブルーＲ－２５０を用いて染色ゲルを前述の溶液中で２～４時間、ゲルが均一な青色になるまで染色した。染料溶液中でゲルが視認できなくなっていれば、染色は完全であった。５％ＭｅＯＨ、７．５％ＨｏＡＣ、８７．５％Ｈ２Ｏの中で４～２４時間脱染するが、このとき、同じ溶液を複数回取り変える。脱染は、背景が透明になるまで行う。

【０１１６】

５）ウェスタンブロット：約５～２００μｇのＨＤＬタンパク質を１：１（ｖ：ｖ）の比率でＬａｅｍｍｌｉ緩衝液と混合し、５分間かけて８０℃に加熱した。試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上に載せ、青色の表面がゲルの底になるまでゲルを動かした。タンパク質をゲルからニトロセルロース膜上に移動させて、免疫ブロット分析を行う。ニトロセルロース膜は、２０～３０ｍｌの１倍トリス緩衝液に５％の脱脂粉乳および０．１％のＴｗｅｅｎ２０を添加したものの中で、振盪機上で３０分間ブロックする。一次抗ヒトａｐｏＡ－Ｉ抗体を希釈したトリス緩衝液、５％の乳および０．１％のＴｗｅｅｎ２０と共にインキュベートする。インキュベートは室温で４時間行う。約５０ｍｌの１倍トリス緩衝液に０．１％Ｔｗｅｅｎ２０を添加したものの中で、振盪機上で室温にて５～１０分間、３回洗浄する。室温で３０分～１時間、二次抗体と共にインキュベートする。ＡｍｅｒｓｈａｍのＨＲＰコンジュゲート抗ウサギ抗体を二次抗体として使用した。約５０ｍｌの１倍トリス緩衝液に０．１％Ｔｗｅｅｎ２０を添加したものの中で、室温にて１０分ずつ３回洗浄する。ＰＩＥＲＣＥ（ＩＬ）製のＥＣＬキットでタンパク質を検出する。分離管中で、黒

色および白色のＥＣＬ溶液を１：１の比率で混合する。溶液を膜上に分注し、反応を１分間進行させる。ＥＣＬを排出し、プラスチックでラップし、フィルムにさらす。

【０１１７】

６）マクロファージコレステロール流出：マウスのマクロファージ様ＲＡＷ細胞を、１０％ウシ胎仔血清添加ＤＭＥＭ培地中で培養した。細胞を［^{3}Ｈ］コレステロール（０．５Ｃｉ／ｍｌ）で一晩標識した。細胞を０．２％ウシ血清アルブミン添加ＤＭＥＭで３回洗浄し、指示量のＨＤＬまたはａｐｏＡ－Ｉの存在下または非存在下でＤＭＥＭ培地、０．２％ウシ血清アルブミンを添加することにより、流出を開始させた。流出は２～８時間進行させた。次いで、媒体を回収した。細胞を、溶解緩衝液（ＰＢＳに０．１Ｎ　ＮａＯＨおよび０．１％ＳＤＳを添加したもの）で溶解させた。媒体および細胞溶解液の放射能を、β液体シンチレーションカウンターを用いて定量した。

【０１１８】

７）半減期実験：体積１００～３００μｌの指示量の天然またはＰＥＧ－ＨＤＬを、３～５月齢のＣ５７ＢＬ６／Ｊマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｍａｉｎ）に尾静脈を介して注射した。指示時点で一定分量の血液をマウスから採取し、遠心分離により血漿を単離した。次いで、０．０５～０．２μｌの血漿と等価な一定分量の血漿を、前述のようにＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウェスタン分析にかけた。現像されたフィルム上のタンパク質のバンドの密度をデンシトメトリーにより定量した。血液循環中のヒトアポリポタンパク質のクリアランスにより、天然またはＰＥＧ－ａｐｏＡ－Ｉのｉｎ　ｖｉｖｏにおける半減期を推定した。

【０１１９】

８）抗ヒトａｐｏＡ－Ｉ抗体の原料は、ＢＩＮＤＩＮＧ　ＳＩＴＥ、Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ、英国製、カタログ番号ＰＣ０８５のものである。

【０１２０】

結果

このペグ化ヒトＨＤＬをＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびクーマシーブリリアントブルー染色により分析したので、結果を図３に示す。４℃で約１６時間インキュベーションしたところ、ＨＤＬ粒子中のヒトａｐｏＡ－Ｉの９０％超がペグ化された（図３、ＨＤＬ中のペグ化ａｐｏＡ－ＩをＰＥＧ－ＡｐｏＡ－Ｉとして示し、ＨＤＬ中の修飾されていない天然ａｐｏＡ－ＩをＡｐｏＡ－Ｉとして示す）。ペグ化ＨＤＬ粒子は、これらの条件下では、大半が同質の種であった。

【０１２１】

例３Ａ：ペグ化ヒトＨＤＬは、マクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進する生物学的活性を有する

ＨＤＬの抗アテローム生成特性について提唱されている主要な機序は逆コレステロール輸送であり、この機序において、ＨＤＬは、末梢組織、例えばマクロファージ泡沫細胞から肝臓へコレステロールを輸送し返して廃棄する。このシナリオでは、マクロファージ泡沫細胞からＨＤＬへのコレステロール流出は、逆コレステロール輸送の最初の段階を構成する。ＨＤＬがコレステロール受容体として作用し、マクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進することは、十分に文書で実証されている。したがって、ペグ化ＨＤＬがコレステロール流出を促進する生物活性を調査することが重要である。この実験では、Ｎ末端でペグ化されているヒトＨＤＬ粒子を、マクロファージからのコレステロール流出を促進する能力について調査し、天然ＨＤＬと比較した。マウスのマクロファージ様ＲＡＷ細胞を放射性コレステロールトレーサー（［^{3}Ｈ］コレステロール）で標識する。細胞を培養媒体で洗浄して細胞外のコレステロールトレーサーを除去した後、図４に示すように、修飾されていない天然ヒトＨＤＬまたはペグ化ＨＤＬを添加することにより、コレステロール流出を開始させた。この流出アッセイにおける遊離ＰＥＧ分子の潜在的な効果を排除するために、流出アッセイの間、同量のクエンチング済みＰＥＧ調製物を、修飾されていないＨＤＬ調製物のグループに添加した。結果を図４に示す。ヒトＨＤＬ粒子の標的ペグ化は、ＨＤＬがコレステロール流出を促進する活性に見かけ上は影響を及ぼさな

かった。マクロファージから天然ＨＤＬまたはＰＥＧ－ＨＤＬへのコレステロール流出は、類似の用量応答を示した（図４）。図４の流出アッセイにおいて使用したＰＥＧ－ＨＤＬ調製物は、図３に示す調製物由来のものであった。

【０１２２】

例３Ｂ：ペグ化ヒトＨＤＬ粒子は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける半減期が長期化している

血液循環中のＰＥＧ－ＨＤＬ粒子の薬物動態およびクリアランスを評価するために、非ペグ化ＨＤＬの代謝回転を、マウスを対象にしたｉｎ　ｖｉｖｏにおけるＰＥＧ－ＨＤＬ粒子の値と比較する。図５は、尾静脈を介してマウスの循環中に注射された０．８ｍｇの非ペグ化ＨＤＬの代謝回転を示すものである。一定分量の血漿のウェスタン分析により推定されるＨＤＬタンパク質（主にａｐｏＡ－Ｉ）の半減期は、およそ７時間である。注射後９６時間時点で、すべてのヒトａｐｏＡ－Ｉは排出されたように見えた（残存シグナルは、内在性のマウスａｐｏＡ－Ｉであるように思われるが、その理由は、バンドの密度が、前採血コントロールのバンドの密度と類似しているからである）。次いで、Ｎ末端でペグ化されているヒトＨＤＬ（この場合、２０ｋＤａのＭ－ＰＥＧ－ＡＬＤを使用した）をマウスに注射した。図６は、マウス血漿中における約１ｍｇのＰＥＧ－ＨＤＬ粒子の代謝回転を示すものである。ＨＤＬ中のＰＥＧ－ａｐｏＡ－Ｉのクリアランスにより推定されるＰＥＧ－ＨＤＬの代謝回転時間は、非ペグ化ヒトＨＤＬの代謝回転時間と比較して明らかに長期化した（図６対図５）。推定半減期は約２４時間であり、すなわち、ペグ化ＨＤＬ粒子は、非ペグ化ＨＤＬ粒子と比較して半減期が３倍長期化していることを示した。７２時間後でも、血漿中には相当な量のＰＥＧ－ＨＤＬが依然として残っていた。

【０１２３】

例４：ペグ化ヒトＨＤＬ粒子および炎症性血管疾患

炎症性血管疾患を有する被検体に、前述のペグ化ＨＤＬ粒子を有する一定量の組成物を静脈内投与する。投与は、１～２カ月の期間にわたり１５ｍｇ／ｋｇ～４５ｍｇ／ｋｇ［ｍｇ（ａｐｏＡ－Ｉ）／ｋｇ（体重）］の用量であってもよい。治療の進行は、標準的な超音波法により測定できる。ペグ化ＨＤＬ粒子は、ショ糖－マンニトール担体およびリン酸緩衝液を含む滅菌済の液体医薬製剤の形態で投与できる。ショ糖－マンニトール担体は、約６．２％のショ糖および約０．９％のマンニトールを含むことができる。滅菌済の液体医薬製剤のｐＨは、約７．５であってもよい。液体医薬製剤のモル浸透圧濃度は、約２９０ｍＯｓｍであってもよい。ペグ化ＨＤＬ粒子は、５０ｍＬ当たりのサイズが１０μｍ超の微粒子を６，０００個未満、または、５０ｍＬ当たりのサイズが２５μｍ超の微粒子を６００個未満含むＨＤＬ粒子液体医薬製剤として投与できる。

【０１２４】

炎症性血管疾患がアテロームである場合は、アテローム体積の減少が観察される。炎症性血管疾患がアテローム性動脈硬化症である場合は、プラークサイズの低下が観察される。

【０１２５】

脂質異常症を有する被検体に、前述の高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）粒子を含む組成物を１カ月～２カ月の期間にわたり静脈内投与する。ペグ化ＨＤＬ組成物を投与すると、被検体における脂質異常症が改善されることがわかる。

【０１２６】

本明細書において前述のペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉを含むＨＤＬ粒子を含む組成物を１～２カ月の期間にわたり静脈内投与すると、ＨＤＬ－コレステロールレベルが男性で４５ｍｇ／ｄｌ未満、または女性で５０ｍｇ／ｄｌ未満の被検体の血漿ＨＤＬレベルが増大する。本明細書において前述したペグ化アポリポタンパク質Ａ－Ｉを含むＨＤＬ粒子を含む組成物を１～２カ月の期間にわたり静脈内投与した場合も、ＨＤＬ－コレステロールレベルが男性で４０ｍｇ／ｄｌ未満の被検体の血漿ＨＤＬレベルが増大する。ペグ化ＨＤＬ粒子組成物は、５０ｍＬ当たりのサイズが１０μｍ超の微粒子を６，０００個未満、または、５０ｍＬ当たりのサイズが２５μｍ超の微粒子を６００個未満含むＨＤＬ粒子液体医薬製剤として投与される。

【０１２７】
考察
アテローム性動脈硬化症を治療するための薬理学的介入は、治療標的としてのＬＤＬ－コレステロールレベルを低下させることに伝統的に焦点を合わせていたが、いくつかの介入治験から、ＨＤＬの血漿中濃度と心臓血管疾患の発生率との間に逆相関があることも示されている。ＨＤＬ－コレステロールは心臓保護機能を支えるという疫学的な証拠から、ＨＤＬは、アテローム生成に関与している細胞過程に影響することが示唆される。したがって、高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）療法は、研究者らからますます注目を集めており、アテローム性動脈硬化症の既存の療法と補い合う新しいアプローチになるという大きな可能性を示している。しかし、ＨＤＬ、組換えａｐｏ－ＡＩまたはａｐｏ－ＡＩ－リン脂質複合体の直接注入に関わる１つの課題は、ヒトにおいて有害作用を引き起こすことなく、その十分な治療濃度の血漿ＨＤＬを達成し適切な期間にわたりこれを維持することである。加えて、胆汁酸塩を用いずに適当なＨＤＬ粒子組成物を作ったという報告はない。
【０１２８】
本明細書においては、ヒトＨＤＬを活性化メトキシポリ（エチレングリコール）（ＭＰＥＧ）でペグ化して、ヒトＨＤＬの血漿中半減期を長期化する方法が開示される。重要なことに、作製したペグ化形態のヒトＨＤＬは、その生物活性、例えば、マクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出の促進を依然として保っている。加えて、非ペグ化ＨＤＬ粒子またはペグ化ＨＤＬ粒子のいずれかをマウスの尾静脈中に注射することにより、ペグ化ＨＤＬの代謝回転を調べた。結果から、推定半減期は、非ペグ化ＨＤＬ粒子と比較しておよそ３倍長期化していることが明らかになった。
【０１２９】
この技術の別の利点は、ペグ化ＨＤＬ生成物の精製が簡単且つ効率的であることである。ペグ化ＨＤＬ生成物は、ゲル濾過クロマトグラフィーにより素早く精製できる。
【０１３０】
ＰＣＴ公開ＷＯ２０１０／１４１０９７号には、モノペグ化精製ａｐｏＡ－Ｉは半減期、コレステロール促進活性が長期化しており、再構成ＨＤＬ粒子中に組み込むことができることが開示された。しかし、マルチペグ化精製ａｐｏＡ－Ｉは、所望の品質とは逆の品質を有することが判明した。マルチペグ化形態は、調査の際には、マクロファージからのコレステロール流出を減少させた。したがって、心臓血管性および／または炎症性疾患のための療法には、モノペグ化形態のヒトａｐｏＡ－Ｉの方が効率的な形態のヒトａｐｏＡ－Ｉであり、その理由は、モノペグ化ａｐｏＡ－Ｉの方が有意に高い半減期を有し、その生物活性を維持するからである。しかし、モノペグ化ａｐｏＡ－Ｉを作り出す際の効率性が障壁となっており、ＰＣＴ公開第２０１０／１４１０９７号の方法で製造されるモノペグ化ａｐｏＡ－Ｉは、多くても４０～５０％である。
【０１３１】
したがって、ＨＤＬ粒子の１つ以上のタンパク質をモノペグ化することによりＨＤＬ粒子自体をペグ化することは、驚くほど有望な結果をもたらすアプローチである。本明細書に記載の方法を用いて実施した実験から、ＨＤＬ粒子と密接に関係付けたタンパク質（主にａｐｏＡ－Ｉである）のおよそ９０％は、モノペグ化されることが見出された。加えて、ＨＤＬ粒子と密接に関係付けたａｐｏＡ－Ｉの顕著なマルチペグ化は認められなかった。仮説を立てれば、ａｐｏＡ－ＩがＨＤＬ粒子内に埋め込まれたことから、ａｐｏＡ－ＩのＮ末端はモノペグ化に利用可能であったということになる。したがって、このペグ化の方法はより的確であっただけでなく、本発明における方法はより効率的でもあった。
【０１３２】
加えて、このＨＤＬ粒子の製造方法は、胆汁酸塩の使用を必要としない。このことは重要な特徴であるが、その理由は、胆汁酸塩はヒトにおいて有害な健康上の影響を引き起こす可能性があるからである。
【０１３３】
全体的に見れば、何ら特定の理論に拘束されることを望むものではないが、これらの試

験から、ヒトＨＤＬまたは再構成ＨＤＬを基材として用いたＮ末端ペグ化は、ヒトＨＤＬタンパク質、とりわけＨＤＬ　ａｐｏＡ－Ｉの標的ペグ化の効率性を高めることが示唆される。ペグ化ヒトＨＤＬは、マクロファージからのコレステロール流出を天然ＨＤＬと同程度に強力に促進し、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける半減期が長期化している。したがって、ヒトＨＤＬ、またはｒＨＤＬ中のａｐｏＡ－Ｉ／リン脂質複合体を基材とした標的ペグ化は、心臓血管性または炎症性疾患のためのヒトａｐｏＡ－ＩまたはＨＤＬ媒介療法の有効性を高めるための優れた方法である。

【０１３４】

例５：ｒＨＤＬ対ＰＥＤ－ｒＨＤＬがｉｎ　ｖｉｖｏにおけるアテローム生成に及ぼす効果の検査

高脂肪高コレステロールの食餌を９週間与えたＡｐｏＥ$^{-/-}$マウスに、３週間にわたり、食塩水と、ＨＤＬタンパク質が４０ｍｇ／ｍｌの用量のｒＨＤＬまたはＰＥＧ－ｒＨＤＬとの２種類の注射を行ったが、この用量は、過去の試験において、ｒＨＤＬがａｐｏＥ$^{-/-}$マウスの末梢の単球および好中球の数に対して周辺効果を示した用量である。次いで、末梢の白血球（while blood cell）プロファイルおよびアテローム生成量を決定した。食塩水で処置したマウスと比較すると、ｒＨＤＬ注入は、末梢の総白血球、単球および好中球の数に顕著な効果は示さず（図７および８）、ｅｎ　ｆａｃｅ法により測定した大動脈のアテローム性動脈硬化病変面積にも一切効果はなかった（図９）。際立つことに、同じ用量のＰＥＧ－ｒＨＤＬは、総白血球、単球および好中球の数を顕著に減少させ（図７および８）、アテローム性動脈硬化病変面積についても同様であった（図９）。これらの結果から、ＰＥＧ－ｒＨＤＬはｒＨＤＬより強力にアテローム性動脈硬化症を軽減させることが示され、このことは、ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるＰＥＧ－ｒＨＤＬの半減期が長くなっていることと一致する。

【０１３５】

この試験から、以下のことが示された：１）ＰＥＧ－ＨＤＬは、アテローム性動脈硬化症の軽減においてＨＤＬより効果的である；２）ＰＥＧ－ＨＤＬは、ＨＤＬより、低用量で使用でき、副作用が少なく、治療上有効性が高い；３）このことは、ｒＨＤＬ調製における主要な要素である製造コストがより低いと言い換えることができる。

【０１３６】

例６：マクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出

１ｍｇのヒトＰＥＧ－ＨＤＬをマウスに注射し、１ｍｇのコントロールＨＤＬと比較する実験を実施した。次いで、マクロファージのコレステロール流出アッセイを、血漿試料を用いて５時間および２４時間の時点で行った。本明細書に記載の方法によって作ったＰＥＧ－ＨＤＬは、血清コレステロール流出能を向上させる優れた能力を有することが見出された（結果を図１０に示す）。コントロールの血清および天然ＨＤＬ試料は、結果として、類似のレベルのコレステロールを流出させた。この観察内容は、コントロールの血清は、残存コレステロール（および、おそらくＨＤＬ）を含有していたという事実により、一部説明できる。

【０１３７】

例７：ペグ化ＨＤＬ粒子は、炎症性血管疾患を治療する

本発明の複合体および組成物は、いくつかの疾患の予防的または治療的な治療に使用でき、そのような疾患としては、限定するものではないが、心臓血管疾患（例：急性冠動脈症候群（ＡＣＳ、アテローム性動脈硬化症および心筋梗塞）、または、ＡＣＳの素因となる疾患、障害もしくは病態、例えば、糖尿病、脳卒中もしくは心筋梗塞、高コレステロール血症（例：血清コレステロールの上昇もしくはＬＤＬコレステロールの上昇）、および高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）レベルの低下（例えば、タンジール病の症状である）が原因で生じる低コレステロール血症が挙げられる。

【０１３８】

本発明の複合体および組成物を使用して、脂質異常症、ならびに／または脂質異常症に伴う実質的にすべての疾患、病態および／もしくは障害を治療または防止することができ

る。脂質異常症に伴う疾患としては、限定するものではないが、冠動脈心臓疾患、冠動脈疾患、急性冠動脈症候群、心臓血管疾患、高血圧、再狭窄、血管または血管周囲の疾患；脂質異常障害；異リポタンパク血症；低密度リポタンパク質コレステロール高値；超低密度リポタンパク質コレステロール高値；高密度リポタンパク質低値；リポタンパク質Ｌｐ（ａ）コレステロール高値；アポリポタンパク質Ｂ高値；アテローム性動脈硬化症（アテローム性動脈硬化症の治療および予防を含む）；高脂血症；高コレステロール血症；家族性高コレステロール血症（ＦＨ）；家族性複合型高脂血症（ＦＣＨ）；リポタンパク質リパーゼ欠損症、例えば、高トリグリセリド血症、低αリポタンパク血症、および高コレステロール血症リポタンパクが挙げられる。

【０１３９】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物は、炎症性血管疾患に罹患した被検体に投与される。該組成物の投与は、該被検体を治療するのに効果的である。

【０１４０】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物は、アテロームに罹患した被検体に投与される。該組成物の投与は、該被検体を治療するのに効果的である。

【０１４１】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物は、アテローム性動脈硬化症に罹患した被検体に投与される。該組成物の投与は、該被検体を治療するのに効果的である。

【０１４２】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物は、アテローム血栓性心臓血管疾患に罹患した被検体に投与される。該組成物の投与は、該被検体を治療するのに効果的である。

【０１４３】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物は、脂質異常症に罹患した被検体に投与される。該組成物の投与は、該被検体を治療するのに効果的である。

【０１４４】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物は、被検体に投与される。該組成物の投与は、該被検体における血漿高密度リポタンパク質レベルを増大させるのに効果的である。

【０１４５】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物は、被検体に投与される。該組成物の投与は、該被検体におけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を促進するのに効果的である。

【０１４６】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物は、被検体に投与される。該組成物の投与は、被検体における白血球の量を減少させるのに効果的である。

【０１４７】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子を含む組成物は、被検体に投与される。該組成物の投与は、該被検体におけるアテローム性動脈硬化（atheroscleotic）病変を減少させるのに効果的である。

【０１４８】

例８：ＨＤＬに結合した分子の送達ビヒクルとしてのペグ化ＨＤＬ粒子

ペグ化ＨＤＬ粒子は、ＨＤＬに結合した材料を体内に送達するためのナノ粒子として使用できる。例えば、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＬＣＡＴ）をＰＥＧ－ＨＤＬで送達し、半減期の延長による利益を得ることができる。このことは、腎疾患を予防するためのヒトＬＣＡＴ欠乏に対する処置、またはアテローム性動脈硬化症に対する処置であってもよい。加えて、野生型ＡｐｏＬ－１（ＡｐｏＬ１－ＷＴ）を、ＰＥＧ－ＨＤＬに結合させることにより、異なる種類の腎疾患を招くＡｐｏＬ１の変異体を生じるリスクのある被検体に送達できる。

【０１４９】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子は、ＬＣＡＴ酵素に結合される。ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した酵素は、レシチンコレステロールＬＣＡＴ欠乏症に罹患した被検体に投与され、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した該酵素の投与は、該被検体におけるＬＣＡＴレベルを増大させるのに、または該被検体を治療するのに、効果的である。加えて、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した酵素は、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合していない酵素、または非ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した酵素と比較して、体内での半減期が長くなっている。

【０１５０】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子は、ＬＣＡＴ酵素に結合される。ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した酵素は、あるタイプの腎疾患に罹患しているかまたはあるタイプの腎疾患のリスクがある被検体に投与される。ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した該酵素の投与は、該被検体を治療するかまたは該被検体における腎疾患のリスクを低減するかまたは該被検体における腎疾患を予防するのに効果的である。加えて、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した酵素は、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合していない酵素、または非ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した酵素と比較して、体内での半減期が長くなっている。

【０１５１】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子は、ＬＣＡＴ酵素に結合される。ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した酵素は、アテローム性動脈硬化症に罹患した被検体に投与され、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した該酵素の投与は、該被検体を治療するのに効果的である。加えて、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した酵素は、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合していない酵素、または非ペグ化ＨＤＬ粒子に結合した酵素と比較して、体内での半減期が長くなっている。

【０１５２】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子は、野生型ＡｐｏＬ－１（ＡｐｏＬ１－ＷＴ）に結合される。ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＡｐｏＬ１－ＷＴは、ａｐｏＬ－１の対立遺伝子変異体を生じるリスクを伴うあるタイプの腎疾患に罹患した被検体に投与され、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＡｐｏＬ１－ＷＴの投与は、該被検体を治療するかまたは該被検体における腎疾患のリスクを低減もしくは除去するのに効果的である。加えて、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＡｐｏＬ１－ＷＴは、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合していないＡｐｏＬ１－ＷＴ、または非ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＡｐｏＬ１－ＷＴと比較して、体内での半減期が長くなっている。

【０１５３】

本明細書に記載のペグ化ＨＤＬ粒子は、ＡｐｏＬ１－ＷＴに結合される。ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＡｐｏＬ１－ＷＴは、あるタイプの腎疾患のリスクを伴うＡｐｏＬ１の対立遺伝子変異体を有する被検体に投与され、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＡｐｏＬ１－ＷＴの投与は、該被検体における腎疾患のリスクを低減または除去するのに効果的である。加えて、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＡｐｏＬ１－ＷＴは、ペグ化ＨＤＬ粒子に結合していないＡｐｏＬ１－ＷＴ、または非ペグ化ＨＤＬ粒子に結合したＡｐｏＬ１－ＷＴと比較して、体内での半減期が長くなっている。

【参考文献】

【０１５４】

1. Anantharamaiah GM, Brouillette CG, Engler JA et al. "Role of amphipathic helixes in HDL structure/function." Adv Exp Med Biol 1991; 285:131-140.

2. Assmann G. 1982 "Lipid Metabolism and Atherosclerosis." New York: Schattauer.

3. Barter PJ, Brewer HB Jr, Chapman MJ et al. "Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23:160-167.

4. Brouillette CG, Anantharamaiah GM, Engler JA et al. "Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review." Biochim Biophys Acta 2001; 1531:4-46.

5. Brouillette CG, Anantharamaiah GM. "Structural models of human apolipoprotein A-I." Biochim Biophys Acta 1995; 1256:103-129.

6. Chiesa G. and Sirtori C R, (2002) "Use of recombinant apolipoproteins in vascular diseases: the case of apoA-I" Curr Opin Investig Drugs March 2002; 3(3):420.

7. Cho (2009) "A reconstituted high density lipoprotein containing the V156E mutant of apolipoproteins A-I exhibits anti-atherosclerotic activity in Apo-E deficient mice" J Atheroscler Thromb. 16(3):217-29.

8. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:473-480.

9. Frank PG, Marcel YL. "Apolipoprotein A-I: structure-function relationships." J Lipid Res 2000; 41:853-872.

10. Getz GS, Reardon CA. "Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues." Curr Opin Lipidol 2004; 15:261-267.

11. Gillotte et al. (1996) "Apolipoprotein A-I Structural Modification and the Functionality of Reconstituted High Density Lipoprotein Particles in Cellular Cholesterol Efflux" The Journal Of Biological Chemistry 271*39):23792-23798.

12. Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M et al. "The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism." Atherosclerosis 2001; 155:269-281.

13. Jin W, Marchadier D, Rader DJ. "Lipases and HDL metabolism." Trends Endocrinol Metab 2002; 13:174-178.

14. Jonas A. "Lecithin cholesterol acyltransferase." Biochim Biophys Acta 2000; 1529:245-256.

15. Klon AE, Segrest JP, Harvey SC. "Comparative models for human apolipoprotein A-I bound to lipid in discoidal high-density lipoprotein particles." Biochemistry 2002; 41:10895-10905.

16. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. "The paraoxonase gene family and coronary heart disease." Curr Opin Lipidol 2002; 13:357-362.

17. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. "Paraoxonase and coronary heart disease." Atheroscler Suppl 2002; 3:49-55.

18. Matsunaga et al. (1999) "A novel apolipoproteins E mutation, E2 (arg25Cys), in lipoprotein glomerulopathy" Kidney International 56:421-427.

19. Maytin M, Leopold J, Loscalzo J. "Oxidant stress in the vasculature." Curr Atheroscler Rep 1999; 1:156-164.

20. Mertens A, Holvoet P. "Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis." FASEB J 2001; 15:2073-2084.

21. Moren et al. (2008) "HDL subfraction distribution of paraoxonase-1 and its relevance to enzyme activity and resistance to oxidative stress" Journal of Lipid Research, 49:1246-1253.

22. Morton RE. "Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein." Curr Opin Lipidol 1999; 10:321-327.

23. Navab M, Hama SY, Hough GP et al. "High density associated enzymes: their role in vascular biology." Curr Opin Lipidol 1998; 9:449-456.

24. Niessen HW, Krijnen PA, Visser CA et al. "Type II secretory phospholipase A_2 in cardiovascular disease: a mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes?" Cardiovasc Res 2003; 60:68-77

25. Nissen et al. (2003) "Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled tiral" JAMA No 5; 290(17): 2292-300.

26. PCT International Application Publication No. WO 2006/100567, published September 28, 2006.

27. PCT International Application Publication No. WO 2010/093918, published August 19, 2010.

28. PCT International Application Publication No. WO 2010/141097, published December 9, 2010.

29. PCT International Application Publication No. WO 2012/000048, published January 5, 2012.

30. Peelman F, Vandekerckhove J, Rosseneu M. "Structure and function of lecithin cholesterol acyl transferase: new insights from structural predictions and animal models." Curr Opin Lipidol 2000; 11:155-160.

31. Phillips et al. (1997) "Predicting the Structure of Apolipoprotein A-I in Reconstituted High-Density Lipoprotein Disks" Biophysical Journal, 73:2337-2346.

32. Ryan (2010) "Nanobiotechnology applications of reconstituted high density lipoprotein" Journal of Nanobiotechnology, 8(28).

33. Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM et al. "Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein." Curr Opin Lipidol 2000; 11:105-115.

34. Sirtoriet al. (1999) "Recombinant apolipoproteins for the treatment of vascular diseases" Atherosclerosis 142:29-40.

35. Skinner ER. (1994) "High-density lipoprotein subclasses." Curr Opin Lipidol 5:241-247.

36. Tall AR, Lalanne F. "Phospholipid transfer protein and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23:1484-1485.

37. Tall AR. "Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies." J Intern Med 1995; 237:5-12.

38. Tselepis AD, Chapman JM. "Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A_2, platelet activating factor-acetylhydrolase." Atheroscler Suppl 2002; 3:57-68.

39. U.S Patent Application Publication No. US 2008/0214434 A1, published September 4, 2008 (Stroes).

40. U.S. patent Application Publication No. US 2011/0190193 A1, published August 4, 2011 (Stroes).

41. U.S. Patent No. 5,652,339, issued July 29, 1997 (Peter Lerch et al.).

42. U.S. Patent No. 6,559,284, issued May 6, 2003 (Hans Ageland et al.).

43. U.S. Patent No. 7,223,726, issued May 29, 2007 (Oda et al.).

44. U.S. Patent No. 7,491,693, issued February 17, 2009 (Alphonse Hubsch et al.).

45. U.S. Patent No. 7,759,315, issued July 20, 2010 (Salvatore Cuzzocrea et al).

46. U.S. Patent No. 7,956,035, issued Jun 7, 2011 (Erik S. G. Stroes).

47. van Tol A. "Phospholipid transfer protein." Curr Opin Lipidol 2002; 13:135-139.

48. Voetsch B, Loscalzo J. "Genetic determinants of arterial thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24:216-229.

49. von Eckardstein et al. (1993) "Interaction of Reconstituted High Density Lipoprotein Discs Containing Human Apolipopritein A-I (ApoA-I) Variants with Murine Adipocytes and Macrophages" The Journal Of Biological Chemistry, 268(4):2616-2622.

50. von Eckardstein et al. (1994) "Physiological and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses." Curr Opin Lipidol 5:404-416.

51. Zhang et al. (2010) "Recombinant high density lipoprotein reconstituted with apolipoproteins AI cysteine mutants as delivery vehicles for 10-hydroxycamptothecin" Cancer Lett. 298(1):26-33.

【図１】

図１

Figure 1

Figure 1A

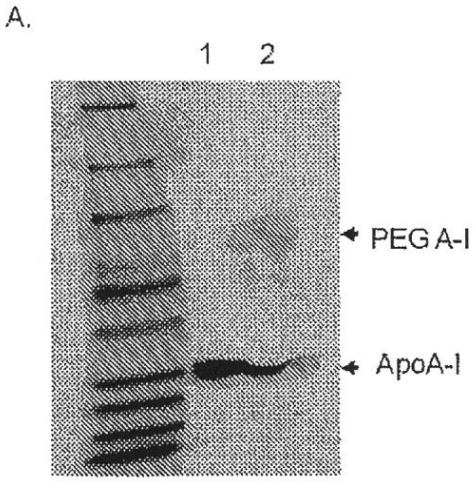
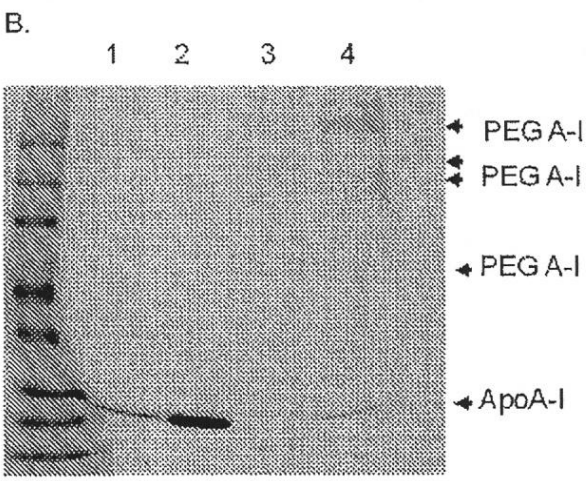


Figure 1B



【図２】

図２

Figure 2

Figure 2A

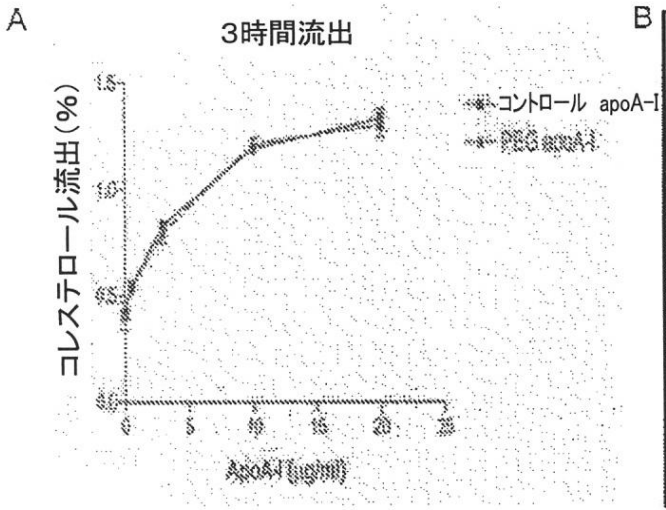
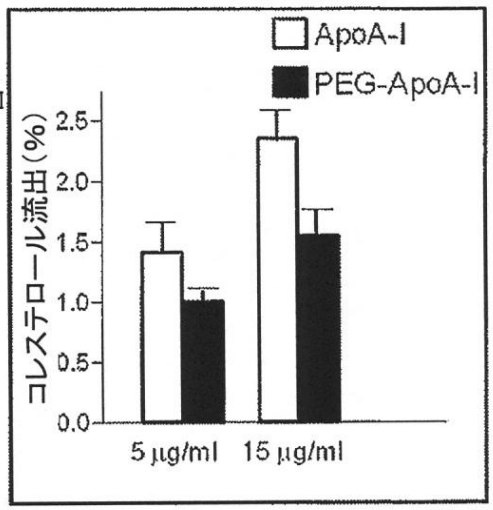


Figure 2B

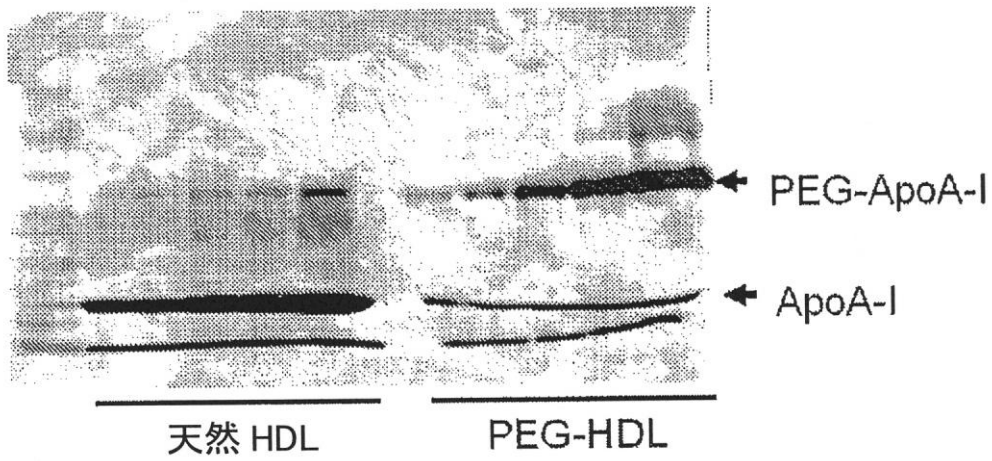


【図３】

図３

Figure 3

Fig. 3

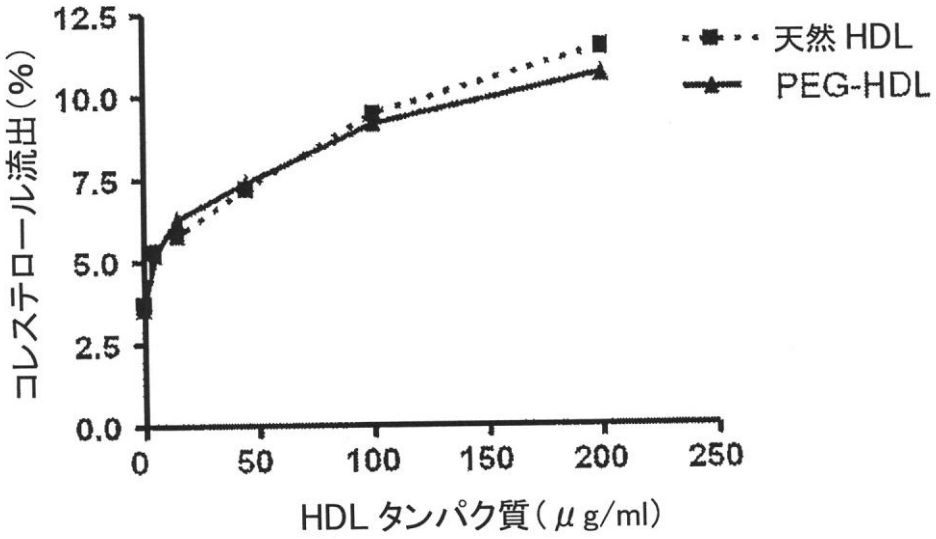


【図４】

図４

Figure 4

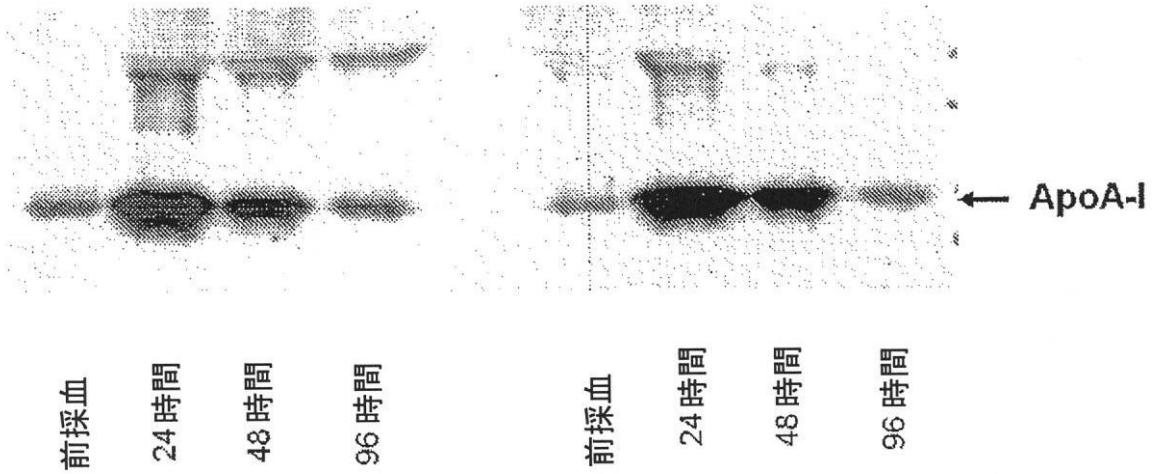
Fig. 4



【図５】

図５

Figure 5

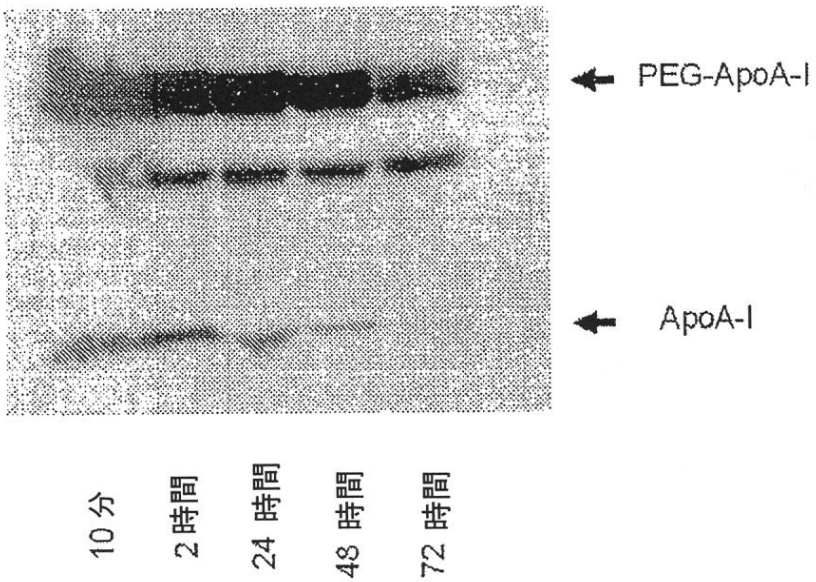


【図６】

図６

Figure 6

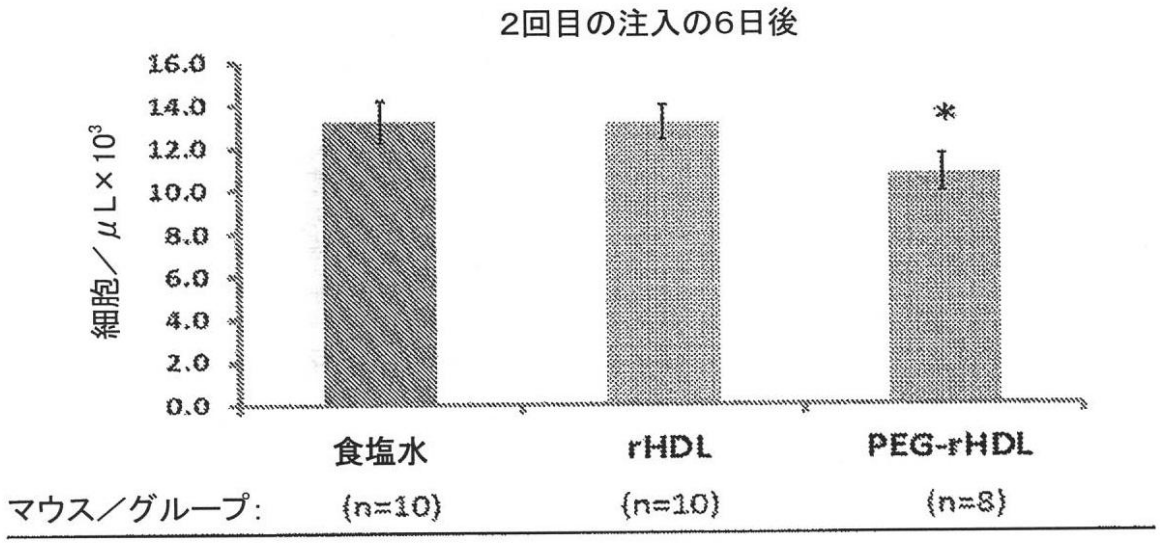
Fig. 6



【図７】

図７

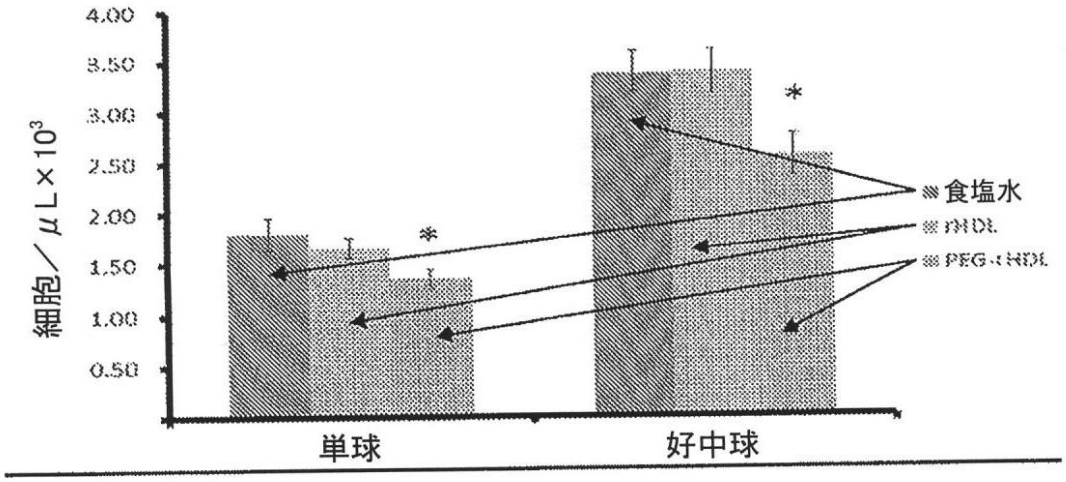
Figure 7



【図８】

図８

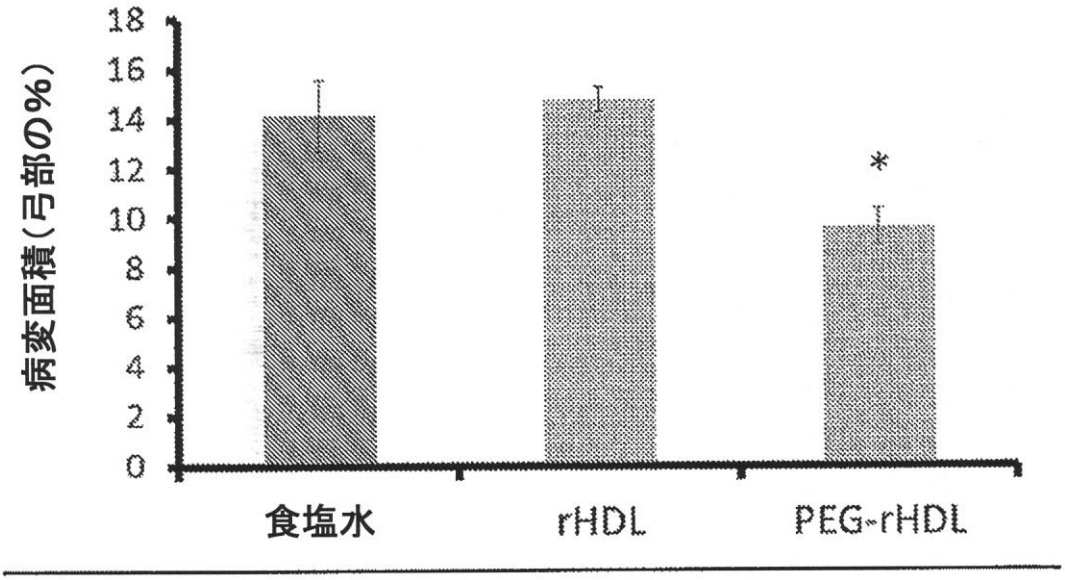
Figure 8



【図９】

図 9

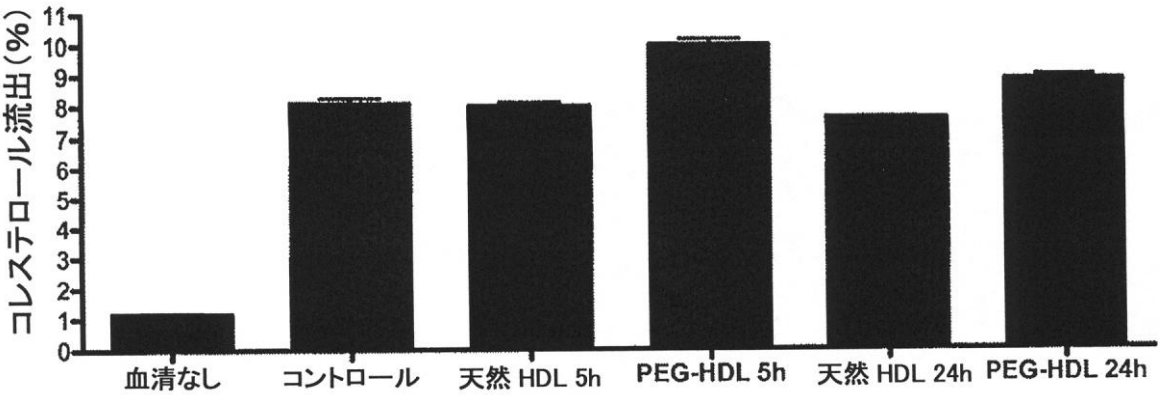
Figure 9



【図１０】

図 10

Figure 10



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/30401

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 38/17; A61P 35/00 (2012.01)
USPC - 514/19.8; 435/375
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC-514/19.8; 435/375

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC-514/19.3, 530/359, 977/788, 977/906

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PUBWEST, Google, Google Scholar, WIPO, High density lipoprotein, apolipoprotein, polyethylene glycol, PEG, PEGylated, native, recombinant, wild type, lecithin cholesterol acyltransferase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2010/141097 A2 (Wang et al.) 09 December 2010 (09.12.2010)entire document esp. p.3, ln 14-17, 24-32; p. 4, ln 1-10; p. 37, ln 13 to p. 38, ln 8	1-3, 16, 58, 64 13-15, 17-19, 59, 60-63, 65-67
Y	US 2006/0217312 A1 (Dasseux). 28 September 2006 (28.09.2006) entire document esp. para[0004], [0072], [0095], [0128], [0130]	13-15, 59-60
Y	US 2008/0108550 A1 (Hubsch et al.) 08 May 2008 (08.05.2008) entire document esp. para[0023]	17-19
Y	US 5,049,488 A (Baer et al.) 17 September 1991 (17.09.1991) entire document esp. col. 2, ln 20-30; col. 12, ln 48-60	61-63, 65-67
Y	US 7,585,511 B2 (Pays et al.) 08 September 2009 (08.09.2009) entire document esp. col. 2, ln 33-40, col. 9, ln 39	60
A	WO 2009/036460 A2 (Knudsen et al) 19 March 2009 (19.03.2009)	1-3, 13-19, 58-67

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 July 2012 (06.07.2012)	06 AUG 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/30401

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-12, 20-57
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*9/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10		
Ａ６１Ｐ	*3/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10	１０１	
			Ａ６１Ｐ	3/06		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘
(74)代理人 100088683
弁理士 中村 誠
(74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久
(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司
(74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克
(72)発明者 トール、アラン・アール.
アメリカ合衆国、ニュージャージー州 ０７６２６、クレッスキル、ウィルソン・ドライブ ２５４
(72)発明者 ナン、ワン
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 １１３５８、フルシャイング、ワンハンドレットシクスティーファースト・ストリート ３３－５９

Ｆターム(参考) 4C076 BB12 CC11 EE23 FF65 GG50
4C084 AA03 AA06 BA44 CA26 DC25 DC32 NA03 NA05 ZA361 ZA362
ZA451 ZA452 ZB111 ZB112 ZC331 ZC332