



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0123345
(43) 공개일자 2017년11월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) A61K 31/185 (2017.01)
A61K 31/727 (2006.01) A61K 31/737 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C08B 37/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/40 (2013.01)
A61K 31/185 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7030055
- (22) 출원일자(국제) 2016년03월18일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년10월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/DK2016/050082
- (87) 국제공개번호 WO 2016/150444
국제공개일자 2016년09월29일
- (30) 우선권주장
PA 2015 70158 2015년03월20일 덴마크(DK)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
오르후스 유니베르시테트
덴마크 디케이-8000 오르후스 씨 노르드레 린가데 1
- (72) 발명자
구스타프센, 카밀라
덴마크, 8000 오르후스 씨, 랑엘란드스가데 19
매드슨, 피터 원더가르드
덴마크, 8240 리스코프, 크로거그레 9
페데르센, 사이먼 글레럽
덴마크, 8240 리스코프, 솔시케베이 8
- (74) 대리인
손민

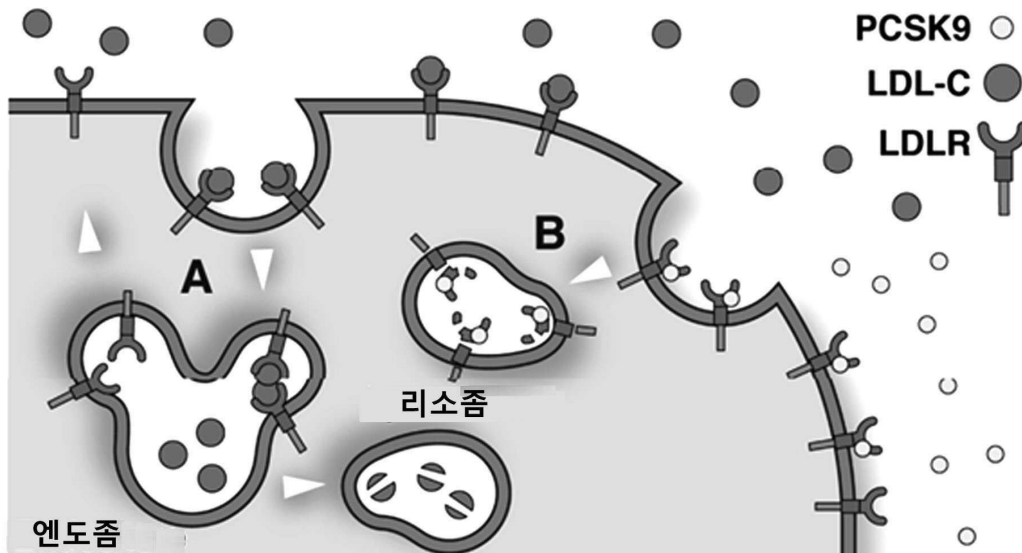
전체 청구항 수 : 총 95 항

(54) 발명의 명칭 지질단백질 대사 장애의 치료를 위한 PCSK9의 억제제

(57) 요약

본원의 개시내용은 지질단백질 대사 장애의 치료를 위한 전구단백질 컨버타제 서브틸리신-유사/꺾신 9형 A (PCSK9)의 억제제에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/727 (2013.01)
A61K 31/737 (2013.01)
C08B 37/0075 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/74 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(30) 우선권주장

PA 2015 70623 2015년10월02일 덴마크(DK)
PA 2015 70839 2015년12월21일 덴마크(DK)

명세서

청구범위

청구항 1

헤파란 설페이트 프로테오글리칸 수용체 (HSPG)의 PCSK9로의 결합을 억제할 수 있는 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 167 중 적어도 하나, 예를 들어, PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 92 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 93 내지 97 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 98 내지 103 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 104 내지 105 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 106 내지 135 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 136 내지 139 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 140 내지 164 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 165 내지 167 중 적어도 하나를 포함하는 PCSK9 (서열번호 1)의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 결합하는 것인, 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화합물은 PCSK9 (서열번호 1)의 R93, R96, R97, R104, R105, K136, H139, R165 및 R167로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산에 결합하는 것인, 화합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 PCSK9 (서열번호 1)의 R93, R96, R97, R104, R105 및 H139 중 적어도 1개, 예를 들어, 적어도 2개, 예를 들어, 적어도 3개, 예를 들어, 적어도 4개, 예를 들어, 적어도 5개, 예를 들어 6개 모두에 결합하는 것인, 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 항체 또는 이의 기능성 증가물인, 화합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 모노클로날 항체인, 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 기능성 증가물은 쥐 모노클로날 항체인, 화합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 기능성 증가물은 인간화된 것인, 화합물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 기능성 증가물은 PCSK9 (서열번호 1)의 HSPG 결합 부위에 결합할 수 있는 상기 항체의 항원-결합 단편을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 화합물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 단일쇄 항체인, 화합물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 기능성 등가물은 PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 93, 96, 97, 104, 105, 136, 139, 165 또는 167번 중 적어도 하나를 포함하는 PCSK9 (서열번호 1)의 HSPG 결합 부위 내 에피토프, 예를 들어, PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 93, 96, 97, 104, 105 및 139번 중 적어도 1개, 예를 들어, 적어도 2개, 예를 들어, 적어도 3개, 예를 들어, 적어도 4개, 예를 들어, 적어도 5개, 예를 들어, 6개 모두를 포함하는 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합하는 것인, 화합물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은,

(i) 서열번호 10, 서열번호 11 또는 서열번호 12에 의해 정의된 바와 같은 3개의 CDR 중 적어도 하나를 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전, 및

(ii) 서열번호 13, 서열번호 14 또는 서열번호 15에 의해 정의된 바와 같은 3개의 CDR 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을

을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 7에 의해 정의된 바와 같은 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전 및/또는 서열번호 5에 의해 정의된 바와 같은 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은,

(i) 서열번호 16, 서열번호 17 또는 서열번호 18에 의해 정의된 바와 같은 3개의 CDR 중 적어도 하나를 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전, 및

(ii) 서열번호 19, 서열번호 20 또는 서열번호 21에 의해 정의된 바와 같은 3개의 CDR 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을

을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 9에 의해 정의된 바와 같은 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전 및/또는 서열번호 3에 의해 정의된 바와 같은 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함하는 것인, 화합물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 도메인 서플링에 의해 작제되는 것인, 화합물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 항체 변이체인, 화합물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 변이체는 반감기, 안정성, 용해도 및/또는 생체이용률을 증가시키기 위해 변형된 것인, 화합물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 변이체는 가공된 도메인내 디설파이드 결합을 포함하는

것인, 화합물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 Fv 단편은 V_H 와 V_L 도메인 사이에 펩타이드 링커를 포함하는 것인, 화합물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 PCSK9로의 결합은 상기 항체의 부재하의 결합과 비교하여 PCSK9의 LDLR로의 감소된 결합을 유도하는 것인, 화합물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 추가로 PCSK9 (서열번호 1)의 LDLR 결합 부위 내 영역을 인지하고 결합할 수 있고, 여기서 상기 영역은 PCSK9의 잔기 194 또는 367-381 중 적어도 하나를 포함하는 것인, 화합물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 PCSK9로의 결합은 상기 항체의 부재하의 수준과 비교하여 간세포와 같은 LDLR-발현 세포의 LDLR 수준을 증가시키는 것인, 화합물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 PCSK9로의 결합은 상기 항체의 부재하의 분해와 비교하여 LDLR의 리소좀 분해를 감소시키는 것인, 화합물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 PCSK9로의 결합은 상기 항체의 부재하의 수준과 비교하여 LDL-C의 혈장 수준을 감소시키는 것인, 화합물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, LDL-C의 상기 혈장 수준은 시험관내 결정되는 것인, 화합물.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, LDL-C의 상기 혈장 수준은 웨스턴 블롯, 면역-염색, ELISA, 초원심 분리, FPLC 또는 전기영동에 의해 결정되는 것인, 화합물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 혈청에서 안정한 것인, 화합물.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 투여 후 비독성인, 화합물.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hepatin 유사체는 HSPG의 경쟁적 길항제, 경쟁하지 않는 길항제, 비-경쟁적 길항제, 사이린트 길항제, 부분적 효능제 또는 역 효능제인, 화합물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hepatin 유사체는 hepatin인, 화합물.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hepatin 유사체는 펩타이드인, 화합물.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 헤파린 유사체는 헤파린의 PCSK9로의 결합을 억제할 수 있는 것인, 화합물.

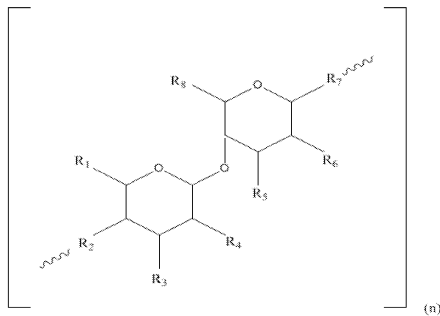
청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 헤파린 모사체 또는 헤파린 유사체인, 화합물.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 화학식 I의 일반 구조를 갖는 것인, 화합물:

화학식 I



상기 식에서,

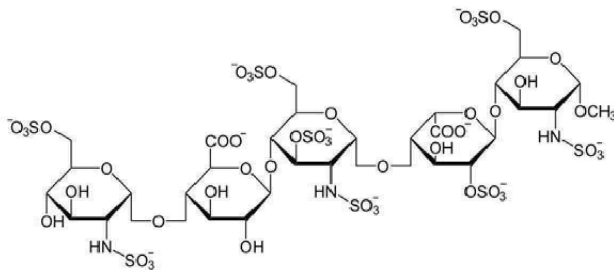
- R₁은 COOH 및 -O₃SO로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- R₂, R₃, R₅ 및 R₇은 O 및 OH로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- R₄는 설페이트 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- R₆은 설페이트 그룹, OH 및 O로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- R₈은 설페이트 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- n은 1 이상의 정수이고,

R₂ 및/또는 R₇은 임의로 단량체 유닛을 연결하는 링커로서 작용할 수 있다.

청구항 37

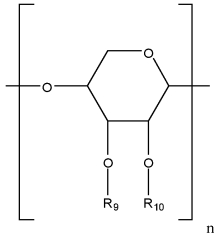
제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은,

a) 하기 화학식을 갖는 폰다파리녹스 (Fondaparinux):



b) 달테파린 나트륨 또는 틴자파린 나트륨과 같은 저분자량의 헤파린; 및

c) 화학식 II의 화합물:

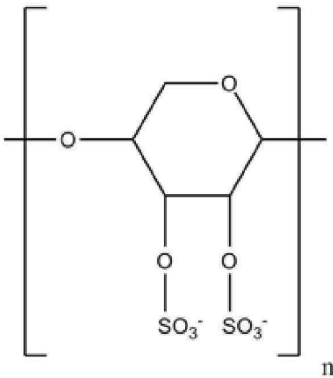


(여기서, R₉ 및 R₁₀은 독립적으로 H, COOH, -O₃SO, O, OH, 설페이트 및 설페이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, n은 1 이상의 정수이다)

인, 화합물.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 화학식 II의 화합물은 펜토산이고 하기 화학식을 갖는 것인, 화합물:

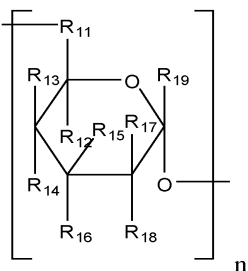


상기 식에서, n은 1 이상의 정수이다.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 화학식 III의 일반 구조를 갖는 것인, 화합물:

화학식 III

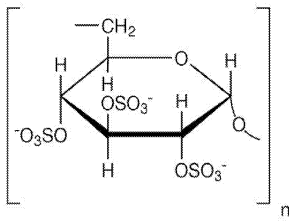


상기식에서,

R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₁₄, R₁₅, R₁₆, R₁₇, R₁₈, 및 R₁₉는 독립적으로 COOH, -O₃SO, O, OH, 설페이트 및 설페이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, n은 1 이상의 정수이고, R₁₄는 임의로 단량체 유닛을 연결하는 링커로서 작용할 수 있다.

청구항 40

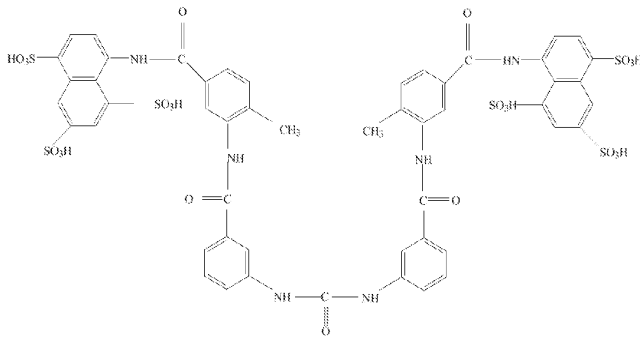
제39항에 있어서, 상기 화합물은 텍스트란 설페이트이고 하기 화학식을 갖는 것인, 화합물:



상기 식에서, n은 1 이상의 정수이다.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 수라민 및 하기 화학식을 갖는 것인, 화합물:



청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 S-dNn (여기서, n은 상기 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에서 포스포로티오에이트 연결체 수이다)인, 화합물.

청구항 43

제42항에 있어서, n은 12 내지 60인, 화합물.

청구항 44

제43항에 있어서, n은 15 내지 55, 예를 들어, 20 내지 50, 예를 들어, 25 내지 45, 예를 들어, 30 내지 40, 예를 들어, 36인, 화합물.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 PCSK9 (서열번호 1)의 LDLR-결합 도메인에 결합할 수 없는 것인, 화합물.

청구항 46

지질단백질 대사 장애 치료를 위한 약제의 제조를 위한 제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 정의된 화합물의 용도.

청구항 47

약제로서 사용하기 위한 제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 48

지질단백질 대사 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 지질단백질 대사 장애의 치료 방법에 사용하기 위한 제

1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 지질단백질 대사의 장애는 LDL-C의 상승된 수준과 같은 LDL-C의 비정상적 수준과 관련된 것인, 화합물.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 지질단백질 대사 장애는 간세포와 같은 LDLR-발현 세포의 비정상적 PCSK9 혈장 수준 및/또는 비정상적 LDLR 수준과 관련된 것인, 화합물.

청구항 51

제48항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질단백질 대사 장애는 지질이상혈증, 고콜레스테롤혈증 및 관상 심장 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 화합물.

청구항 52

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료는 예방인, 화합물.

청구항 53

제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 포유동물인, 화합물.

청구항 54

제48항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물은 인간인, 화합물.

청구항 55

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화합물을 지질단백질 대사 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 지질단백질 대사 장애의 치료 방법.

청구항 56

제49항에 있어서, 상기 화합물은 체중 kg당 0.1 mg 내지 1000 mg의 1일 용량으로 투여되는 것인, 방법.

청구항 57

지질이상혈증, 고콜레스테롤혈증 및 심장 관상 질환과 같은 지질단백질 대사 장애의 치료를 필요로 하는 개체에 서 이를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은,

- i. 상기 개체로부터 단리된 조직 샘플 또는 혈장 샘플을 제공하는 단계,
- ii. 상기 조직에서 LDLR의 수준 및/또는 상기 혈장 샘플에서 PCSK9의 수준 및/또는 LDL-C의 수준을 결정하는 단계,
- iii. 단계 ii)의 발현 수준을 대조군 조직 샘플 또는 대조군 혈장 샘플 수준과 서로 관련시키는 단계,
- iv. 치료 요법을 평가하는 단계,
- v. 제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 치료학적 유효량의 화합물을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 58

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화합물 또는 제59항 내지 제69항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 투여함을 포함하는, LDLR의 분해를 억제하는 방법.

청구항 59

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 조성물은 스타틴 또는 PCSK9의 LDLR 결합 부위에 결합하는 항체와 같은 항-PCSK9 항체 중 적어도 하나를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, 상기 조성물은 추가로 로델시주맘, 팔관시주맘, 알리로쿠맘, 에블로쿠맘 및 보코시주맘으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물과 같은 적어도 하나의 추가의 화합물을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 62

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은,

- PCSK9의 LDLR로의 결합을 억제하는 항체;
- 스타틴;
- 콜레스티라민;
- 에제티미브

중 적어도 하나를 추가로 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 63

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 64

제59항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 pH는 pH 4 내지 pH 10인, 약제학적 조성물.

청구항 65

제59항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 경구 투여용으로 제형화되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 66

제59항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 비경구 투여용으로 제형화되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 67

제59항 내지 제64항 또는 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비경구 투여는 주사에 의한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 68

제59항 내지 제64항 또는 제66항 또는 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비경구 투여는 정맥내, 근육내, 척수내, 복강내, 피하, 볼러스 또는 연속 투여인, 약제학적 조성물.

청구항 69

제59항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 체중 kg 당 0.1 mg 내지 1000 mg의 하루 투여 용량으로 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 70

PCSK9 (서열번호 1)의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 결합하는 항체를 선택하는 방법으로, 상기 방법은,

- i. 서열번호 1의 아미노산 잔기 78 내지 167로 이루어진 도메인의 적어도 하나의 아미노산 잔기, 예를 들어, 서열번호 1의 적어도 5개, 예를 들어, 적어도 10개, 예를 들어, 적어도 15개, 예를 들어, 적어도 20개, 예를 들어, 적어도 25개, 예를 들어, 적어도 30개, 예를 들어, 적어도 35개, 예를 들어, 적어도 40개, 예를 들어, 적어도 45개, 예를 들어, 적어도 50개, 예를 들어, 적어도 55개, 예를 들어, 적어도 60개, 예를 들어, 적어도 65개, 예를 들어, 적어도 70개, 예를 들어, 적어도 75개, 예를 들어, 적어도 80개, 예를 들어, 아미노산 잔기 78 내지 167로 이루어진 도메인의 적어도 모든 아미노산을 포함하는 PCSK9의 폴리펩타이드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 단편 또는 PCSK9의 폴리펩타이드 단편을 포유동물에게 투여하는 단계;
- ii. 상기 폴리펩타이드를 인지하는 항체를 동정하고 선택하는 단계, 및
- iii. 상기 선택된 항체가 경쟁적 ELISA 검정에서 하나 이상의 표준 항체를 대체할 수 있는지를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 방법은 상기 표준 항체 중 적어도 하나를 대체할 수 있는 항체를 선택하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, 상기 선택된 항체가 경쟁적 ELISA에서 하나 이상의 표준 항체를 대체할 수 있는지를 결정하기 위한 단계는,

- i. 상기 표준 항체에 의해 인지되는 에피토프를 포함하는 PCSK9 또는 이의 단편을 제공하는 단계; 및
- ii. 시험 항체 및 상기 표준 항체를 상기 PCSK9 또는 이의 단편에 첨가하는 단계로서, 시험 항체 또는 표준 항체가 검출가능한 표지로 표지되거나 2개의 항체 모두가 상이한 검출가능한 표지로 표지되는, 단계; 및
- iii. PCSK9에서 검출가능한 표지의 존재를 검출하는 단계를 포함하여 상기 시험 항체가 표준 항체를 대체할 수 있는지를 검출하는 것인, 방법.

청구항 73

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 항체가 LDLR 분해를 억제할 수 있는지를 결정하기 위해 상기 항체를 시험하고 LDLR 분해를 억제할 수 있는 항체를 선택함을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 74

헤파린과 같은 HSPG의 PCSK9로의 결합을 억제할 수 있는 펩타이드 또는 헤파린 유사체를 선택하는 방법으로서, 상기 방법은,

- i. 다수의 펩타이드 또는 헤파린 유사체를 제공하는 단계;
 - ii. 상기 다수의 펩타이드 또는 헤파린 유사체를 배지에서 간세포-유래된 세포주와 같은 LDLR-발현 세포주로부터 유래된 세포와 함께 항온처리하는 단계;
 - iii. 상기 배지 중의 PCSK9의 수준 및/또는 상기 세포의 LDLR의 수준을 결정하는 단계;
 - iv. 단계 iii에서 결정되는 바와 같은 최고 수준의 PCSK9 및/또는 LDLR을 생성하는 펩타이드 또는 헤파린 유사체를 선택하는 단계
- 를 포함하는, 방법.

청구항 75

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화합물에 선택적으로 결합할 수 있는 화합물.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 화합물은 항체인, 화합물.

청구항 77

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같이 항체를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은,

- i. 단백질, 또는 PCSK9의 HSPG 결합 도메인을 포함하는 단백질 또는 이의 단편 또는 이의 기능성 등가물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포유동물에게 투여하는 단계;
- ii. 항체가 PCSK9 (서열번호 1)에 결합할 수 있는 경우, 상기 항체를 선택하는 단계;
- iii. 항체가 돌연변이된 PCSK9에 결합할 수 없는 경우, 상기 항체를 선택하는 단계로서, 상기 돌연변이된 PCSK9는 HSPG에 결합할 수 없는 것인, 단계를 포함하는, 방법.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 돌연변이된 PCSK9는 93, 96, 97, 104, 105, 136, 139, 165 또는 167번 위치에서 돌연변이된 것인, 방법.

청구항 79

제77항 또는 제78항에 있어서, 상기 돌연변이된 PCSK9는 93, 96, 97, 104, 105 및 139번 위치에서 돌연변이된 것인, 방법.

청구항 80

제77항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이된 PCSK9는 돌연변이체 R93A, R96A, R97A, R104A, R105A, K136A, H139A, R165A 또는 R167A로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 81

제77항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이된 PCSK9는 R93A, R96A, R97A, R104A, R105A, R39A 돌연변이체인, 방법.

청구항 82

제77항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물은 설치류인, 방법.

청구항 83

제77항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 포유동물로부터 항체 생산 세포를 단리시키고, 상기 항체 생산 세포로부터 하이브리도마 세포를 제조하고, 상기 하이브리도마를 배양하고 상기 하이브리도마에 의해 생산된 항체를 단리시킴을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 84

제77항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 이전의 항들 중 어느 한 항에 따른 항체이고, 상기 방법은 숙주 세포를 상기 항체를 암호화하는 핵산 작제물로 형질감염시키는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 85

제77항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 재조합 세포에 의해 생산되는 것인, 방법.

청구항 86

제77항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 세포는 세균 및 진핵 미생물을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 미생물인, 방법.

청구항 87

제77항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물은 에스케리치아 콜리 (*Escherichia coli*), 락토바실

러스 제아 (*Lactobacillus zeae*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 리비단스 (*Streptomyces lividans*), 스태필로코커스 카르노수스 (*Staphylococcus carnosus*), 바실러스 메가테리움 (*Bacillus megaterium*) 및 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 세균인, 방법.

청구항 88

제77항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물은 사카로마이세스 세레비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*), 아스퍼질러스 나이거 (*Aspergillus niger*), 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 스킨조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*) 및 클루이베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 진핵 미생물인, 방법.

청구항 89

제77항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 식물 세포 및 동물 세포를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 상기 식물 세포는 아라비도프시스 종 (*Arabidopsis sp.*), 완두콩, 쌀, 옥수수, 담배, 보리, 또는 이의 종자를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 91

제89항에 있어서, 상기 동물 세포는 차이니즈 햄스터 난소, 마우스 및 인간을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 포유동물로부터 유래되는 것인, 방법.

청구항 92

제89항에 있어서, 상기 동물 세포는 곤충 또는 조류 세포주로부터 유래되는 것인, 방법.

청구항 93

제77항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 항체를 동정하고 선택하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 94

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화합물 또는 제59항 내지 제69항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 혈장 LDL-C 수준을 감소시키기 위한 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, 상기 대상체는 스타틴 치료에 응답하지 않는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원의 개시내용은 지질단백질 대사 장애의 치료를 위한 전구단백질 컨버타제 서브틸리신-유사/꺾신 9형 (PCSK9)의 억제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 죽상동맥경화증에 의해 유발되는 관상 동맥 질환은 유럽 및 미국에서 주요 사망 원인이다. 죽상동맥경화증의 주요 위험 인자는 순환계에 상승된 수준의 콜레스테롤-운반 저-밀도-지질단백질 (LDL 콜레스테롤 또는 LDL-C) 입자를 갖는 고콜레스테롤혈증이다. LDL 콜레스테롤 입자의 대사는 콜레스테롤 합성과 신체에서 콜레스테롤 요구를 제공하기 위한 식이 섭취의 균형을 유지하기 위해 고도로 조절된다. LDL 콜레스테롤의 턴오버에서 주요 조절

인자는 LDL 입자의 세포 섭취를 매개하고 순환계에서 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시키는 LDL 수용체 (LDLR)이고 이는 LDLR 결핍 또는 기능 손상에 의해 유발되는 가족성 고콜레스테롤혈증을 갖는 환자에 의해 설명된다.

[0003] LDL 고콜레스테롤 혈장 수준을 감소시키기 위한 성공적인 전략은 LDLR의 세포 수준을 증가시키는 것이고 오늘날 LDL 콜레스테롤을 저하시키기 위해 가장 광범위하게 사용되는 의약은 스타틴이다. 스타틴은 콜레스테롤의 합성을 억제하고 LDLR의 발현을 상향조절함에 따라 총체적으로 순환하는 LDL 콜레스테롤의 양을 감소시킨다. 그러나, 상당수의 환자는 스타틴에 반응하지 않거나 다양한 부작용으로 인해 스타틴을 견디지 못한다. 추가로, 스타틴은 또한 LDLR의 강력한 음성 조절인자로서 최근에 동정된 전구단백질 컨버타제 서브틸리신-유사/젝신 9형 (PCSK9)의 발현을 증가시킴으로써 (문헌참조: Seidah et al., 2014), LDL 콜레스테롤에 대한 이러한 효과에 대응한다.

[0004] PCSK9의 표적화는 혈장 LDL-C를 저하시키기 위한 최근 전략이다 (문헌참조: Lagace et al., 2006). LDLR의 세포 수준은 LDLR과 결합하는 PCSK9의 능력으로 인해 감소됨으로써 수용체의 리소좀 분해의 재활용 및 증진을 손상시킨다. PCSK9 기능획득 변이는 LDLR의 증가된 분해로 인해 순환 LDL-C를 상당히 증가시킨다. 대조적으로, PCSK9 기능상실 돌연변이를 갖는 개체는 감소된 수준의 LDL-C를 보여주고 관상 심장 질환의 보다 적은 발병을 나타낸다. 여러 주요 제약 회사는 고콜레스테롤혈증을 상승시키기 위해 PCSK9를 표적화하는 치료학적 전략을 위한 승인을 얻어냈다. PCSK9의 LDLR-결합 부위에 대해 지시된 PCSK9-특이적 항체의 투여는 단계 III 임상 시험에서 LDL-C 혈장 수준을 감소시키는 것으로 보고되었다 (문헌참조: Mullard (2015) Nat Rev Drug Discov; Sheridan (2015) Nature Biotechnology). 그러나, 상기 PCSK9:LDLR 결합 상수는 120-620 nM 범위 (문헌참조: Cunningham et al., 2007; Fisher et al., 2007)이지만 상기 PCSK9 혈장 농도는 약 6 nM이고 (문헌참조: Lakoski et al., 2009), 이는 PCSK9가 생리학적 관련 농도에서 LDLR과 직접 결합하지 못할 가능성이 높게 한다. 추가로, PCSK9는 단지 간에서 LDLR을 표적화하고 예를 들어, 고수준의 LDLR을 또한 발현하는 스테로이드 호르몬 생성 조직에서는 그렇지 못하였고 이는 간-특이적 공동-수용체의 필요성을 시사한다 (문헌참조: Seidah et al., 2014). 따라서, LDLR은 주요 PCSK9 수용체가 아닐 가능성이 매우 높다. 대신, 공지되지 않은 수용체 (수용체 X)는 순환계 PCSK9를 포획할 수 있고 후속적으로 이것을 LDLR로 전달한다. 상기 수용체로의 PCSK9 결합 억제는 따라서 PCSK9:LDLR 상호작용의 억제와 비교하여, 보다 우수한 전략이다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 LDLR이 간세포의 표면 상에 유일한 PCSK9 수용체가 아니라는 발견에 관한 것이다. 본원 발명자는 PCSK9가 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 (HSPG)에 대한 결합 모티프를 함유함을 발견하였다. 상기 모티프에 도입된 돌연변이 및 헤파린에 의한 HSPG로의 결합 억제는 놀라게도 PCSK9-유도된 분해로부터 LDLR을 보호한다. PCSK9와 HSPG 간의 상호작용의 억제는 PCSK9 억제 항체의 임상 시험과 비교하여 보다 우수한 치료학적 잠재력을 갖는다 (문헌참조: Chan et al., 2009). 중요하게, PCSK9에서 HSPG-결합 모티프는 LDLR-결합 표면의 것과 상이하다. HSPG는 하나 이상의 헤파란 설페이트 글리코사아미노글리칸 쇄로 대체된 코어 단백질로 이루어진다. 헤파린은 헤파란 설페이트 글리코사아미노글리칸의 한 유형이다. HSPG는 고도로 당화된 세포 표면 단백질이고, 이는 HSPG-결합 모티프를 갖는 단백질 리간드에 결합하여 예를 들어, 성장 인자의 국소 데포를 생성한다 (문헌참조: Xu and Esko, 2014). 상기 데이터는 PCSK9가 HSPG에 결합하고, 상기 상호작용이 PCSK9에서 HSPG-결합 모티프의 부위-지시된 돌연변이 유발에 의해 폐지시켜 헤파린에 결합할 수 없는 PCSK9 돌연변이체를 유발하고 LDLR을 분해시키는 손상된 능력을 나타냄을 보여준다. 추가로, 헤파린, 헤파린 모사체 또는 PCSK9에서 HSPG 결합 부위에 대해 지시된 모노클로날 항체를 사용한 세포의 항온처리는 LDLR의 수준을 상승시키고 배지에서 PCSK9의 증가된 농도를 수반한다. 이를 종합해 보면, 본원의 실시예에 명시된 결과는 PCSK9 기능이 HSPG의 결합에 의존하고 LDLR의 세포 수준이, PCSK9와 HSPG 간의 상호작용이 폐지되는 경우 증가됨을 입증한다.

[0006] 따라서, HSPG는 세포 표면 LDLR의 PCSK9 매개된 분해에서 임계적 공동 수용체로서 기능한다. 본원 발명의 발견은 HSPG가 LDLR의 PCSK9 유도된 하향 조절에서 주요 기능을 가짐을 보여준다.

[0007] PCSK9와 HSPG 간의 상호작용 부위는 PCSK9 기능을 차단시키는데, 특히, LDLR 수준에 대한 PCSK9의 효과를 억제하는데 표적화될 수 있다. 따라서 고콜레스테롤혈증의 치료 및 관상 동맥 질환의 예방에서 새로운 전략이 기대되어 있다.

[0008] 제1 양상에서, 본 발명은 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 수용체의 PCSK9로의 결합을 억제할 수 있는 화합물에 관한 것이다.

[0009] 또 다른 양상에서, 본 발명은 지질단백질 대사 장애의 치료를 위한 의약의 제조를 위해 본원에 정의된 바와 같

은 화합물에 관한 것이다.

- [0010] 여전히 또 다른 양상에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 화합물에 관한 것이다.
- [0011] 또 다른 양상에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 지질단백질 대사 장애의 치료 방법에 사용하기 위해 본원에 정의된 바와 같은 화합물에 관한 것이다.
- [0012] 또 다른 양상에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 지질단백질 대사의 장애의 치료 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 상기 대상체에게 본원에 정의된 바와 같은 화합물을 투여함을 포함한다.
- [0013] 또 다른 양상에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 이상지질혈증, 고콜레스테롤혈증 및 심장 관상 질환으로 이루어진 그룹과 같은 지질단백질 대사 장애의 치료 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:
 - [0014] i. 상기 개체로부터 단리된 조직 샘플 또는 혈장 샘플을 제공하는 단계,
 - [0015] ii. 상기 조직에서 LDLR의 수준 및/또는 상기 혈장 샘플에서 PCSK9의 수준 및/또는 LDL-C의 수준을 결정하는 단계,
 - [0016] iii. 단계 ii)의 발현 수준을 대조군 조직 샘플 또는 대조군 혈장 샘플 수준과 서로 관련시키는 단계,
 - [0017] iv. 치료 용법을 평가하는 단계,
 - [0018] v. 본원에 정의된 바와 같은 치료학적 유효량의 조성물을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계.
- [0019] 또 다른 양상에서, 본 발명은 LDLR의 분해를 억제하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 본원에 정의된 바와 같은 화합물을 투여함을 포함한다.
- [0020] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 화합물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 또 다른 양상에서, 본 발명은 PCSK9 (서열번호 1)의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 결합하는 항체를 선택하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:
 - [0022] i. PCSK9의 폴리펩타이드 단편 또는 서열번호 1의 아미노산 잔기 78 내지 167로 이루어진 도메인의 적어도 하나의 아미노산 잔기, 예를 들어, 적어도 5개, 예를 들어, 적어도 10개, 예를 들어, 적어도 15개, 예를 들어, 적어도 20개, 예를 들어, 적어도 25개, 예를 들어, 적어도 30개, 예를 들어, 적어도 35개, 예를 들어, 적어도 40개, 예를 들어, 적어도 45개, 예를 들어, 적어도 50개, 예를 들어, 적어도 55개, 예를 들어, 적어도 60개, 예를 들어, 적어도 65개, 예를 들어, 적어도 70개, 예를 들어, 적어도 75개, 예를 들어, 적어도 80개, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 잔기 78 내지 167로 이루어진 도메인의 적어도 모든 아미노산을 포함하는 PCSK9의 폴리펩타이드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 단편을 포유동물에게 투여하는 단계;
 - [0023] ii. 상기 폴리펩타이드를 인지하는 항체를 동정하고 선택하는 단계, 및
 - [0024] iii. 상기 선택된 항체가 경쟁적 ELISA 검정에서 하나 이상의 표준 항체를 대체할 수 있는지를 결정하는 단계.
- [0025] 또 다른 양상에서, 본 발명은 헤파린과 같이 HSPG의 PCSK9로의 결합을 억제할 수 있는 펩타이드 또는 헤파린 유사체 또는 모사체를 선택하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:
 - [0026] i. 다수의 펩타이드 또는 헤파린 유사체 또는 모사체를 제공하는 단계;
 - [0027] ii. 배지에서 간세포 유래된 세포주와 같은 LDLR-발현 세포주로부터 유래된 세포로 상기 다수의 펩타이드 또는 헤파린 유사체 또는 모사체를 항온처리하는 단계;
 - [0028] iii. 상기 배지에서 PCSK9의 수준 및/또는 상기 세포의 LDLR의 수준을 결정하는 단계;
 - [0029] iv. 단계 iii)에서 결정된 바와 같이 최고 수준의 PCSK9 및/또는 LDLR을 유발하는 펩타이드 또는 헤파린 유사체 또는 모사체를 선택하는 단계.
- [0030] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같이 화합물에 선택적으로 결합할 수 있는 화합물에 관한 것이다.
- [0031] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 항체를 제조하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

- [0032] i. 단백질, 또는 PCSK9의 HSPG 결합 도메인을 포함하는 단백질 또는 이의 단편 또는 이의 기능성 증가물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포유동물에게 투여하는 단계;
- [0033] ii. PCSK9 (서열번호 1)에 결합할 수 있는 경우 상기 항체를 선택하는 단계;
- [0034] iii. 돌연변이된 PCSK9에 결합할 수 없는 경우 상기 항체를 선택하는 단계 (여기서, 상기 돌연변이된 PCSK9는 HSPG에 결합할 수 없다).
- [0035] 또 다른 양상에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 혈장 LDL-C 수준을 감소시키기 위한 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 상기 대상체에게 본원에 정의된 바와 같은 화합물 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1: LDLR이 순환계로부터 콜레스테롤-함유 LDL-C 입자를 취득하고 수용체 (LDLR)가 엔도솜 (A)에서 카고 (cargo)의 방출 후 세포 표면으로 재활용됨을 보여주는 문헌에 기재된 바와 같은 현재 모델의 도면. PCSK9로의 결합시, LDLR 자체는 리소솜 (B)에서 분해된다. 따라서, PCSK9의 높은 활성은 세포 표면에서 LDLR의 수준을 감소시키고 혈장 콜레스테롤을 증가시킨 반면, PCSK9 활성의 억제는 혈장 콜레스테롤 수준을 감소시키고 관상 동맥 질환의 진행을 서행시킨다.

도 2: (A) 좌측 및 우측 화살표에 의해 각각 지적된 LDLR 결합 부위 및 HSPG 결합 부위를 갖는 PCSK9의 공간 채움 모델을 나타낸다. (B) 지적된 양으로 하전된 아미노산 (R: 아르기닌, H: 히스티딘)을 갖는 PCSK9 (PDB ID: 2PMW) (문헌참조: Piper et al., 2007)에서 예측된 HSPG 결합 부위의 정전기 표면 (적색 음성; 청색 양성)에서 헤파린 펜타사카라이드 (SANORG, 스틱). (C) PCSK9에서 HSPG 결합 부위 상으로 SANORG의 중첩 (리본). (D) 헤파리나제 1의 존재 또는 부재하의 처리 후 PCSK9를 발현하는 비-침투성화된 HepG2 세포 (백색). 핵은 Hoechst로 염색시켰다 (암갈색). (E) 헤파린으로의 PCSK9 결합은 헤파린 친화성 크로마토그래피에 의해 분석하였다. PCSK9는 500 mM의 NaCl 농도에서 칼럼으로부터 용출시켰다.

도 3: 지정된 아미노산 잔기가 알라닌으로 돌연변이된 PCSK9 변이체를 CHO 세포에서 일시적으로 발현시켰다. (A) 세포 용해물 및 배지의 항-PCSK9 웨스턴 블롯팅은 세포 용해물에서 전구단백질 (proPCSK9)로부터 성숙한 PCSK9로의 올바른 프로세싱 및 성숙한 PCSK9의 세포 배지로의 분비 뿐만 아니라 모든 PCSK9 변이체의 발현을 보여주었다. PCSK9의 어떠한 발현도 모사 형질감염된 세포에서 검출되지 않았다. (B) 일시적으로 형질감염된 CHO 세포의 배지로 분비된 PCSK9 돌연변이체는 친화성 크로마토그래피에 이어서 항-PCSK9를 사용한 분획의 웨스턴 블롯팅에 의해 헤파린으로의 결합에 대해 분석하였다. 모든 돌연변이체는 지정된 위치에서 알라닌 치환을 갖는다. 야생형 (WT) PCSK9 및 돌연변이체 R165R167은 0.3-0.4 M NaCl에 반응하는 분획에서 용출되었고, 반면 PCSK9 돌연변이체 R96R97 및 R104R105는 헤파린에 대해 감소된 친화성을 보여주었고 통류물 또는 제1 분획물에서 발견되었다. PCSK9 돌연변이체 R93R104R105H139 및 R93R96R97R104R105H139는 전적으로 통류물에서 발견되었고 헤파린에 결합하지 않았다. (C): HSPG 결합 도메인은 LDLR 단편과의 복합체 (PDB: 3P5B)에서 PCSK9의 표면 계공에서 PCSK9의 공간 채움 모델에서 나타난 바와 같이 LDLR 결합 부위 반대편에 위치시킨다. LDLR 단편은 베타 프로펠러 도메인 및 EGF 도메인 A 및 B 및 L7을 함유하고, PCSK9 C-말단의 촉매 도메인 및 프로도메인은 기본 헬릭스와 함께 나타낸다. 상기 모델화된 헤파린 단편은 스틱으로 나타낸다. (D) HepG2 세포의 배양 배지로부터의 내인성 PCSK9 및 ApoE는 친화성 크로마토그래피 및 웨스턴 블롯에 의해 분석되는 경우 헤파린으로 유사한 결합을 보여주었다.

도 4: WT PCSK9 (10 nM)와 18시간 항온처리된 HepG2 세포는 돌연변이체 (R93R96R97R104R105H139) PCSK9 (mut)와 항온처리된 세포보다 상당히 낮은 수준의 LDLR을 보여준다. LDL 수용체 수준은 웨스턴 블롯팅 (A)에 의해 평가하였고, GAPDH의 수준은 대조군으로서 나타낸다. 막대 그래프 (B)는 평균 표준 오차 (SEM)와 함께 밀도측정기 (n=3)에 의해 정량된 LDLR의 평균 값을 보여준다. 결과는 스튜던트 t-시험을 사용하여 평가하였다. **p<0.01, ****p<0.0001.

도 5: 헤파린 (50 U/ml)과 24시간 항온처리된 HepG2 세포는 웨스턴 블롯팅 (A)에 의해 평가된 증가된 수준의 LDLR을 보여준다. GAPDH 수준은 대조군으로서 나타낸다. 막대 그래프 (B)는 밀도측정기에 의해 정량된 LDLR의 평균 표준 오차 (SEM)와 함께 평균 값을 보여준다 (n=4). 헤파린을 사용한 항온처리는 또한 ELISA에 의한 측정 시 배지에서 증가된 PCSK9 수준을 유도한다 (C). 막대 그래프는 SEM과 함께 평균 PCSK9 농도를 보여준다 (n=4). 결과는 스튜던트 t-시험을 사용하여 평가하였다. ***p<0.001, ****p<0.0001. (D) = 비-침투성화된 HepG2 세포의 PLA 분석은 LDLR과 PCSK9 사이의 동시 위치화가 세포를 헤파린 (50 U/ml)과 항온처리시 현저히 감소하였음을 보

여주었다.

도 6: (A) 세포 부재 PCSK9/LDLR 결합 검정 (BPS Bioscience)을 사용하여, 본원 발명자는 헤파린 (5 및 50 U/ml)이 PCSK9의 LDLR 결합 영역을 표적화하는 대조군 억제제 항-PCSK9 항체 (5 nM)와 대조적으로 PCSK9와 LDLR의 직접적인 상호작용을 억제하지 못함을 밝혔다 (BPS Bioscience 71207). 결합 검정에서, 고정화된 LDLR에 결합된 비오틴화된 PCSK9로부터 화학발광 시그널을 정량하고 결과는 여기서 억제제 없이 샘플로부터 시그널과 관련하여 정상화됨을 보여준다. 막대 그래프는 표준 편차 오차 막대와 함께 평균 값 (n=3)을 보여준다. 결과는 스튜던트 t-시험을 사용하여 평가하였다. *****p<0.00001.Y-축: % 억제제가 없는 경우. (B) ELISA에 의한 측정 시 배지에서 헤파린의 PCSK9에 대한 용량 의존적 효과 (n=3). Y-축: 배지 중 PCSK9 (%); (C) RT-PCR에 의한 세포 용해물 중 mRNA 수준의 정량적 분석.

도 7: 증가하는 농도 (0 내지 250 µg/ml)의 헤파린 유사체 Arixtra (Fondaparinux, GlaxoSmithKline Pharma)와 24시간 항온처리된 HepG2 세포는 LDLR의 수준을 상승시켰다. GAPDH 웨스턴 블롯은 주요 대조군으로서 나타낸다.

도 8: (A) 저분자량의 헤파린의 2개의 치료학적 제제가 헤파린 효과 (50 U/ml)에 상응하는 LDLR의 세포 수준을 증가시킬 수 있음을 보여주는 프라그민 (100 U/ml) 및 이노헵 (Innohep) (100 U/ml)과 18시간 항온처리 후 HepG2 세포에서 LDLR의 웨스턴 블롯. GAPDH의 웨스턴 블롯은 주요 대조군으로서 나타낸다. (B) 단독으로 또는 50U 헤파린과 배합된 10 µg PCSK9의 정맥내 투여 1시간 후 마우스의 간에서 LDLR 수준을 보여주는 웨스턴 블롯. 50 µg의 막 제제를 로딩하였다. 대조군으로서 소르틸린에 대한 웨스턴 블롯을 나타내고, PCSK9의 표적인 것으로 이전에 밝혀지지 않았던 PCSK9 수용체는 분해를 유도하였다. (C) B 밴드의 정량은 밀도측정기로 정량하였고 도트 플롯은 평균 값 및 SEM과 함께 비히클 (0.9 % NaCl) 주사된 대조군 %에서 각각의 샘플의 개별 수준을 보여준다. PCSK9 및 헤파린이 동시 주사된 마우스는 상당히 보다 높은 수준의 LDLR (60.3 ± 12.3 % LDLR 대 24.0 ± 4.04 %, n=7 마우스/그룹, p=0.0157, 투-테일드 스튜던트 (two-tailed student's) t-시험)을 보여준다. (D) 인간 HSPG 결합 도메인과 함께 래트 PCSK9를 암호화하는 DNA로 면역화된 3마리의 래트로부터 기원하는 혈청 (1 µl)에 의한 본래의 인간 ³⁵S 표지된 PCSK9의 면역침전을 보여주는 방사능사진 (16시간 노출). 음성 대조군으로서 동물로부터 기원하는 면역전 혈청을 사용하였다. (E) 면역전 또는 면역 IgG (1 µg/ml)와 밤새 항온처리 후 HepG2 세포에서 LDLR을 보여주는 웨스턴 블롯. 현저히 증가된 수준의 세포 LDLR은 면역전 대조군과 비교하여 면역 IgG와의 항온처리 후 나타났다. (F) Aldevron에 의해 수행된 ELISA 스크리닝에서 선택된 24개의 개별 mAb(500µl 조건화된 하이브로마 세포)에 의한 인간 ³⁵S-PCSK9의 면역침전을 보여주는 방사능사진 (16시간 노출). 대조군으로서 mAb#2A8을 사용하였고 이는 ELISA 스크린 (*) (mAb#2A8은 Aldevron에 의해 수행된 ELISA 시험 스크린에서 비특이적인 것으로 시험되었다) 및 비조건화된 하이브리도마 배지(**)에서 임의의 PCSK9 면역반응성을 보여주지 않았다. (G) 웨스턴 블롯에 의해 분석된 바와 같이 mAb (조건화된 하이브리도마 배지의 1:10 희석)로 항온처리된 HepG2 세포에서 LDLR 수준을 보여주는 막대 그래프 (SEM과 함께 평균 2 내지 4회 실험). 12개의 개별 mAb 클론은 대략적으로 2배 증가된 LDLR을 나타낸다. (H) 모두 PCSK9 억제 효과를 보여주는 12개의 개별 mAb (500 µl의 조건화된 하이브리도마 배지)에 의한 인간 ³⁵S-돌연변이체 PCSK9 (R93R96R97R104R105H139가 알려진 잔기로 돌연변이된)의 면역침전을 보여주는 방사능사진 (16시간 노출). 대조군으로서 폴리클로날 항체 (pAb, AF3888 (R&D 시스템))를 사용하였다. 3개의 mAb는 PCSK9 돌연변이체를 침전시키는데 실패하였고 이는 이들이 HSPG 결합 도메인을 특이적으로 인지함을 지적한다. (I) mAb 1G8, 5E11 및 10E5에 의한 ³⁵S-PCSK9 WT 및 변이체 R96R97, R104R104, R93R96R97H139, 및 R93R96R97R104R105H139의 면역 침전을 보여주고 상기 mAb가 HSPG 결합 도메인 내 에피토프를 인지함을 지적하는 방사능사진. 대조군으로서 R&D 시스템 AF3888 (pAb)을 사용하였다.

도 9: (A) 헤파린 모사체 텍스트란 설페이트 (200 µg/ml)와 24시간 항온처리 후 HepG2 세포에서 LDLR의 웨스턴 블롯, 이는 상기 화합물이 LDLR의 세포 수준을 강하게 증가시킬 수 있음을 보여준다. 비교를 위해 헤파린 (50 U/ml)을 보여준다. GAPDH는 주요 대조군으로서 나타낸다. (B) 텍스트란 설페이트 (0-200 µg/ml)와 항온처리 후 HepG2 세포에서 LDLR의 농도 의존적 증가를 보여주는 LDLR 수준의 밀도측정 정량. 막대 그래프는 SEM 오차 막대로 비처리된 세포의 %에서 LDLR 평균을 보여준다. (C) PCSK9 및 텍스트란 설페이트에 대한 미세스케일 열확산 (MST) 결합 곡선. Y 축: 형광 시그널. X 축: 텍스트란 설페이트 또는 텍스트란 농도, K_D=180 µM. 원형: 텍스트란 설페이트. 정사각형: 텍스트란. (D) 펜토산 설페이트 (0-200 µg/ml)로 24시간 항온처리 후 HepG2 세포에서 LDLR의 웨스턴 블롯, 밀도측정 정량 (E), 이는 50-200 µg/ml 펜토산 설페이트로 처리된 세포 기원의 용출물에서 LDLR의 4배 증가를 보여준다. 막대 그래프는 SEM 오차 막대와 함께 비처리된 세포의 %에서 LDLR 평균을 보여준다. (F), PCSK9에 대한 MST 결합 곡선 및 펜토산 설페이트 Y 축: 형광 시그널. X 축: 펜토산 설페이트 농도. 원

형: 펜토산 설페이트, $K_D=381 \mu\text{M}$. 정사각형: 대조군. (G), 수라민 (0-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 24시간 항온처리 후 HepG2 세포에서 LDLR의 정량. 막대 그래프는 SEM 오차 막대와 함께 비처리된 세포의 %에서 LDLR 평균을 보여준다. 수라민-항온처리된 HepG2 세포에서 LDLR의 대표적인 웨스턴 블롯은 (A)에 나타난다. (H): PCSK9 및 수라민에 대한 MST 결합 곡선. Y축: 형광성 시그널. X축 수라민 농도. 원형: 수라민, $K_D=190 \mu\text{M}$. 정사각형: 대조군. (I) 포스포티오아세토올리고뉴클레오타이드 S-dC-36 (0-5.0 μM)과 24시간 항온처리 후 HepG2 세포에서 LDLR의 웨스턴 블롯 및 밀도측정 정량 (J), 이는 세포 수용체 수준에서 농도 의존적 증가를 보여준다. 막대 그래프는 SEM 오차 막대와 함께 비처리된 세포의 %에서 LDLR 평균을 보여준다. 결과는 스튜던트 t-시험을 사용하여 평가하였다. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$. (K) PCSK9 및 S-dC-36에 대한 MST 결합 곡선. Y 축: 형광 시그널. X 축 S-dC-36 농도. 원형: S-dC-36, $K_D=4.8 \mu\text{M}$. 정사각형: 대조군.

도 10: PCSK9 (10 μg)의 주사전 헤파리나제 I의 주입은 LDLR의 PCSK9 유도된 분해를 완전히 억제하였다. 대표적인 샘플 (A)의 웨스턴 블롯 및 LDLR의 막대 그래프 정량 (B)을 보여준다. 웨스턴 블롯에 대해, GAPDH는 주요 대조군으로서 사용한다. e: 속빈 라인. 대조군 n=7, PCSK9 n=6, 헤파리나제 n=5, 헤파리나제/PCSK9 n=5. PCSK9 (10 μg) 및 헤파린 (50U) 또는 수라민 (300 μg)이 동시 주사된 마우스는 단독의 PCSK9가 주사된 마우스 (C)와 비교하여 상당히 보다 높은 수준의 LDLR을 보여준다. 대조군 n=15, PCSK9 n= 10, PCSK9/헤파린 n=7, PCSK9/수라민 n=3. (D) 쥐 PCSK9 특이적 ELISA에 의해 평가된 바와 같이 헤파린 (50U)의 정맥내 주사 후 PCSK9의 혈장 수준.

도 11: 단독의 또는 50 μg 의 mAb와 배합된 10 μg 의 PCSK9의 정맥내 투여 1시간 후 마우스의 간에서 LDLR 수준.

도 12: 형광 염료 보디피 (Bodipy)로 표지된 10 ng/ml의 LDL 입자와 4시간 항온처리 후 수라민 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 밤새 항온처리 후 HepG2 세포에서 상대적 형광 시그널을 보여주는 막대 그래프. 수라민을 사용한 PCSK9의 억제 는 LDL의 취득을 2배 증가시킨다.

도 13: A) 및 B) 100 μM 의 수라민 또는 HMG CoA 리덕타제 억제제 메바스타틴 및 심바스타틴과의 항온처리 24시간 및 48시간 후 HepG2 세포에서, 웨스턴 블롯에 의해 평가된 바와 같이 LDLR 수준을 보여주는 막대 그래프. 수라민으로 항온처리된 세포는 스타틴으로 항온처리된 세포보다 높은 수준의 LDLR을 나타낸다.

정의

헤파린 유사체: 본원에 사용된 바와 같은 상기 용어는 헤파린과 구조적으로 유사한 화합물을 언급한다.

헤파린 모사체: 본원에서의 상기 용어는 기능적으로 유사하게 작용하는, 즉, 헤파린을 모사하는 화합물을 언급한다. 상기 용어는 따라서 본원의 개시내용에서 구조적으로 유사한 화합물 및 상이한 구조를 갖지만 헤파린과 동일한 기능을 갖는 화합물 둘 다를 포함한다.

LDL-콜레스테롤 (LDL-C) 수준: 소정의 개체에 대한 최적의 LDL-C 수준은 심장 질환의 근본적인 위험에 따라 다양하다. 건강한 개체에 대해, LDL-C 수준은 이상적으로 2.6-3.3 mmol/L 미만 (또는 100-129 mg/dL)이어야만 한다. 3.4 내지 4.1 mmol/L 또는 130 내지 159 mg/dL 사이의 수준은 경계선 상에서 높고, 4.1 내지 4.9 mmol/L 또는 160 내지 189 mg/dL 사이의 수준은 높고 4.9 mmol/L 또는 189 mg/dL 초과 수준은 매우 높다. 심장 질환의 위험에 처한 개체에 대해, 2.6 mmol/L 또는 100 mg/dL 미만의 수준이 추천되고 1.8 mmol/L 또는 70 mg/dL 미만의 수준은 심장 질환의 매우 높은 위험에 처한 개체를 위해 바람직할 수 있다.

저밀도 지질단백질 수용체 (LDLR) 수준: 세포에서 LDLR의 합성은 유리된 세포내 콜레스테롤의 수준에 의해 조절되고; 콜레스테롤이 세포의 필요량보다 과량인 경우, LDLR의 전사는 억제될 것이다. LDLR 수준은 이에 제한되지 않는 웨스턴 블롯팅, RT-PCR 및 유동 세포측정과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다.

저분자량 헤파린: 천연 헤파린은 다양한 길이 또는 분자량의 분자 쇄로 이루어진다. 예를 들어, 5000 내지 40,000 Da 초과의 다양한 분자량의 쇄는 본원에서 다분산성 약제 등급의 헤파린을 구성한다. 대조적으로 저분자량의 헤파린은 단지 단쇄의 폴리사카라이드로 이루어진다. 저분자량의 헤파린은 8000 Da 미만의 평균 분자량을 갖는 헤파린 염으로서 정의되고 이에 대한 모든 쇄의 적어도 60 %는 8000 Da 미만의 분자량을 갖는다. 이들은 중합체성 헤파린의 분획화 또는 탈중합과 같은 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 수득된다.

지질단백질 대사 장애: 상기 용어는 지질 항상성 장애 및 이와 관련된 장애를 언급하고, 이는 예를 들어, 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 고트리글리세라이드혈증, 시토스테롤혈증, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상 심장 질환, 대사 증후군, 급성 관상 증후군, 황색종, 고혈압, 협심증, 비만, 당뇨병 및 혈관 염증을 포함한다.

PCSK9 수준: PCSK9의 혈장 수준은 일반 집단에서 30 내지 3000 ng/ml로 다양하고 메디안 수준은 일반적으로 남성보다 여성에서 보다 높다. PCSK9 수준은 LDL-C 수준과 서로 관련된다.

포스포로티오에이트 (또는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 또는 S-올리고스)는 DNA 변이체이고, 여기서, 비-브릿징 산소들 중 하나는 황에 의해 대체된다. 뉴클레오타이드간 결합의 황화는 다양한 뉴클레아제의 작용을 급격히 감소시키고 지질 이중층을 횡단하기 위한 잠재력을 증가시키는 것으로 사료된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 발명은 특허청구범위에 정의된 바와 같다.
- [0038] 본 발명은 제1 양상에서 HSPG의 PCSK9로의 결합을 억제할 수 있는 화합물에 관한 것이다. 본원 개시내용의 전반에 걸쳐 HSPG의 PCSK9의 변이체로의 결합을 억제할 수 있는 화합물은 또한 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 이해된다. PCSK9의 변이체는 근본적으로 서열번호 1과 동일한 서열을 갖는 폴리펩타이드인 것으로 이해되고, 예를 들어, 서열번호 1의 일부 잔기의 보존성 치환을 갖는 변이체이다.
- [0039] 일부 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 167 중 적어도 하나, 예를 들어, PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 92 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 93 내지 97 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 98 내지 103 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 104 내지 105 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 106 내지 135 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 136 내지 139 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 140 내지 164 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 165 내지 167 중 적어도 하나를 포함하는 PCSK9 (서열번호 1)의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 결합한다.
- [0040] 본원에서 PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 167 중 적어도 하나, 예를 들어, PCSK9 (서열번호 1)의 적어도 2개, 예를 들어, 적어도 5개, 예를 들어, 적어도 10개, 예를 들어, 적어도 15개, 예를 들어, 적어도 20개, 예를 들어, 적어도 25개, 예를 들어, 적어도 30개, 예를 들어, 적어도 35개, 예를 들어, 적어도 40개, 예를 들어, 적어도 45개, 예를 들어, 적어도 50개, 예를 들어, 적어도 55개, 예를 들어, 적어도 60개, 예를 들어, 적어도 65개, 예를 들어, 적어도 70개, 예를 들어, 적어도 75개, 예를 들어, 적어도 80개, 예를 들어, 적어도 85개, 예를 들어, 아미노산 잔기 78 내지 167 모두를 포함하는 PCSK9 (서열번호 1)의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 결합하는 화합물이 제공된다.
- [0041] 일부 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 92 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 93 내지 97 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 98 내지 103 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 104 내지 105 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 106 내지 135 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 136 내지 139 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 140 내지 164 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 165 내지 167 중 적어도 하나를 포함하는 영역을 특이적으로 인지하고 결합한다.
- [0042] 일부 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 92 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 93 내지 97 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 98 내지 103 중 적어도 하나, 아미노산 잔기 104 내지 105 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 106 내지 135 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 136 내지 139 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 140 내지 164 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 165 내지 167 중 적어도 하나를 포함하는 영역을 특이적으로 인지하고 결합한다.
- [0043] 따라서, 하나의 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 78 내지 167을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 78 내지 95를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 96 내지 100을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 101 내지 105를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 106 내지 110을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 111 내지 115를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 116 내지 120을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 121 내지 125를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 126 내지 130을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 131 내지 135를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위

내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 136 내지 140을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 141 내지 145를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 146 내지 150을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 151 내지 155를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 156 내지 160을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 아미노산 잔기 161 내지 167을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 영역을 특이적으로 인지하고 이에 결합한다.

[0044] 따라서, PCSK9 (서열번호 1)의 R93, R96, R97, R104, R105, K136, H139, R165 및 R167로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산, 예를 들어, 하나의 아미노산, 예를 들어 2개의 아미노산, 예를 들어, 3개의 아미노산, 예를 들어, 4개의 아미노산, 예를 들어, 5개의 아미노산, 예를 들어, 6개의 아미노산, 예를 들어, 7개의 아미노산, 예를 들어, 8개의 아미노산, 예를 들어, PCSK9의 R93, R96, R97, R104, R105, K136, H139, R165 및 R167로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 모두에 결합하는 화합물이 제공된다.

[0045] 따라서, 하나의 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R93에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R96에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R97에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R104에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R105에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 K136에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 H139에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R165에 결합한다. 또 다른 양태에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R167에 결합한다.

[0046] 하나의 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R96 및 R97에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R104 및 R105에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 K136 및 H139에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R93 및 H139에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R93, R104, R105 및 H139에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R165 및 R167에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R93, R96, R97, R104, R105 및 H139에 결합한다.

[0047]

[0048] 항체

[0049] 또한 본원에 정의된 바와 같은 화합물이 기재되고 상기 화합물은 항체 또는 이의 기능성 증가물이다.

[0050] 본 발명의 항체는 본원에 정의된 바와 같은 항원을 인지하고 이에 결합할 수 있는 임의의 폴리펩타이드 또는 단백질일 수 있다. 바람직하게, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 용어 "특이적으로 결합하는"이란 비특이적 항원 (예를 들어, BSA)에 대한 것보다 항원에 대해 적어도 10배 보다 높은 친화성으로 결합하는 것을 의미한다.

[0051] 상기 항체는 천연적으로 존재하는 항체 또는 이의 기능성 증가물일 수 있다. 천연적으로 존재하는 항체는 항원을 인지하고 이에 결합할 수 있는 이종4량체 당단백질이다. 이것은 디설파이드 결합에 의해 상호 연결된 2개의 동일한 중쇄 (H) 및 2개의 동일한 경쇄 (L)를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H 로서 약칭된) 및 중쇄 불변 영역 (본원에서 C_H 로서 약칭된)을 포함하거나 바람직하게 이들로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L 로서 약칭된) 및 경쇄 불변 영역 (본원에서 C_L 로서 약칭된)을 포함하거나 바람직하게 이들로 이루어진다. 상기 V_H 및 V_L 영역은 추가로 골격 영역 (FR)으로 호칭되는 보다 보존된 영역이 사이에 배치된 상보성 결정 영역 (CDR)으로 호칭되는 추가변성 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 하기의 순서로 아미노-말단에서 카복시-말단까지 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR을 포함하고 바람직하게 이들로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0052] 천연적으로 존재하는 항체는 또한 낙타과 (낙타, 단봉낙타 및 라마)에 의해 생성되는 바와 같은 중쇄 항체 (HCAb)일 수 있다. HCAb는 경쇄 및 제1 불변 도메인이 없는 단지 중쇄의 동종이량체이다 (Hamers-Casterman et al., 1993). 다른 천연적으로 존재하는 항체는 어떠한 연합된 경쇄를 갖지 않는 2개의 중쇄의 이량체로서 존재하는 뉴 또는 너스 샤크 항원 수용체 (NAR) 단백질에 대한 경우에서와 같이 경쇄가 없을 수 있다. 각각의 쇠는 1개의 가변 (V) 및 5개의 불변 도메인으로 구성된다. NAR 단백질은 항체 분자보다 훨씬 경량인 단일의 면역글로

불린 가변형 도메인으로 구성된다 (문헌참조: Greenberg et al., 1995.).

[0053] 본 발명에 따른 천연적으로 존재하는 항체는 하나 이중사양체로 이루어질 수 있거나 이들은 여러 동일한 이중사양체를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 천연적으로 존재하는 항체는 예를 들어, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 이들 상이한 부류의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 널리 공지되어 있다. 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 항체는 IgG, 예를 들어, IgG-1, IgG-2, IgG-3 및 IgG-4이다.

[0054] 상기 항체는 천연적으로 존재하는 모노클로날 항체와 같은 모노클로날 항체일 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 항체는 천연적으로 존재하는 폴리클로날 항체와 같은 폴리클로날 항체일 수 있다. 모노클로날 및 폴리클로날 항체는 하기에 본원에 추가로 상세히 논의된다.

[0055] 천연적으로 존재하는 항체는 특정 종의 항체일 수 있고, 예를 들어, 상기 항체는 쥐, 래트, 토끼, 염소, 양, 닭, 당나귀, 낙타과 또는 인간 항체일 수 있다. 상기 항체는 쥐 또는 래트 모노클로날 항체일 수 있다. 그러나 상기 항체는 또한 여러 종 기원의 항체 간의 하이브리드일 수 있고, 예를 들어, 상기 항체는 키메라 항체, 예를 들어, 인간화된 항체일 수 있다. 인간 및 인간화된 항체는 본원에서 하기에 추가로 상세히 논의된다.

[0056] 항체의 항원 결합 단편

[0057] 항체의 항원 결합 단편은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 항체의 단편이다. 따라서, 일부 구현예에서, 항체의 기능성 등가물은 항체의 결합 단편을 포함한다. 바람직하게, 상기 단편은 천연적으로 존재하는 항체의 항원 결합 단편이다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 천연적으로 존재하는 항체의 항원 결합 단편의 예는 예를 들어, (i) V_L , V_H , C_L 및 C_H1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_H1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편 또는 (v) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (문헌참조: Ward et al., 1989). Fab 단편은 파괴인 분해에 의해 제조될 수 있다. $F(ab')_2$ 단편은 펩신 처리에 의해 제조될 수 있다.

[0058] 항체의 항원 결합 단편은 바람직하게 적어도 하나의 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 보다 바람직하게 임의로 합성 링커에 의해 연결될 수 있는 2개 이상의 단리된 CDR의 조합을 포함한다. 항체의 항원 결합 단편의 추가의 예는 (i) 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩타이드에 융합된 항원 결합 부위, (ii) 상기 힌지 영역에 융합된 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역, 및 (iii) CH2 불변 영역에 융합된 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역을 포함하는 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질이다. 상기 항원 결합 부위는 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역일 수 있다. 상기 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질은 US 2003/0118592 및 US 2003/0133939에 추가로 기재되어 있다. 이들 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상의 기술을 사용하여 획득되고 상기 단편은 온전한 항체와 같은 동일한 방식의 활용을 위해 스크리닝된다.

[0059] 항체의 항원 결합 단편은 또한 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편인 디아바디일 수 있다. 디아바디는 바람직하게 동일한 폴리펩타이드 쇠 (VH-VL)에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 동일한 쇠 상에 2개의 도메인 간에 쌍을 이루도록 하기에 너무 짧은 링커를 사용함에 의해, 상기 도메인은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 이루고 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 강제된다. 디아바디는 예를 들어, 문헌 [참조: EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger et al., 1993]에 보다 완전하게 기재된다.

[0060] 이중특이적 항체

[0061] 본원에 기재된 항체는 또한 이특이적 항체와 같은 "이중특이적 항체"일 수 있다. 이특이적 항체는 상이한 특이성을 갖는 2개의 상이한 항원 결합 부위를 포함하는 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 예를 들어, 상기 이특이적 항체는 (a) 제1 항원 내 제1 에피토프 및 (b) 제2 항원 내 제2 에피토프를 인지하고 이에 결합할 수 있거나; 이것은 동일한 항원 내 2개의 상이한 에피토프를 인지하고 이에 결합할 수 있다. 용어 "이중특이적 항체"는 상이한 특이성을 갖는 2개 초과 상이한 항원 결합 부위를 갖는 임의의 단백질 또는 폴리펩타이드를 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 (a) 제1 항원 상의 제1 에피토프, (b) 제2 항원 상의 제2 에피토프 및 (c) 제3 항원 상의 제3 에피토프를 인지하고 이에 결합할 수 있거나; 이것은 (a) 제1 항원 상의 제1 에피토프 및 (b) 제2 항원 상의 제2 및 제3 에피토프를 인지하고 이에 결합할 수 있거나; 이것은 동일한 항원 상에 상이한 에피토프를 인지하고 이에 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명은 동일하거나 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 지시되는 이특이적, 삼특이적, 사특이적 및 다른 다중특이적 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0062] 이특이적 항체는 예를 들어, 2개의 하이브리도마를 융합하여 이들의 특이성을 조합하거나, 화학적 가교 연결에 의해 또는 재조합 기술을 사용함에 의해 모노클로날 항체로부터 출발하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 2개의 상이한 항체 (1 및 2)의 V_H 및 V_L 은 재조합 수단에 의해 "크로스-오버"쇄 $V_{H1}-V_{L2}$ 및 $V_{H2}-V_{L1}$ 을 형성하기 위한 재조합 수단에 의해 연결되고 이어서 2개의 항원-결합 부위를 재결합시켜 이량체화될 수 있다 (문헌참조: WO 94/09131). 이특이적 항체는 또한 예를 들어, WO 94/13806에 기재된 바와 같이 상이한 특이성을 갖는 2개의 단일쇄 항체를 유전학적으로 연결시킴에 의해 제조될 수 있다. 또한 항체의 2개의 항원 결합 단편이 연결될 수 있다.

[0063] 인간 및 인간화된 항체

[0064] 이것은 항상 인간 치료요법을 위해 비-인간 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 없고 따라서, 본 발명에 따른 항체는 인간 항체 또는 인간화된 항체일 수 있다.

[0065] 본원에 이해되는 바와 같은 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열을 사용하는 시스템으로부터 수득되는 항체이다. 인간 항체는 예를 들어, 인간 면역글로불린 유전자들 또는 이로부터 제조된 하이브리도마를 위해 유전자전이 또는 염색체전이인 동물 (예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체일 수 있다. 인간 항체는 또한 예를 들어, 형질감염체로부터 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포로부터 단리될 수 있다. 인간 항체는 또한 재조합의 조합적 인간 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0066] 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나 특정 구현예에서 상기 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이유발 또는 생체내 체세포 돌연변이유발에 적용될 수 있고 따라서 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은 인간 생식선 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되고 이와 관련되지만 생체내 인간 항체 생식선 레퍼토리 내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0067] 인간 항체는 바람직하게 아미노산 서열에 있어서 야생형 인간 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 바람직하게 적어도 90 %, 보다 바람직하게 적어도 95 %, 보다 더 바람직하게 적어도 96 %, 97 %, 98 %, 또는 99 % 동일하다. 상기 유전자전이 또는 염색체전이 동물은 재배열되지 않은 인간 중쇄 (μ 및/또는 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열을 암호화하는 인간 면역글로불린 유전자 소형유전자좌를 함유할 수 있다. 추가로, 상기 동물은 내인성 중쇄 및 경쇄 유전자좌를 불활성화시키는 하나 이상의 돌연변이를 함유할 수 있다. 상기 동물의 예는 문헌 [참조: Lonberg et al. (1994) 및 WO 02/43478]에 기재되어 있다.

[0068] 본원에 기재된 항체는 키메라 항체, 즉, 상이한 종으로부터 유래된 영역을 포함하는 항체일 수 있다. 상기 키메라 항체는 예를 들어, 하나의 동물 종으로부터의 가변 영역 및 또 다른 동물 종으로부터의 불변 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 키메라 항체는 마우스 모노클로날 항체로부터 유래하는 가변 영역 및 인간인 불변 영역을 갖는 항체일 수 있다. 상기 항체는 또한 인간화된 항체로 언급될 수 있다. 따라서, 상기 항체는 또한 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 수득되고 부분적으로 다른 서열로부터 수득된 서열에 의해 부분적으로 암호화된 인간화된 항체일 수 있다. 상기 다른 서열은 바람직하게 다른 종으로부터 기원하는, 보다 바람직하게 다른 포유동물 종으로부터 기원하는 생식선 면역글로불린이다. 특히, 인간화된 항체는 항원 결합 부위가 비-인간 종으로부터 기원하는, 바람직하게 비-인간 포유동물 종으로부터 기원하는, 예를 들어, 마우스 또는 래트로부터 기원하는 면역글로불린으로부터 유래된 반면, 분자의 나머지 면역글로불린-유래된 부분들의 일부 또는 모두는 인간 면역글로불린으로부터 유래된 항체일 수 있다. 상기 비-인간 종 기원의 항원 결합 부위는 예를 들어, 완전한 V_L 또는 V_H 또는 둘 다, 또는 V_L 또는 V_H 또는 둘 다에서 적당한 인간 골격 영역 상으로 접목된 하나 이상의 CDR로 이루어질 수 있다. 따라서, 인간화된 항체에서, CDR은 마우스 또는 래트 모노클로날 항체로부터 기원할 수 있고 항체의 다른 영역은 인간 기원이다.

[0069] 모노클로날 항체

[0070] 모노클로날 항체 (Mab)는 항체 집단을 언급하고, 여기서, 상기 항체 분자는 유사하고 따라서 동일한 에피토프를 인지하고 이에 결합한다. 모노클로날 항체는 일반적으로 숙주 세포주에 의해 그리고 흔하게는 하이브리도마 세포주에 의해 생산된다. 모노클로날 항체 및 항체-합성 하이브리도마 세포를 제조하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 항체 생산 하이브리도마는 예를 들어, 항체 생산 B 림프구와 불멸화된 B-림프구 세포주의 융합에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 모노클로날 항체는 예를 들어, 표준 체세포 하이브리드화 기술 [문헌 참조: Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)]에 의해 또는 문헌 [참조: Antibodies: A Laboratory Manual, By Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998]에 기재된 바와 같이 제조

될 수 있다. 상기 모노클로날 항체는 임의의 적합한 포유동물 종으로부터 유래될 수 있지만 흔히 상기 모노클로날 항체는 설치류 항체 예를 들어, 쥐 또는 래트 모노클로날 항체이다.

[0071] 폴리클로날 항체

[0072] 폴리클로날 항체는 특정 주어진 항원에 인지하고 이에 결합하는 상이한 항체 분자의 혼합물을 포함하는 항체 집단을 언급하고, 따라서 폴리클로날 항체는 상기 항원내 상이한 에피토프를 인지할 수 있다. 일반적으로 폴리클로날 항체는 항원으로 이전에 면역화된 동물, 바람직하게는 포유동물의 혈청으로부터 정제된다. 폴리클로날 항체는 예를 들어, 문헌 [참조: Antibodies: A Laboratory Manual, By Ed Harlow and David Lane]에 기재된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다,

[0073] 재조합 항체

[0074] 항체는 또한 재조합 항체, 즉, 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 단리된 항체일 수 있다. 본 발명에 따른 재조합 항체는 예를 들어, 합성 라이브러리를 사용하거나 파아지 디스플레이에 의해 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 항체는 재조합 세포에서 제조된다. 재조합 세포는 세균 및 진핵 미생물을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 미생물일 수 있다. 재조합 항체는 세균과 같은 미생물 숙주 유기체, 효모 또는 다세포 유기체로부터 유래된 세포의 배양물 중에서 제조될 수 있다. 흔히, 에스케리치아 콜리 (*Escherichia coli*)는 숙주 유기체로서 유용하다. 흔히 재조합 항체는 Fab 단편, F(ab')₂, Fv 단편과 같은 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함하는 천연적으로 존재하는 항체의 단편이거나 재조합 항체는 scFV이다. 따라서, 일부 구현예에서 상기 항체는 Fab 단편, F(ab')₂, Fv 단편과 같은 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함하는 천연적으로 존재하는 항체의 단편이다. 다른 구현예에서, 상기 재조합 항체는 scFV이다.

[0075] 재조합 항체는 파아지 디스플레이 또는 리보솜 디스플레이와 같은 다양한 시스템을 사용하여 동정될 수 있다. 파아지 디스플레이의 출발점은 일반적으로 파아지에 의해 발현되는 단일쇄 항체 또는 천연적으로 존재하는 항체의 단편과 같은 항체 라이브러리이다. 다양한 상이한 종류의 파아지는 파아지 디스플레이에 사용하기 위해 적합하고, 예를 들어, M13, fd 필라멘트 파아지, T4, T7 또는 λ 파아지가 있다. 파아지미드는 또한 사용될 수 있지만 이것은 일반적으로 헬퍼 파아지의 사용을 요구한다. 전형적으로, 상기 라이브러리는 10⁷ 내지 10¹⁵의 범위에서, 예를 들어, 10⁹ 내지 10¹¹의 상이한 파아지를 포함한다. 항체는 순수 또는 면역 기원일 수 있다. 라이브러리의 항체는 표면 상에 디스플레이를 확실히 제공하기 위해 파아지 코트 단백질 (예를 들어, g3p 또는 g8p)에 융합될 수 있다. 따라서, 상기 항체 (단편)는 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있고 상기 핵산 서열은 적합한 프로모터에 작동적으로 연결된 파아지 코트 단백질을 암호화하는 핵산의 업스트림 또는 다운스트림에 클로닝된다.

[0076] 항체를 암호화하고, 예를 들어, 항체 가변 도메인을 암호화하는 게놈 정보는 V_H 및 V_L 유전자 분절을 증폭시키기 위한 재조합 DNA 기술을 사용하고 적당한 파아지로 클로닝하여 비-면역화되거나 면역화된 공여자의 B 세포로부터 수득될 수 있다. 합성 라이브러리는 시험관내에서 V_H 및 V_L 유전자 분절을 재배열하고/하거나 인공 서열을 V_H 및 V_L 유전자 분절로 도입함에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 합성 라이브러리는 V_H 및 V_L 유전자 골격을 사용하지만 상기 인공 상보성 결정 영역 (CDR)으로 도입하여 제조될 수 있고 상기 상보성 결정 영역은 무작위 올리고뉴클레오타이드에 의해 암호화될 수 있다. 상기 라이브러리는 또한 상이한 라이브러리일 수 있고 이는 이어서 숙주 세포에서 조합된다. 따라서, 하나의 라이브러리는 중쇄 Fv 단편 또는 Fab 단편 또는 V_H 및 다른 경쇄 서열, 예를 들어, 경쇄 Fv 단편 또는 Fab 단편 V_L과 같은 중쇄 서열을 포함할 수 있다. 전형적으로 여러 라운드의 선택, 예를 들어, 2 내지 5회, 예를 들어, 2 내지 3회 수행된다. 이것은 항원을 고정화시키고, 상기 항원을 상기 파아지와 접촉시키고 상기 결합된 파아지를 단리시킴에 의해 수행될 수 있다. 상기 항원은 임의의 적합한 고체 표면, 예를 들어, 플라스틱 표면, 비드 (예를 들어, 자기 비드), 칼럼 중 수지 상에 고정화될 수 있거나, 이것은 세포 표면 상에 발현될 수 있다.

[0077] 단일쇄 항체

[0078] 천연적으로 존재하는 항체는 이중사량체이다. 그러나, 본원에 정의된 바와 같은 항체는 또한 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 단일 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 항체는 또한 "단일쇄 항체"로서 언급된다. 따라서, 상기 항체는 또한 단일쇄 항체일 수 있다. 단일쇄 항체는 Fv 단편의 2개의 도메인, V_L 및 V_H을 포함할 수 있다. 상기 단일쇄 항체를 수득하기 위해, V_L 및 V_H를 암호화하는 유전자는 재조합 방법을 사용하여 연결될 수 있다.

일반적으로 이들은 합성 링커, 예를 들어, 5 내지 100개의 링커, 예를 들어, 5 내지 50개의 링커, 예를 들어 25 개 아미노산의 링커에 의해 분리된다. 상기 링커는 V_H 의 N-말단을 V_L 의 C-말단으로 또는 그 반대로 연결할 수 있다. 이것은 단일 단백질 쇄의 제조를 가능하게 하고, 여기서, V_L 및 V_H 영역은 쌍을 이루어 1가 항체 유사 분자 (또한, 단일쇄 항체 또는 단일쇄 Fv (scFv)로서 공지됨; 문헌참조: 예를 들어, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)를 형성한다.

[0079] 단일쇄 항체는 또한 2가 항체, 예를 들어, 2개의 V_H 및 2개의 V_L 영역 (이들은 2개씩 링커에 의해 연결될 수 있다)을 포함하는 단일 펩타이드 쇄일 수 있다. 상기 단일쇄 항체는 또한 다가 항체, 예를 들어, 다중 V_H 및 다중 V_L 영역 (이것은 2개씩 링커에 의해 연결될 수 있다)을 포함하는 단일 펩타이드 쇄일 수 있다. V_H 및 V_L 영역은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 단일특이적 또는 이중특이적 항체를 생성한다. 상기 V_H 및 상기 V_L 은 천연적으로 존재하는 V_H 또는 V_L , 또는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함하는 합성 V_H 및 V_L 일 수 있다. 바람직하게 상기 V_H 및 V_L 은 천연적으로 존재하는 V_H 및 V_L 이다.

[0080] 본원에 기재된 화합물은 모노클로날 또는 폴리클로날 항체일 수 있다. 상기 항체는 항체 제조를 위해 적합한 당 업계에 공지된 임의의 유기체, 예를 들어, 생선 유기체, 예를 들어, 마우스, 양, 토끼 또는 세포 배양물, 예를 들어, 세균 세포, 효소 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포주, 예를 들어, CHO 세포로부터 기원할 수 있다. 상기 항체는 인간화될 수 있다. 바람직하게 항체는 쥐 모노클로날 항체이다.

[0081] 또한, 본 발명의 범위 내에 항체의 결합 단편을 포함하는 기능성 증가물이 있다. 상기 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편, 예를 들어, ScFv로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 상기 기능성 증가물은 또한 단일쇄 항체일 수 있다. 다른 구현에는 상기 상세히 기재된 바와 같은 PCSK9의 HSPG 결합 도메인에 결합하는 항체의 결합 단편을 포함하거나 이들로 이루어진 기능성 증가물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 기능성 증가물은 추가로 예를 들어, 항체 단편의 반감기, 안정성, 생체이용률, 용해도 또는 다른 관련 특성을 증가시킬 수 있는 가공된 (engineered) 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 가공된 도메인내 (intradomain) 설파이드 결합은 항체를 안정화시킬 수 있는 것으로 당업계에 공지되어 있다 (문헌참조: Wozniak-Knopp *et al.* 2012). 안정화의 다른 방법은 예를 들어, V_H 와 V_L 도메인 사이에 펩타이드 링커를 사용하여 Fv 단편을 안정화시킴을 포함한다 (문헌참조: Reiter *et al.*, 1994).

[0082] 기능성 증가물은 또한 항체 모사체 또는 항체를 모사하는 소형 분자일 수 있다. 항체 모사체는 유기 화합물이고, 이는 항원에 특이적으로 결합할 수 있지만 구조적으로 항체와 관련되지 않는 핵산을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들은 일반적으로 인공 펩타이드 또는 단백질이고, 전형적으로 약 3 내지 20 kDa의 몰 질량을 갖는다. 일부 유형은 항체-유사 β -쉬트 구조를 갖는다. 항체 모사체는 때때로 보다 우수한 용해도, 조직 침투, 항체와 비교하여 열 및 효소에 대한 안정성, 및 비교적 낮은 제조 비용을 나타낸다.

[0083] 따라서 PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 167 중 적어도 하나, 예를 들어, PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 167 중 적어도 2개, 예를 들어, 적어도 5개, 예를 들어, 적어도 10개, 예를 들어, 적어도 15개, 예를 들어, 적어도 20개, 예를 들어, 적어도 25개, 예를 들어, 적어도 30개, 예를 들어, 적어도 35개, 예를 들어, 적어도 40개, 예를 들어, 적어도 45개, 예를 들어, 적어도 50개, 예를 들어, 적어도 55개, 예를 들어, 적어도 60개, 예를 들어, 적어도 65개, 예를 들어, 적어도 70개, 예를 들어, 적어도 75개, 예를 들어, 적어도 80개, 예를 들어, 적어도 85개, 예를 들어, 모든 아미노산 잔기를 포함하는 PCSK9 (서열번호 1)의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 구조적으로 인지하고 이에 결합하는 항체 또는 이의 기능성 증가물이 제공된다.

[0084] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 92 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 93 내지 97 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 98 내지 103 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 104 내지 105 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 106 내지 135 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 136 내지 139 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 140 내지 164 중 적어도 하나, 예를 들어, 아미노산 잔기 165 내지 167 중 적어도 하나를 포함하는 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다.

[0085] 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9 (서열번호 1)의 아미노산 잔기 78 내지 92, 예를 들어, 아미노산 잔기 93 내지 97, 예를 들어, 아미노산 잔기 98 내지 103, 예를 들어, 아미노산 잔기 104 내지 105, 예를 들어, 아미노산 잔기 106 내지 135, 예를 들어, 아미노산 잔기 136 내지 139, 예를 들어, 아미노산

잔기 140 내지 164, 예를 들어, 아미노산 잔기 165 내지 167 중 적어도 하나를 포함하는 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다.

[0086] 따라서 하나의 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 78 내지 167을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프에 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 78 내지 95를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 96 내지 100을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 101 내지 105를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 106 내지 110을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 111 내지 115를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 116 내지 120을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 121 내지 125를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 126 내지 130을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 131 내지 135를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 136 내지 140을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 141 내지 145를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 146 내지 150을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 151 내지 155를 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 156 내지 160을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 아미노산 잔기 161 내지 167을 포함하는 PCSK9의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합한다.

[0087] 따라서, PCSK9 (서열번호 1)의 R93, R96, R97, R104, R105, K136, H139, R165 및 R167로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산, 예를 들어, 하나의 아미노산, 예를 들어, 2개의 아미노산, 예를 들어, 3개의 아미노산, 예를 들어, 4개의 아미노산, 예를 들어, 5개의 아미노산, 예를 들어, 6개의 아미노산, 예를 들어, 7개의 아미노산, 예를 들어, 8개의 아미노산, 예를 들어, PCSK9의 R93, R96, R97, R104, R105, K136, H139, R165 및 R167로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 모든 아미노산에 결합하는 항체 또는 이의 기능성 증가물이 제공된다.

[0088] 따라서, 하나의 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R93에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R96에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9의 R97에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R104에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R105에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 K136에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 H139에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R165에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R167에 결합한다.

[0089] 하나의 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R96 및 R97에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R104 및 R105에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 K136 및 H139에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R93 및 H139에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R93, R104, R105 및 H139에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R165 및 R167에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 PCSK9의 R93, R96, R97, R104, R105 및 H139에 결합한다.

[0090] 특정 구현예에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 하나의 구현예에서, 항체는 쥐 모노클로날 항체이다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 인간화되었다. 항체는 단일쇄 항체일 수 있다.

- [0091] 일부 구현예에서, 항체는 이특이적 항체이다. 하나의 구현예에서, 상기 이특이적 항체는 상기 상세히 기재된 바와 같이 PCSK9의 HSPG 결합 부위를 인지하고 결합할 수 있지만 또한 PCSK9의 LDLR 결합 부위에 결합하고 이를 인지하여 상기 항체의 PCSK9로의 결합은 HSPG 및 LDLR의 PCSK9로의 결합을 억제할 수 있다. 이론에 국한되는 것 없이, LDLR 결합 부위는 PCSK9 (서열번호 1)의 잔기 194 (A194)를 포함하고 잔기 367 내지 381, 특히 P379를 포함하는 도메인을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 화합물은 상기된 바와 같이 PCSK9의 HSPG 결합 부위를 결합할 수 있고 LDLR 결합 도메인의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 결합할 수 있는 이특이적 항체이고, 여기서, LDLR 결합 도메인의 적어도 하나의 아미노산 잔기는 서열번호 1의 잔기 194이거나 서열번호 1의 잔기 367 내지 381을 포함하는 도메인 내에 포함된다.
- [0092] 일부 구현예에서, 상기 항체는 PCSK9의 LDLR-결합 도메인에 결합할 수 없다.
- [0093] 따라서, 또한 하기를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 기재되어 있다:
- [0094] (i) 서열번호 10, 서열번호 11 또는 서열번호 12에 의해 정의된 바와 같은 3개의 CDR 중 적어도 하나를 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전, 및
- [0095] (ii) 서열번호 13, 서열번호 14 또는 서열번호 15에 의해 정의된 바와 같은 3개의 CDR 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전.
- [0096] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 중 하나, 및 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전 중 하나를 포함한다.
- [0097] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 중 하나, 및 CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 14) 또는 CDR3 (서열번호 15) 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0098] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 중 하나, 및 CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 14) 또는 CDR3 (서열번호 15) 중 적어도 2개를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0099] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 중 하나, 및 CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 14) 및 CDR3 (서열번호 15) 모두를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0100] 일부 구현예에서, 상기 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 중 2개, 및 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0101] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 중 2개, 및 CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 14) 또는 CDR3 (서열번호 15) 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0102] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 중 2개, 및 CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 14) 또는 CDR3 (서열번호 15) 중 적어도 2개를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0103] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 중 2개, 및 CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 14) 및 CDR3 (서열번호 15) 모두를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0104] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 모두, 및 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0105] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 모두, 및 CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 14) 또는 CDR3 (서열번호 15) 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0106] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 모두, 및 CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 14) 또는 CDR3 (서열번호 15) 중 적어도 2개를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.

- [0107] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 모두, 및 CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 14) 및 CDR3 (서열번호 15) 모두를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0108] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 7에 의해 정의된 바와 같은 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전 및/또는 서열번호 5에 의해 정의된 바와 같은 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0109] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0110] (i) 서열번호 16, 서열번호 17 또는 서열번호 18에 의해 정의된 바와 같은 3개의 CDR 중 적어도 하나를 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전, 및
- [0111] (ii) 서열번호 19, 서열번호 20 또는 서열번호 21에 의해 정의된 바와 같은 3개의 CDR 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전.
- [0112] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 중 하나, 및 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0113] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 중 하나, 및 CDR1 (서열번호 19), CDR2 (서열번호 20) 또는 CDR3 (서열번호 21) 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0114] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 중 하나, 및 CDR1 (서열번호 19), CDR2 (서열번호 20) 또는 CDR3 (서열번호 21) 중 적어도 2개를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0115] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 중 하나, 및 CDR1 (서열번호 19), CDR2 (서열번호 20) 및 CDR3 (서열번호 21) 모두를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0116] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 10), CDR2 (서열번호 11) 및 CDR3 (서열번호 12) 중 2개, 및 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0117] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 중 2개, 및 CDR1 (서열번호 19), CDR2 (서열번호 20) 또는 CDR3 (서열번호 21) 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0118] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 중 2개, 및 CDR1 (서열번호 19), CDR2 (서열번호 20) 또는 CDR3 (서열번호 21) 중 적어도 2개를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0119] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 중 2개, 및 CDR1 (서열번호 19), CDR2 (서열번호 20) 및 CDR3 (서열번호 21) 모두를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0120] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 모두, 및 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0121] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 모두, 및 CDR1 (서열번호 19), CDR2 (서열번호 20) 또는 CDR3 (서열번호 21) 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0122] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 모두, 및 CDR1 (서열번호 19), CDR2 (서열번호 20) 또는 CDR3 (서열번호 21) 중 적어도 2개를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0123] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18) 모두, 및 CDR1 (서열번호 19), CDR2 (서열번호 20) 및 CDR3 (서열번호 21) 모두를 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.

- [0124] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 9에 의해 정의된 바와 같은 중쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전 및/또는 서열번호 3에 의해 정의된 바와 같은 경쇄 가변 영역 또는 이의 인간화된 버전을 포함한다.
- [0125] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물은 항체 변이체이다. 상기 변이체는 반감기, 용해도 및/또는 생체이용률을 증가시키기 위해 변형된 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 기능성 증가물은 PCSK9 (서열번호 1)의 HSPG 결합부위에 결합할 수 있는 항체의 단편을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 상기 변이체는 가공된 도메인내 디설파이드 결합을 포함할 수 있다.
- [0126] 항체 또는 이의 기능성 증가물은 도메인 서플링에 의해 획득될 수 있다. 도메인 서플링은 예를 들어, 통상의 클로닝에 의해 또는 리가제-독립적 방법에 의해, 예를 들어, 우라실-특이적 절단 시약 (USER) 클로닝 및 융합에 의해 당업계에서 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다 (문헌참조: Nour-Eldin et al., 2010; Villiers et al., 2010).
- [0127] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 증가물의 하나 이상의 Fv 단편은 V_H와 V_L 도메인 사이에 펩타이드 링커를 포함한다.
- [0128] LDLR 및 LDL-C 수준
- [0129] 본원에 기재된 화합물의 PCSK9로의 결합은 상기 화합물의 부재하의 결합과 비교하여 PCSK9의 LDLR로의 결합을 감소시킨다. 이것은 이어서 상기 화합물의 부재하의 수준과 비교하여, 예를 들어, 이들의 표면 상에 LDLR-발현 세포주, 예를 들어, 간세포-유래된 세포주로부터 유래된 세포의 LDLR의 수준을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 상기 화합물은 항체이고 PCSK9로의 이의 결합은 상기 항체의 부재하의 결합과 비교하여 PCSK9의 LDLR로의 결합을 감소시킨다. 이것은 이어서 상기 항체의 부재하의 수준과 비교하여 간세포-유래된 세포주와 같은 LDLR-발현 세포주로부터 유래된 세포의 LDLR의 수준을 증가시킨다.
- [0130] 따라서, 일부 구현예에서, 상기 화합물의 PCSK9로의 결합은 상기 화합물의 부재하의 수준과 비교하여 간세포-유래된 세포주와 같은 LDLR-발현 세포주로부터 유래된 세포의 LDLR의 수준을 증가시킨다. 특정 구현예에서, 상기 화합물은 상기 정의된 바와 같은 항체이고 상기 항체의 PCSK9로의 결합은 상기 항체의 부재하의 수준과 비교하여 간세포-유래된 세포주와 같은 LDLR-발현 세포주로부터 유래된 세포의 LDLR 수준을 증가시킨다.
- [0131] 일부 구현예에서, 상기 화합물의 PCSK9로의 결합은 상기 화합물의 부재하의 감소와 비교하여 LDLR의 리소좀 분해를 감소시킨다. 특정 구현예에서, 상기 화합물은 상기된 바와 같은 항체이고 상기 항체의 PCSK9로의 결합은 상기 항체의 부재하의 분해와 비교하여 LDLR의 리소좀 분해를 감소시킨다.
- [0132] 일부 구현예에서, 상기 화합물의 PCSK9로의 결합은 상기 화합물의 부재하의 수준과 비교하여 LDL-C의 혈장 수준을 감소시킨다. 용어 '혈장 LDL-C 수준'은 혈장에서 LDL-C의 수준, 즉, LDL-C 단백질의 양을 언급하는 것으로 이해된다. 특정 구현예에서, 상기 화합물은 상기 정의된 바와 같은 항체이고 항체의 PCSK9로의 결합은 상기 항체의 부재하의 수준과 비교하여 LDL-C의 혈장 수준을 감소시킨다.
- [0133] LDL-C의 혈장 수준은 생체내 또는 시험관내에서 결정될 수 있다. LDL-C의 혈장 수준을 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있고 웨스턴 블롯, 면역-염색, ELISA, 초원심분리, 신속 단백질 액체 크로마토그래피 (FPLC) 및 전기영동 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0134] 본원에 기재된 화합물은 혈청에서 안정한 항체일 수 있다.
- [0135] 본원에서 또한 특히 투여 후 비독성인 상기 정의된 화합물이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 화합물은 투여 후 비독성인 항체이다.
- [0136] 일부 구현예에서, 상기 화합물은 PCSK9, 또는 스타틴의 LDLR-결합 부위로 결합하는 항체와 같은 항-PCSK9 항체와 같은 또 다른 화합물과 조합하여 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 화합물은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항체와 함께 투여된다: 로텔시주맙, 알판시주맙, 알리로쿠맙, 에블로쿠맙 및 보코시주맙.
- [0137] 따라서, 본원에서 이를 필요로 하는 대상체에서 혈장 LDL-C 수준을 감소시키기 위한 방법이 제공되고, 상기 방법은 상기 대상체에게 본원에 정의된 바와 같은 화합물 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 혈장 LDL-C 수준은 상기된 바와 같이 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 생체내 또는 시험관내 결정될 수 있다.

[0138] 헤파린 유사체 및 헤파린 모사체

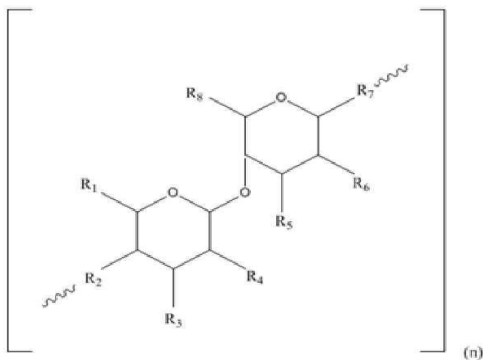
[0139] 일부 구현예에서, HSPG의 PCSK9로의 결합을 억제할 수 있는 화합물은 헤파린 유사체 또는 헤파린 모사체이다. 문헌 [참조: 예를 들어, R. Lever et al. (eds.), Heparin - A Century of Progress, Handbook of Experimental Pharmacology 207, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012]을 참조하고, 본원에서 참조로 인용된다.

[0140] 헤파린 유사체 또는 헤파린 모사체는 HSPG의 경쟁적 길항제, 경쟁하지 않는 길항제, 비-경쟁적 길항제, 사일런트 길항제, 부분적 효능제 또는 역 효능제일 수 있다.

[0141] 일부 구현예에서, 상기 화합물은 헤파린이다. 다른 구현예에서, 헤파린 유사체 또는 헤파린 모사체는 펩타이드이다.

[0142] 일부 구현예에서, 헤파린 유사체 또는 헤파린 모사체는 헤파린의 PCSK9로의 결합을 억제할 수 있다. 상기 헤파린 유사체 또는 헤파린 모사체는 본원에서 정의된 바와 같은 PCSK9의 임의의 아미노산 잔기에 결합할 수 있다.

[0143] 상기 화합물, 상기 헤파린 유사체 또는 헤파린 모사체는 하기 화학식 I의 일반 구조를 가질 수 있다:



[0144]

상기식에서,

[0146] - R₁은 COOH 및 -O₃SO로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

[0147] - R₂, R₃, R₅ 및 R₇은 O 및 OH로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

[0148] - R₄는 설페이트 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

[0149] - R₆은 설페메이트 그룹, OH 및 O로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

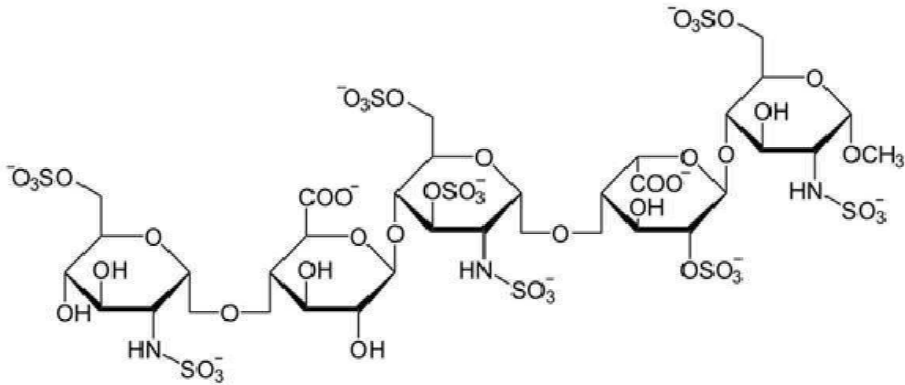
[0150] - R₈은 설페이트 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

[0151] - n은 1 이상의 정수이고,

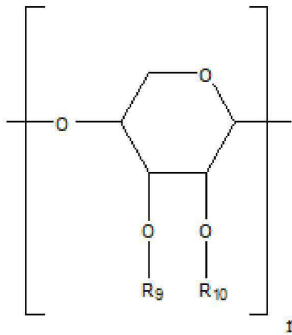
[0152] 여기서, R₂ 및/또는 R₇은 임의로 단량체 유닛을 연결하는 링커로서 작용할 수 있다.

[0153] 하나의 구현예에서, 헤파린 유사체 또는 모사체는

[0154] a) 폰다파리누스 (Fondaparinux) (Arixtra™) (하기 화학식을 갖는다):

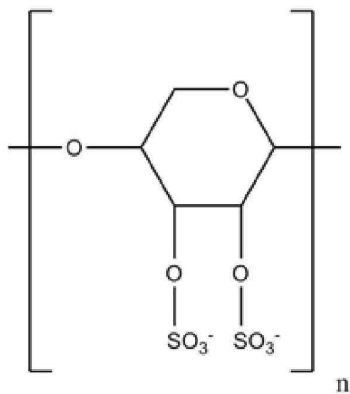


[0155] b) 달테파린 나트륨 또는 틴자파린 나트륨과 같은 저분자량의 헤파린; 및
 [0156] c) 화학식 II의 화합물:



[0158] 여기서, R₉ 및 R₁₀은 독립적으로 H, COOH, -O₃SO, O, OH, 설페이트 및 설페메이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되고 여기서, n은 1 이상의 정수이다.

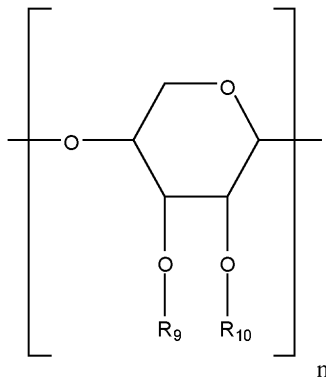
[0160] 하나의 구현예에서, 화학식 II의 화합물은 펜토산이고 하기 화학식을 갖는다:



[0161] 여기서, n은 1 이상의 정수이다.

[0162] 하나의 구현예에서, 상기 화합물은 저분자량의 헤파린이다. 특정 구현예에서, 저분자량의 헤파린은 달테파린 나트륨 (상표명 fragmin)이다. 또 다른 구현예에서, 저분자량의 헤파린은 틴자파린 나트륨 (상표명 Innohep™)이다.

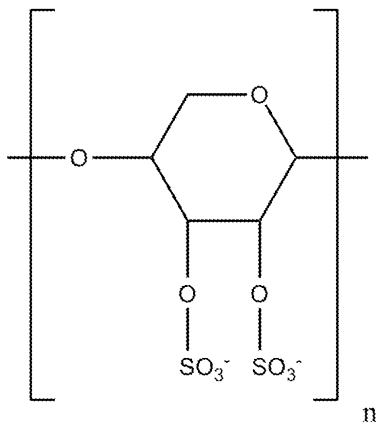
[0164] 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 화학식 II의 화합물이다:



[0165]

[0166] 여기서, R₉ 및 R₁₀은 독립적으로 H, COOH, -O₃SO, O, OH, 설페이트 및 설파메이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서, n은 1 이상의 정수이다.

[0167] 하나의 구현예에서, 화학식 II의 화합물은 펜토산이고 하기 화학식을 갖는다:

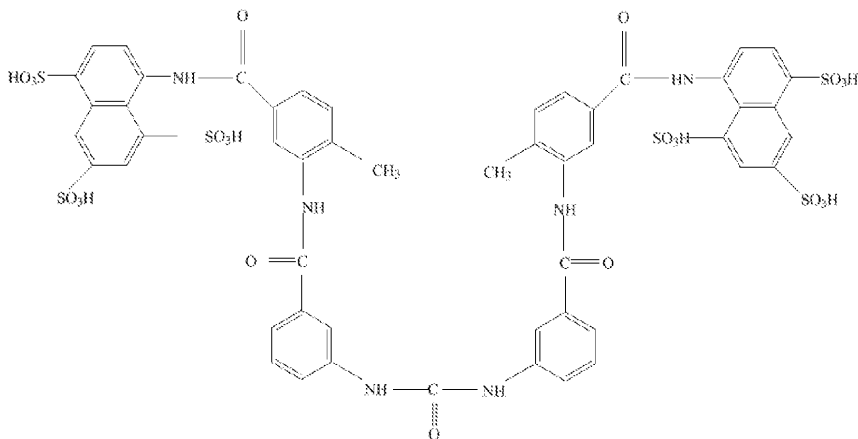


[0168]

[0169] 여기서, n은 1 이상의 정수이다.

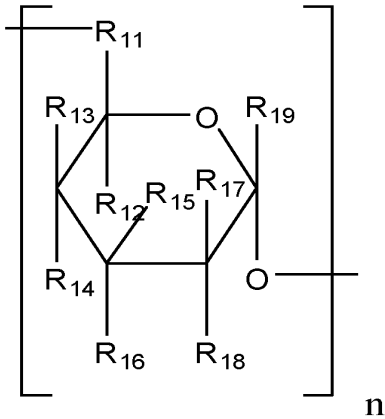
[0170] 일부 구현예에서, 상기 화합물은 수라민이다.

[0171] 수라민은 하기 화학식을 갖는다:



[0172]

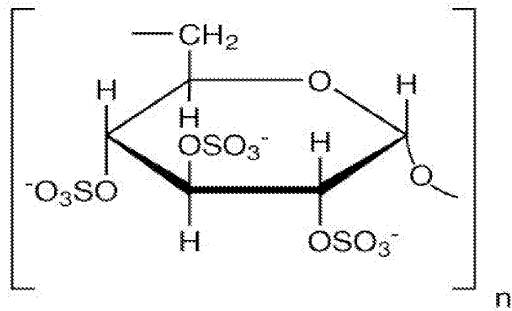
[0173] 특정 구현예에서, 상기 화합물은 화학식 III의 화합물이다:



[0174]

[0175] 여기서, R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₁₄, R₁₅, R₁₆, R₁₇, R₁₈, 및 R₁₉는 독립적으로 COOH, -O₃SO, O, OH, 설페이트 및 설페이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, n은 1 이상의 정수이고, 여기서, R₁₄는 임의로 단량체 유닛을 연결하는 링 커로서 작용할 수 있다.

[0176] 하나의 구현예에서, 화학식 III의 화합물은 텍스트란 설페이트이고 하기 화학식을 갖는다:

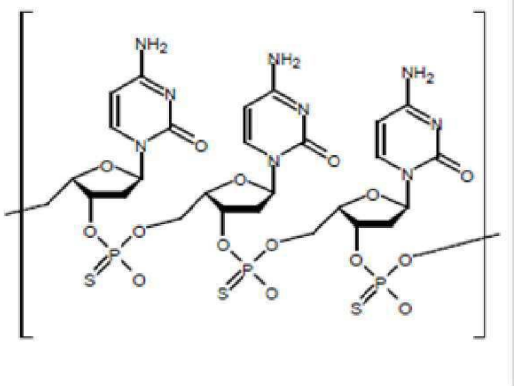


[0177]

[0178] 여기서, n은 1 이상의 정수이다.

[0179] 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 S-dNn이고, 여기서, N은 임의의 뉴클레오타이드이고 여기서, n은 상기 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에서 포스포로티오에이트 연결체의 수이다. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 헤파린 모사체로서 작용하고 bFGF와 같은 헤파린 결합 단백질에 결합하는 것으로 공지되어 있다 (문헌참조: Benimetskaya et al., 1995). 이들의 다가음이온 골격은 이들이 헤파린, 텍스트란 설페이트 및 펜토산과 유사하게 한다. 일부 구현예에서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 S-dCn이다. 다른 구현예에서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 S-dAn이다. 다른 구현예에서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 S-dGn이다. 다른 구현예에서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 S-DTn이다. 다른 구현예에서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 임의의 뉴클레오타이드는 독립적으로 A, T, G 및 C로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0180] S-dCn (여기서, n은 정수이다)의 일반 구조이고 뉴클레오타이드는 하기 화학식으로 나타낸다:



[0181]

[0182] 바람직하게, n은 12 내지 60이다. 따라서 일부 구현예에서, n은 15 내지 55, 예를 들어, 20 내지 50, 예를 들어, 25 내지 45, 예를 들어, 30 내지 40, 예를 들어, 36이다.

[0183] 정상적으로, S-올리고뉴클레오타이드는 이들의 서열이 표적 mRNA에 상보적이고 따라서 상기 표적 mRNA의 분해가 유도되도록 디자인된다. 특정 이론에 국한되는 것 없이, 본원 발명자들은 본원의 개시내용과 관련하여 포스포티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 대한 중요한 기작이 다양한 단백질에 비특이적으로 결합하는 능력인 것으로 믿는다 (문헌참조: 예를 들어, Yabukov et al., 1993; Stein et al. 1995). 따라서, 일부 구현예에서, 상기 포스포티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 거의 어떠한 안티센스 활성을 갖지 않고; 대신, 이들은 본원에 기재된 바와 같이 PCSK9의 임의의 아미노산 잔기와는 무관하게 뉴클레오타이드 서열에 결합한다. 당업자는 안티센스 활성을 나타내지 않는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 상기 포스포티오에이트 올리고뉴클레오타이드를 수득하기 위해 S-올리고뉴클레오타이드의 디자인을 최적화시키는 방법을 알고 있다.

[0184] 올리고뉴클레오타이드의 길이 및 특히 포스포티오에이트 연결체의 수는 포스포티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 헤파린 모사체 활성에 영향을 주지만, S-올리고뉴클레오타이드 내 뉴클레오타이드 서열이 필수적으로 헤파린 모사체 활성에 대해 어떠한 영향을 미치지 않는 것으로 나타난다. 따라서, 임의의 서열은 S-올리고뉴클레오타이드 내 포스포티오에이트의 길이 및 이의 수가 당업계에 통상적인 것과 같이 최적화되는 한 사용될 수 있다.

[0185] 포스포티오에이트 올리고뉴클레오타이드를 합성하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 비제한적인 예로서, 하나의 방법은 이황화탄소 중 요소 황의 용액의 인산수소에 대한 작용을 포함하고, 또 다른 것은 테트라에틸티우람 디설파이드 (TETD) 또는 3H-1,2-벤조디티올-3-온 1,1-디옥사이드 (BDTD)로 포스포이트 트리에스테르를 황화시킴을 포함한다.

[0186] 포스포티오에이트 연결체는 고유적으로 키랄이다. 상기 황화 방법은 각각의 삽입 부위에서 이성체의 혼합물을 생성시키고 길이 n의 올리고에 대해 2n-1 이성체를 수득한다. 이론에 국한되는 것 없이, 임의의 표준 S-올리고뉴클레오타이드 제제 중에 이성체 혼합물은 올리고뉴클레오타이드의 활성에 영향을 주지 않는 것으로 나타난다. 하나의 구현예에서, S-올리고뉴클레오타이드는 이성체 혼합물이다. 또 다른 구현예에서, S-올리고뉴클레오타이드는 하나의 이성체 형태로서 제공된다.

[0187] 올리고뉴클레오타이드가 분해에 내성이 되도록 하기 위해, 포스포티오에이트 연결체는 올리고뉴클레오타이드 전반에 걸쳐 존재하지 않아야 한다. 당업자는 포스포티오에이트 연결체의 수가 조정될 수 있는 방법을 알고 있다.

[0188] 지질 단백질 대사의 장애

[0189] 본원에서 또한 약제로서 사용하기 위한 상기 정의된 바와 같은 화합물이 제공된다.

[0190] 본원에 기재된 화합물은 지질단백질 대사의 장애를 치료하기 위해 유용하다. 따라서 본원에서 지질단백질 대사 장애의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 바와 같은 화합물의 용도 또한 제공된다. 또한, 이를 필요로 하는 대상체에서 지질단백질 대사 장애의 치료 방법에 사용하기 위한 상기 정의된 바와 같은 화합물이 기재되어 있다. PCSK9의 서열은 대상체 마다 다양할 수 있고, 예를 들어, 보존적 치환을 유도할 수 있는 개체 특이적 SNP는 일부 개체에서 발견될 수 있다. HSPG의 상기 PCSK9 변이체로의 결합을 억제하는 화합물은 또한 본

발명의 범위 내에 있는 것으로 이해된다.

- [0191] 지질단백질 대사 장애는 지질 항상성 장애 및 이와 관련된 장애이고 예를 들어, 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 고트리글리세라이드혈증, 시토스테롤혈증, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상 심장 질환, 대사적 증후군, 급성 관상 증후군, 황색종, 고혈압, 협심증, 비만, 당뇨병 및 혈관 염증을 포함한다. 상기 장애는 예를 들어, 다양한 유형의 지질단백질을 인지하는 세포 수용체에서 또는 지방을 분해하는 효소에서 지질단백질 입자의 구조적 단백질 내 결합에 의해 유발될 수 있다. 상기 결합의 결과로서, 지질은 혈관의 벽에 침적될 수 있다.
- [0192] 고콜레스테롤혈증 (또는 지질이상혈증)은 혈액 중에 고수준의 콜레스테롤의 존재이다. 이것은 고지질혈증 (혈액 중 상승된 수준의 지질) 및 고지질단백질혈증(혈액 중 상승된 수준의 지질단백질)의 형태이다.
- [0193] 고트리글리세라이드혈증은 고혈액 수준의 트리글리세라이드를 지칭한다. 상승된 수준의 트리글리세라이드는 심지어 고콜레스테롤혈증의 부재하에서도 죽상동맥경화증과 관련되고 심혈관 질환 성향을 갖게 한다. 매우 높은 트리글리세라이드 수준은 또한 급성 체장염 위험을 증가시킨다.
- [0194] 시토스테롤혈증 또는 피토스테롤혈증은 고흡착, 및 예를 들어, 고콜레스테롤혈증, 건 및 결절상 황색종, 죽상동맥경화증의 미성숙 발병을 유도하는 식이 스테롤의 감소된 담즙 분비를 특징으로 하는 희귀 상염색체 퇴보 유래된 지질 대사 장애이다.
- [0195] 죽상동맥경화증 (또한 죽상동맥경화성 혈관 질환 또는 ASVD로서 공지된)은 특정 형태의 죽상동맥경화증이고 여기서, 동맥 벽은 생존 활성 백혈구 세포 (염증을 생성하는) 및 나머지 콜레스테롤 및 트리글리세라이드를 포함하는 죽은 세포 둘 다를 함유하는, 백혈구 세포의 침입 및 축적의 결과로서 두터워 진다. 죽상동맥경화증은 따라서 동맥의 벽에 백혈구 세포의 만성 염증 반응으로 인해 동맥 혈관에 영향을 주는 증후군이다.
- [0196] 죽상동맥경화증은 동맥 벽의 비후, 경화 및 탄력 상실을 포함하는 병태이다.
- [0197] 죽상동맥경화성 동맥 질환, 죽상동맥경화성 심혈관 질환, 관상 심장 질환 또는 허혈 심장 질환으로도 공지된 관상 심장 질환은 가장 흔한 유형의 심장 질환이고 심장 마비의 원인이다. 상기 질환은 동맥 루멘을 좁히고 혈류를 심장으로 감소시키는 심장 동맥 내부벽을 따라 증강되는 플라크에 의해 유발된다.
- [0198] 대사 증후군은 하기의 의약 병태의 5개 중 3개의 동시 존재에 의해 진단되는 에너지 활용 및 저장 장애이다: 복부 (중양) 비만, 상승된 혈압, 상승된 단식 혈장 글루코스, 높은 혈청 트리글리세라이드, 및 낮은 고밀도 콜레스테롤 수준. 대사적 증후군은 심혈관 질환, 특히 심부전증 및 당뇨병을 발병할 위험성을 증가시킨다. 대사 증후군은 또한 대사 증후군 X, 심장대사 증후군, 증후군 X, 인슐린 내성 증후군, 레아븐 (Reaven) 증후군 및 CHAOS (오스트레일리아에서)로서 공지된다. 대사 증후군 및 전당뇨병은 단지 상이한 세트의 바이오마커에 의해 진단된 동일한 장애인 것으로 나타난다.
- [0199] 급성 관상 증후군은 관상 동맥에서 감소된 혈류로 인해 심장 근육의 일부가 적당히 기능할 수 없거나 죽어버리는 병태 그룹을 언급한다.
- [0200] 황색종은 지질이 피부 내 대형 거품 세포에 축적되어 있는 지방증의 피부 증상이다. 황색종은 고지질혈증과 관련된다.
- [0201] 고혈압, 또는 때로는 동맥 고혈압으로 불리는 높은 혈압은 동맥내 혈압이 상승된 만성 의학적 병태이다.
- [0202] 협심증 (angina pectoris) (또는 협심증 (angina))은 흔히 관상동맥의 폐쇄 또는 스페즘으로부터의 심장 근육의 허혈로 인해 흉통, 압박 또는 스퀴징의 감각을 언급한다. 협심증은 빈혈, 심장부정맥 및 심부전증으로부터 유발할 수 있고 이의 주요 원인은 관상 동맥 질환이다.
- [0203] 비만은 과도한 체지방이 이것이 건강에 부정적 영향을 미쳐 감소된 수명 및/또는 증가된 건강 문제, 예를 들어, 심장 질환, 2형 당뇨병, 폐쇄성 수면 무호흡증, 특정 유형의 암 및 골관절염의 증가된 위험을 유도하는 정도로 축적되는 의학적 병태이다.
- [0204] 통상적으로 당뇨병으로 언급되는 진성 당뇨병은 장기간 동안 높은 혈당 수준을 나타내는 대사적 질환 그룹이다. 여러 유형의 당뇨병이 존재하고 I형 당뇨병, II형 당뇨병 및 임신기간의 당뇨병을 포함한다. I형 당뇨병은 체장에서 랑게르한스섬의 인슐린-생성 베타 세포가 상실되어 인슐린 결핍을 유도함을 특징으로 한다. 2형 당뇨병은 인슐린 내성을 특징으로 하고 이는 비교적 감소된 인슐린 분비와 조합될 수 있다. 인슐린에 대한 체조직의 결합적 반응은 인슐린 수용체가 관여하는 것으로 사료된다. 임신기간의 당뇨병은 2형 당뇨병과 유사하고 모든 임신의 약 2 내지 10 %에서 일어난다.

- [0205] 일부 구현예에서, 지질단백질 대사 장애는 비정상적 PCSK9 혈장 수준과 관련된다. 다른 구현예에서, 지질단백질 대사 장애는 간세포와 같은 LDLR-발현 세포의 표면에서 비정상적 LDLR 수준과 관련된다. 지질단백질 대사의 장애는 또한 간세포와 같은 LDLR-발현 세포의 표면에서 비정상적 PCSK9 혈장 수준 및 비정상적 LDLR 수준과 관련될 수 있다. PCSK9 혈장 수준은 인간에서 30 내지 3000 ng/ml로 다양하다. 비정상적 PCSK9 혈장 수준은 건강한 개체에서의 평균 수준과 상당히 상이한 PCSK9의 혈장 수준을 언급한다. 일부 구현예에서, 비정상적 PCSK9 혈장 수준은 건강한 개체에서 평균 수준보다 상당히 높다. 또한, 예를 들어, 간세포의 표면에서 비정상적 LDLR 수준은 건강한 개체에서 평균 수준과 상당히 상이한 LDLR 수준을 언급한다. 일부 구현예에서, 간세포와 같은 LDLR-발현 세포의 표면에서 비정상적 LDLR 수준은 건강한 개체에서 평균 수준보다 상당히 낮다.
- [0206] 일부 구현예에서, 상기 장애는 LDL-C의 비정상적 수준, 특히 LDL-C의 상승된 수준을 특징으로 한다.
- [0207] 지질단백질 대사 장애의 치료
- [0208] 지질단백질 대사 장애의 치료를 필요로 하는 개체 또는 대상체는 지질단백질 대사 장애를 앓거나 이를 앓고 있는 것으로 의심되거나 이의 위험에 처한 개체이다. 일부 구현예에서, 치료를 필요로 하는 개체는 포유동물, 바람직하게 인간이다.
- [0209] 바람직한 구현예에서, 지질단백질 대사 장애는 지질이상혈증, 고콜레스테롤 혈증 및 관상 심장 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 지질단백질 대사 장애는 관상 심장 질환이다.
- [0210] 일부 구현예에서, 상기 치료는 예방적이다.
- [0211] 일부 구현예에서, 상기 치료는 상기 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 상기 화합물은 체중 kg 당 0.1 mg 및 1000 mg의 하루 용량으로 투여될 수 있다. 따라서 일부 구현예에서, 상기 화합물은 체중 kg 당 0.1 mg 내지 1000 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 0.2 내지 900 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 0.3 내지 800 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 0.5 내지 700 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 1.0 내지 500 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 5 내지 400 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 10 내지 300 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 25 내지 250 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 50 내지 200 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 75 내지 150 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 100 내지 125 mg의 하루 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 화합물은 체중 kg 당 0.1 mg 내지 1000 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 0.1 내지 10 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 10 내지 25 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 25 내지 50 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 50 내지 100 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 100 내지 250 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 250 내지 500 mg, 체중 kg 당 500 내지 750 mg, 예를 들어, 체중 kg 당 750 내지 1000 mg의 하루 용량으로 투여된다.
- [0212] 또한 본원에 기재된 것은 이를 필요로 하는 개체에서 지질이상혈증, 고콜레스테롤혈증 및 심장 관상 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 지질단백질 대사 장애의 치료 방법이고, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0213] i. 상기 개체로부터 단리된 조직 샘플 또는 혈장 샘플을 제공하는 단계,
- [0214] ii. 상기 조직에서 LDLR의 수준 및/또는 상기 혈장 샘플에서 PCSK9의 수준 및/또는 LDL-C의 수준을 결정하는 단계,
- [0215] iii. 단계 ii)의 발현 수준을 대조군 조직 샘플 또는 대조군 혈장 샘플의 수준과 상호 관련시키는 단계,
- [0216] iv. 치료 용법을 평가하는 단계,
- [0217] v. 본원에 기재된 바와 같은 치료학적 유효량의 화합물을 포함하는 조성물을 상기 개체에게 투여하는 단계.
- [0218] 일부 구현예에서, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0219] i. 상기 개체로부터 단리된 조직 샘플을 제공하는 단계,
- [0220] ii. 상기 조직의 LDLR의 수준을 결정하는 단계,
- [0221] iii. 단계 ii)의 발현 수준을 대조군 조직 샘플의 수준과 서로 관련시키는 단계,
- [0222] iv. 치료 용법을 평가하는 단계,
- [0223] v. 본원에 기재된 바와 같은 치료학적 유효량의 화합물을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계.
- [0224] 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 치료학적 유효량의 화합물을 포함하는 조성물은 상기 조직의 세포의 표면에 LDLR의 수준이 비정상적인 경우 개체에게 투여된다. 일부 구현예에서, LDLR의 비정상적인 수

준은 LDLR의 감소된 수준이다. 일부 구현예에서, 상기 조직 샘플은 간세포와 같은 LDLR-발현 세포를 포함하고 상기 세포의 표면에서 LDLR의 수준이 측정된다.

- [0225] 다른 구현예에서, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0226] i. 상기 개체로부터 단리된 혈장 샘플을 제공하는 단계,
- [0227] ii. 상기 혈장 샘플에서 PCSK9의 수준 및/또는 LDL-C의 수준을 결정하는 단계,
- [0228] iii. 단계 ii)의 발현 수준을 대조군 혈장 샘플의 수준과 서로 관련시키는 단계,
- [0229] iv. 치료 용법을 평가하는 단계,
- [0230] v. 본원에 기재된 치료학적 유효량의 화합물을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계.
- [0231] 따라서 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 화합물을 포함하는 치료학적 유효량의 조성물은 혈장 샘플 중 LDL-C의 수준 및/또는 PCSK9의 수준이 비정상적인 경우 개체에게 투여된다. 일부 구현예에서, LDL-C의 비정상적인 수준은 LDL-C의 증가된 수준이다. 일부 구현예에서, 상기 조직 샘플은 간세포와 같은 LDLR-발현 세포를 포함하고 상기 세포의 표면에서 LDLR의 수준이 측정된다.
- [0232] 또한, 본원에 기재된 것은 LDLR의 분해를 억제하는 방법이고, 상기 방법은 본원에 정의된 바와 같은 화합물을 투여함을 포함한다. 특히, 상기 화합물은 상기 본원에 정의된 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물일 수 있다.
- [0233] 일부 구현예에서, 상기 화합물은 헤파린 유사체, 또는 폰다파리눅스와 같은 모사체이다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 펜토산이다. 여전히 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 수라민이다. 여전히 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 텍스트란 설페이트이다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 달테파린 나트륨 또는 틴자파린 나트륨과 같은 저분자량의 헤파린이다. 또 다른 구현예에서, 상기 화합물은 상기 본원에 정의된 바와 같은 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0234] 약제학적 조성물
- [0235] 또한 본원에 기재된 것은 본원에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 하나의 화합물을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 조성물은 2개 이상의 화합물, 예를 들어, 3개 이상의 화합물, 예를 들어, 4개 이상의 화합물, 예를 들어, 5개 이상의 화합물을 포함한다.
- [0236] 일부 구현예에서, 상기 조성물은 하기 중 적어도 하나를 추가로 포함한다:
- [0237] - PCSK9의 LDLR로의 결합을 억제하는 항체;
- [0238] - 스타틴;
- [0239] - 콜레스티라민
- [0240] - 콜레스테롤 흡수 억제제, 예를 들어, 에제티미브.
- [0241] 따라서, 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 화합물 및 PCSK9의 LDLR로의 결합을 억제하는 항체, 스타틴 또는 콜레스티라민으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 추가의 화합물을 포함한다. 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 정의된 하나의 화합물 및 PCSK9의 LDLR로의 결합을 억제하는 항체를 포함한다. 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 정의된 하나의 화합물 및 스타틴을 포함한다. 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 정의된 하나의 화합물 및 콜레스티라민을 포함한다. 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 정의된 하나의 화합물, PCSK9의 LDLR로의 결합을 억제하는 항체 및 스타틴을 포함한다. 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 정의된 하나의 화합물, PCSK9의 LDLR로의 결합을 억제하는 항체 및 콜레스티라민을 포함한다. 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 정의된 하나의 화합물, 콜레스티라민 및 스타틴을 포함한다. 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 정의된 하나의 화합물, PCSK9의 LDLR로의 결합을 억제하는 항체, 스타틴 및 콜레스티라민을 포함한다.
- [0242] 약제학적 조성물은 임의로 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 부형제를 포함할 수 있고 예를 들어, 문헌 [참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, edited by E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pa]에 기재된 바와 같이 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다. 조성물은 통상적인 형태, 예를 들어, 캡슐제, 정제, 에어로졸, 용제, 현탁제 또는 국소 적용으로 나타날 수 있다. 전형적으

로, 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여를 위해, 예를 들어, 정맥내 또는 피하 주사에 의한 투여를 위해 제형화될 수 있고 첨가된 보존제와 함께 앰푸울, 예비-충진된 시린지, 작은 용적 주입 또는 다중 용량 컨테이너로 제공될 수 있다. 조성물은 현탁제, 용제 또는 오일성 또는 수성 비히클 중 유제, 예를 들어, 수성 폴리에틸렌 글리콜 중 용제와 같은 형태를 취할 수 있다. 조성물은 경구 섭취를 위해 적합할 수 있다. 이것은 특히 소분자 조성물에 대해 적절하다. 오일 또는 비-수성 담체, 희석제, 용매 또는 비히클의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일 (예를 들어, 올리브유), 및 주사가능한 유기 에스테르 (예를 들어, 에틸 올레에이트)를 포함하고, 보존제, 습윤화제, 유화제 또는 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형 제제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 멸균 고체의 무균성 단리에 의해 또는 적합한 비히클, 예를 들어, 멸균, 발열원 부재 물과의 사용 전에 구성을 위한 용액으로부터 동결건조에 의해 수득된 분말 형태로 존재할 수 있다. 비경구 제형에 유용한 오일은 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 오일을 포함한다. 상기 제형에 유용한 오일의 특정 예는 땅콩, 대두유, 참깨유, 면화씨유, 옥수수유, 올리브유, 바셀린 및 미네랄을 포함한다. 비경구 제형에 사용하기 위해 적합한 지방산은 올레산, 스테아르산 및 이소스테아르산을 포함한다. 에틸 올레에이트 및 이소프로필 미리스테이트는 적합한 지방산 에스테르의 예이다. 비경구 제형은 전형적으로 용액 중 약 0.0001 내지 약 25 중량%, 예를 들어, 약 0.5 내지 약 25 중량%의 활성 성분을 함유한다. 보존제 및 완충제가 사용될 수 있다. 주사 부위에서 자극을 최소화하거나 제거하기 위해, 상기 조성물은 약 12 내지 약 17의 친수성-친지성 균형 (HLB)을 갖는 하나 이상의 비이온성 계면활성제를 함유할 수 있다. 상기 제형 중 계면활성제의 양은 전형적으로 약 0.000001 내지 약 15 중량%, 예를 들어, 약 0.000001 내지 약 5 중량% 또는 약 5 내지 약 15 중량%의 범위이다. 적합한 계면활성제는 폴리에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 예를 들어, 소르비탄 모노올레에이트, 및 프로필렌 옥사이드와 프로필렌 글리콜의 축합에 의해 형성되는, 에틸렌 옥사이드와 소수성 염기의 고분자량 부가물을 포함한다. 비경구 제형은 유닛-용량 또는 다중-용량 밀봉된 컨테이너, 예를 들어, 앰푸울 및 바이엘에 존재할 수 있고 사용 직전에 멸균 액체 부형제, 예를 들어, 주사용수를 요구하는 동결 건조된 (동결건조된) 조건으로 저장될 수 있다.

- [0243] 그러나 본 발명에 따른 약물 전달의 주요 경로는 상기 제제를 혈류로 도입하여 궁극적으로 관련 조직을 표적화하기 위해 비경구이다.
- [0244] 제제는 또한 예를 들어, 코, 질, 눈, 입, 생식관, 폐, 위장관 또는 직장에서 생물학적 활성 성분이 제공되어야만 하는 동물의 임의의 점막, 바람직하게는 코 또는 입의 점막을 거치도록 투여될 수 있다.
- [0245] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 제제는 비경구로, 즉, 정맥내, 근육내, 척추내, 피하, 비강내, 직장내, 질내 또는 복강내 투여에 의해 투여된다. 비경구 투여의 피하 및 근육내 형태가 일반적으로 바람직하다. 상기 투여를 위해 적당한 투여 형태는 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다. 상기 화합물은 또한 비강내 및 경구 흡입 투여에 의한 흡입에 의해 투여될 수 있다. 상기 투여를 위해 적당한 투여 형태, 예를 들어, 에어로졸 제형 또는 계량된 용량 흡입기는 통상의 기술에 의해 제조될 수 있다.
- [0246] 하나의 구현예에서 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 예를 들어, 주사에 의한 비경구 투여를 위해 제형화된다.
- [0247] 추가의 구현예에서 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 정맥내, 근육내, 척추내, 복강내, 피하, 볼러스 또는 연속 투여를 위해 제형화된다.
- [0248] 투여율 및 투여 횟수는 케이스별로 담당의에 의해 결정될 수 있다. 하나의 구현예에서, 투여는 30분 내지 24시간의 간격, 예를 들어, 1 내지 6시간의 간격, 예를 들어, 하루 1회 수행한다.
- [0249] 치료의 지속기간은 장애의 중증도에 따라 다양할 수 있다. 하나의 구현예에서 치료의 지속기간은 1일 내지 28일, 예를 들어, 2일 내지 25일, 예를 들어, 5일 내지 20일, 예를 들어, 7일 내지 15일이다. 만성적 경우에, 치료 지속기간은 평생일 수 있다.
- [0250] 투여 용량은 환자의 특성 및 투여 수단 및 방식을 기준으로 담당의에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 본원에 정의된 약제학적 조성물의 활성 화합물의 투여 용량은 체중 kg 당 0.1 mg 내지 1000 mg이다.
- [0251] 투여 용량은 볼러스 투여 또는 연속 투여로서 투여될 수 있다. 볼러스 투여와 관련하여, 약제학적 조성물은 하루 1회와 같은 30분 내지 24시간의 간격으로 투여될 수 있다.
- [0252] 일부 구현예에서, 조성물의 pH는 pH 4 내지 pH 10이다.
- [0253] 일부 구현예에서, 조성물은 경구 투여용으로 제형화된다.

- [0254] 일부 구현예에서, 조성물은 비경구 투여를 위해 제형화된다. 특정 구현예에서, 비경구 투여는 주사에 의한 것이다. 상기 비경구 투여는 정맥내, 근육내, 척수내, 복강내, 피하, 볼러스 또는 연속 투여일 수 있다.
- [0255] 항체를 선택하는 방법
- [0256] 또한 본원에 기재된 것은 PCSK9 (서열번호 1)의 HSPG 결합 부위 내 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합하는 항체를 선택하는 방법이고, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0257] i. PCSK9의 폴리펩타이드 단편 또는 서열번호 1의 아미노산 잔기 78 내지 167로 이루어진 도메인의 적어도 하나의 아미노산 잔기, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 잔기 78 내지 167로 이루어진 도메인의 적어도 5개, 예를 들어, 적어도 10개, 예를 들어, 적어도 15개, 예를 들어, 적어도 20개, 예를 들어, 적어도 25개, 예를 들어, 적어도 30개, 예를 들어, 적어도 35개, 예를 들어, 적어도 40개, 예를 들어 적어도 45개, 예를 들어, 적어도 50개, 예를 들어, 적어도 55개, 예를 들어, 적어도 60개, 예를 들어, 적어도 65개, 예를 들어, 적어도 70개, 예를 들어, 적어도 75개, 예를 들어, 적어도 80개, 예를 들어, 적어도 모든 아미노산을 포함하는 PCSK9의 폴리펩타이드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포유동물에게 투여하는 단계;
- [0258] ii. 상기 폴리펩타이드를 인지하는 항체를 동정하고 선택하는 단계, 및
- [0259] iii. 상기 선택된 항체가 경쟁적 ELISA 검정에서 하나 이상의 표준 항체를 대체할 수 있는지를 결정하는 단계.
- [0260] PCSK9의 폴리펩타이드 단편 또는 PCSK9의 폴리펩타이드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 투여하는 방법은 당업계에 공지되어 있고 포유동물 또는 파아지 디스플레이의 면역화를 포함한다.
- [0261] 일부 구현예에서, 상기 방법은 상기 표준 항체들 중 적어도 하나를 대체할 수 있는 항체를 선택하는 단계를 추가로 포함한다. 표준 항체는 PCSK9 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 항체이다.
- [0262] 상기 선택된 항체가 경쟁적 ELISA에서 하나 이상의 표준 항체를 대체할 수 있는지를 결정하기 위한 단계는 다음 단계를 포함한다:
- [0263] i. 상기 표준 항체에 의해 인지되는 에피토프를 포함하는 PCSK9 또는 이의 단편을 제공하는 단계; 및
- [0264] ii. 시험 항체 및 상기 표준 항체를 상기 PCSK9 또는 이의 단편에 첨가하는 단계 (여기서, 시험 항체 또는 표준 항체는 검출가능한 표지로 표지되거나 2개의 항체는 상이한 검출가능한 표지로 표지된다); 및
- [0265] iii. PCSK9에서 검출가능한 표지의 존재를 검출함에 의해 상기 시험 항체가 표준 항체를 대체할 수 있는지를 검출하는 단계.
- [0266] 상기 방법은 항체들이 LDLR 분해를 억제하고 LDLR 분해를 억제할 수 있는 항체들을 선택할 수 있는지를 결정하기 위해 항체들을 시험함을 추가로 포함할 수 있다.
- [0267] 또한 본원에 기재된 것은 헤파린과 같은 HSPG의 PCSK9로의 결합을 억제할 수 있는 펩타이드 또는 헤파린 유사체 또는 모사체를 선택하는 방법이고, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [0268] i. 다수의 펩타이드 또는 헤파린 유사체 또는 모사체를 제공하는 단계;
- [0269] ii. 상기 다수의 펩타이드 또는 헤파린 유사체 또는 모사체를 배지에서 간세포-유래된 세포주와 같은 LDLR-발현 세포로부터 유래된 세포로 항온처리하는 단계;
- [0270] iii. 상기 배지에서 PCSK9의 수준 및/또는 상기 세포의 LDLR의 수준을 결정하는 단계;
- [0271] iv. 단계 iii에서 결정된 바와 같이 PCSK9 및/또는 LDLR의 최고 수준을 유도하는 펩타이드 또는 헤파린 유사체 또는 모사체를 선택하는 단계.
- [0272] 일부 구현예에서, PCSK9의 수준은 세포 표면으로부터 탈착된 PCSK9의 수준이다.
- [0273] 본원에 기재된 화합물에 결합할 수 있는 화합물
- [0274] 또한 본원에 기재된 것은 상기 정의된 바와 같은 화합물을 선택적으로 결합할 수 있는 화합물이다. 일부 구현예에서, 상기 정의된 바와 같은 화합물을 선택적으로 결합할 수 있는 화합물은 항체이다.
- [0275] 본원에 기재된 항체를 생산하는 방법
- [0276] 본원에 정의된 바와 같은 항체를 생산하는 방법이 기재되어 있고 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다:

- [0277] i. 단백질, 또는 PCSK9의 HSPG 결합 도메인을 포함하는 단백질 또는 이의 단편 또는 이의 기능성 등가물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포유동물에게 투여하는 단계;
- [0278] ii. PCSK9 (서열번호 1)에 결합할 수 있는 경우 상기 항체를 선택하는 단계;
- [0279] iii. 돌연변이된 PCSK9에 결합할 수 없는 경우 상기 항체를 선택하는 단계 (여기서, 상기 돌연변이된 PCSK9는 HSPG에 결합할 수 없다).
- [0280] 단백질, 또는 PCSK9의 HSPG 결합 도메인을 포함하는 단백질 또는 이의 단편 또는 이의 기능성 등가물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 투여하는 방법은 당업계에 공지되어 있고 포유동물 또는 파아지 디스플레이의 면역화를 포함한다.
- [0281] 일부 구현예에서, 상기 돌연변이된 PCSK9는 93, 96, 97, 104, 105, 136, 139, 165 또는 167번 위치 중 적어도 하나에서 돌연변이된다. 일부 구현예에서, 상기 돌연변이는 알려진 치환이다. 일부 구현예에서, 93, 96, 97, 104, 105, 136, 139, 165 또는 167번 위치에서 2개 이상의 아미노산 잔기가 돌연변이된다.
- [0282] 특정 구현예에서, 돌연변이된 PCSK9는 돌연변이체 R93A, R96A, R97A, R104A, R105A, K136A, H139A, R165A 또는 R167A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서, 상기 위치는 서열번호 1에 제시된 PCSK9의 위치이다. 하나의 특정 구현예에서, 돌연변이된 PCSK9는 PCSK9의 R93, R96, R97, R104, R105 및 H139 위치에서 돌연변이된다. 바람직하게, 상기 돌연변이는 알려진으로의 돌연변이이다.
- [0283] 일부 구현예에서, PCSK9의 HSPG 결합 도메인을 포함하는 단백질 또는 이의 단편 또는 이의 기능성 등가물이 투여되는 포유동물은 설치류, 예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터 또는 기니아 피그이다.
- [0284] 상기 방법은 상기 포유동물로부터 세포를 생산하는 항체를 단리시키고, 상기 항체 생산 세포로부터 하이브리도마 세포를 제조하고, 상기 하이브리도마를 배양하고 상기 하이브리도마에 의해 생산된 항체를 단리시킴을 추가로 포함할 수 있다. 하이브리도마 세포로부터 항체를 단리시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0285] 일부 구현예에서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 항체를 생산하기 위한 것이고 숙주 세포를 상기 항체를 암호화하는 핵산 작제물로 형질감염시키는 단계를 포함한다. 상기 항체는 재조합 세포에 의해 생산될 수 있다. 적합한 재조합 세포는 세균 및 진핵 미생물을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 미생물일 수 있다.
- [0286] 일부 구현예에서, 미생물은 에스케리치아 콜리 (*Escherichia coli*), 락토바실러스 제아 (*Lactobacillus zeae*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 리비단스 (*Streptomyces lividans*), 스태필로코커스 카르노수스 (*Staphylococcus carnosus*), 바실러스 메가테리움 (*Bacillus megaterium*) 및 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 세균이다.
- [0287] 다른 구현예에서, 미생물은 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 아스퍼질러스 나이거 (*Aspergillus niger*), 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 스킨조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*) 및 클루이베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 진핵 미생물이다.
- [0288] 숙주 세포는 또한 식물 세포 및 동물 세포를 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 아라비도프시스 종 (*Arabidopsis sp.*), 완두콩, 쌀, 옥수수, 담배, 보리, 또는 이의 종자를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 식물 세포이다. 다른 구현예에서, 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소, 마우스 및 인간을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 포유동물로부터 유래된 동물 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 동물 세포는 곤충 또는 조류 세포주로부터 유래된다.
- [0289] 상기 방법은 또한 항체를 동정하고 선택하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0290] **실시예**
- [0291] 실시예 1: PCSK9에서 HSPG 결합 부위의 맵핑
- [0292] 본원 발명자들은 PCSK9의 정전기 표면 (PDB: 2PMW)을 조사하였고 (도 2b), PCSK9 프로도메인에 위치한 6개 표면 노출된 기본 잔기들로 구성된 추정 헤파린 결합 부위를 동정하였다. 상기 결합 부위는 93, 96, 97, 104, 및 105번 위치에서 아르기닌 (R) 잔기 및 139번 위치에서 히스티딘 (H)에 의해 형성되고 이들은 헤파린 펜타사카라이드 (SANORG)의 설페이트 그룹과 완벽한 쌍 형성을 보여준다 (문헌참조: Herbert et al., 1996) (Herbert et al., 1996) (도 2b 및 2c). 상기 부위는 PCSK9의 불활성 촉매 도메인에 위치한 LDLR 결합 표면 반대에서 발견된

다 (도 2a). LDLR과의 복합체 (PDB:3P5B)에서 PCSK9의 공결정 구조상으로 헤파린 단편의 도킹은 HSPG 결합이 후속적 PCSK9:LDLR 복합체 형성을 가능하게 함을 시사하였다 (도 3c).

- [0293] 실시예 2: 헤파리나제 처리는 시험관내 PCSK9 세포 표면 연합을 억제하고 생체내 PCSK9-유도된 분해에 대한 LDL 수용체를 보호한다
- [0294] 본원 발명자는 HSPG가 PCSK9의 포획에 관여할 수 있음을 고려하였다. 따라서, 본원 발명자는 헤파리나제 I을 사용하여 PCSK9를 안정하게 발현하는 인간 간세포-유래된 HepG2 세포를 처리하였다. 효소 헤파리나제 I은 우론산과 D-글루코사민 사이의 1,4 O-연결에서 헤파린 설페이트 GAG 쇄를 절단함으로써 세포 표면 헤파린 설페이트 쇄를 제거한다.
- [0295] PCSK9로 안정하게 형질감염된 HepG2 세포는 커버슬립 당 50,000 세포로 씨딩하고 PBS (0,0002 UN/ml) 또는 단독의 PBS 중에서 헤파리나제 I(Sigma Aldrich/H2519)의 첨가 전에 밤새 항온처리하였다. 세포는 4 % 파라포름알데하이드 중에 고정화시키고 1차 및 2차 항체로 비-침투화된 세포의 면역염색 전에 37 °C에서 1시간 동안 항온처리하였다. 핵은 Hoechst 염료 (Sigma Aldrich)로 가시화하였다. 이미지는 Zeiss LSM780 상에 획득하였다.
- [0296] 실제로, 처리는 표면 PCSK9 염색의 강도에서 현저히 감소시켰고 이는 HSPG가 PCSK9 세포 결합을 위해 중요함을 시사한다 (도 2d).
- [0297] PCSK9 활성화에 대해 헤파린 설페이트 GAG의 효소적 제거 효과를 생체내 시험하기 위해, 10 내지 12주령 수컷 BALB6/cJRj 마우스에 PCSK9 (10 µg)의 주사 5분 전에 꼬리 정맥 카테터를 통해 투여되는 헤파리나제 I (30U)를 주입하였다. 대조군 마우스에서, 헤파리나제 주사 및/또는 PCSK9 주사는 0.9 % 식염수 주사로 대체되었다. 헤파리나제 주입 동안에, 마우스는 연속적으로 마스크를 통해 투여된 이소플루란으로 약하게 마취시켰다. 주사 후 1시간째에, 마우스를 희생시키고 간 조직 샘플을 수거하고 단백질의 추출 및 웨스턴 블롯에 의해 LDLR 수준의 평가 전에 순간 동결시켰다 (도 10a). 헤파리나제 I의 주사는 PCSK9-유도된 분해로부터 LDLR을 완전히 보호하였고 이는 HSPG가 생체내 LDLR의 PCSK9 유도된 분해에서 중요함을 입증한다 (도 10a 및 b).
- [0298] PCSK9와 헤파린 설페이트 GAG 쇄 간의 직접적인 상호작용을 입증하기 위해, 본원 발명자는 헤파린과 공유적으로 결합된 세파로스 비드를 사용한 친화성 크로마토그래피를 사용하였다.
- [0299] 정제된 PCSK9는 PBS 중에서 5 ml HiTrap 헤파린 HP 칼럼 (GE Healthcare) 상으로 로딩하였다. 상기 칼럼은 Akta Prime에 연결하고 5칼럼 용적의 10 mM NaH₂PO₄ (pH 7.4)로 세척하였다. PCSK9는 10 mM의 NaH₂PO₄ (pH 7.4) 및 2 M NaCl의 선형 농도 구배를 사용하여 용출시키고 분획물은 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 측정된 전도성을 기준으로, 용출 프로파일은 형질전환 계수 0.065 mS/mM NaCl을 사용하여 NaCl 농도의 함수로 전환하였다. PCSK9는 헤파린 칼럼 상에 보유하였고 대략 500 mM의 NaCl 농도에서 용출시켰고 (도 2e), 이는 강하고 고도로 특이적인 헤파린과의 상호작용을 지적한다.
- [0300] 상이한 실험에서, HepG2 세포로부터 조건화된 배지는 10 mM NaH₂PO₄ (결합 완충액) 중에서 헤파린 세파로스 CL-6B 비드 (GE Healthcare)로 항온처리하였다. 4 °C에서 로터 상의 밤새 항온처리 후, 비드는 증가하는 농도의 NaCl에서 헤파린 결합된 단백질의 배치 용출 전에 결합 완충액에서 세척하였다. PCSK9를 주입하고 통류시키고 용출 분획물을 웨스턴 블롯팅에 의해 평가하였다.
- [0301] 본원 발명자는 HepG2 세포의 조건화된 배지로부터 내인성 PCSK9가 또한 헤파린 세파로스에 결합하고 잘-확립된 HSPG 결합 단백질인 ApoE의 것과 유사한 용출 프로필을 보여주었다 (도 3d).
- [0302] 실시예 3: PCSK9/HSPG 상호작용을 위해 중요한 잔기들의 동정
- [0303] PCSK9/HSPG 상호작용에 관여하는 중요한 잔기들을 추가로 좁히기 위해, HSPG 결합 모티프에 점 돌연변이를 갖는 PCSK9 변이체를 클로닝하고 발현하였다. 돌연변이는 3D 구조 모델 도킹에 의해 동정된 하전된 아미노산 아르가닌 (Arg/R), 라이신 (Lys/K) 및 히스티딘 (His/H)을 알라닌 (Ala/A)과 같은 천연 잔기에 의해 대체하기 위해 PCR로 도입하였다.
- [0304] 인간 야생형 및 하기의 알라닌 치환 변이체를 분석하였다:
- [0305] 야생형 PCSK9 (서열번호 1)
- [0306] 돌연변이체 R93
- [0307] 돌연변이체 R96R97

- [0308] 돌연변이체 R104R105
- [0309] 돌연변이체 R165R167
- [0310] 돌연변이체 R93R104R105H139A
- [0311] 돌연변이체 R93R96R97R104R105H139
- [0312] 부적당하게 폴딩된 PCSK9는 일반적으로 프로펩타이드에서 절단되지 않고 따라서 소포체에서 보유되기 때문에, PCSK9 돌연변이 변이체의 올바른 폴딩은 이들의 프로세싱 및 분비를 모니터링함에 의해 평가될 수 있다. proPCSK9의 성숙한 단백질로의 포르세싱 및 성숙한 PCSK9 변이체의 분비는 차이니스 난소 햄스터 (CHO) 세포의 일시적 형질감염에 이어서 세포 용해물 및 주변 배지에서 PCSK9의 웨스턴 블롯 분석에 의해 평가하였다 (도 3a).
- [0313] PCSK9 돌연변이체 단백질이 헤파린에 결합하는 능력은 친화성 크로마토그래피에 이어서 항-PCSK9 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 평가하였다. 목적하는 PCSK9 변이체로 형질감염된 CHO 세포로부터 조건화된 배지는 10 mM NaH₂PO₄ (결합 완충액)에서 헤파린 세파로스 CL-6B 비드 (GE Healthcare)로 항온처리하였다. 4 °C에서 로터 상의 밤새 항온 처리 후 비드는 증가하는 농도의 NaCl 중에서 헤파린 결합된 단백질의 배치 용출 전에 결합 완충액에서 세척하였다. PCSK9를 주입하고 통류시키고 용출 분획물은 웨스턴 블롯팅에 의해 평가하였다.
- [0314] 돌연변이체 R93, R96R97 및 R104R105는 야생형 PCSK9 또는 돌연변이체 R165R167과 비교하여 헤파린에 대해 덜 친화성을 보여주며, 돌연변이체 R93R104R105H139 및 R93R96R97R104R105H139는 헤파린에 결합하지 않고 전적으로 통류물에서 발견된다 (도 3b).
- [0315] 실시예 4: 돌연변이된 HSPG-결합 도메인을 갖는 PCSK9 변이체는 LDL 수용체 분해를 유도하는데 실패한다
- [0316] 정제된 PCSK9 변이체는 야생형 PCSK9와 비교하여 LDLR의 분해를 유도하는 이들의 능력을 시험하기 위한 세포 검정에서 시험되었다. LDLR 분해 유도는 HepG2 세포를 야생형 PCSK9 (WT) 또는 상기 PCSK9 돌연변이체로 항온처리함에 의해 분석되었고 LDLR 수준은 웨스턴 블롯팅에 의해 평가하였다. HepG2 세포는 12-웰 플레이트에서 웰당 밀도 250,000 세포로 씨딩하였다. 밤새 항온처리 후, 배지는 PCSK9 WT 또는 돌연변이체 R93R96R97R104R105H139를 함유하는 새로운 배지로 대체하였다. 세포는 18시간 항온처리 후 수거하고 용해시키고 LDLR 수준은 웨스턴 블롯팅 및 밀도측정기에 의한 정량에 의해 평가하였다.
- [0317] 돌연변이체 R93R96R97R104R105H139로 항온처리된 세포에서 LDLR 수준은 WT PCSK9로 항온처리된 세포에서 측정된 수준과 비교하여 현저히 (대략 2배) 높았고(도 4a 및 b), 이는 HSPG-결합 도메인내 돌연변이가 PCSK9-유도된 LDLR 분해를 감소시켰음을 보여준다.
- [0318] 실시예 5: 헤파린 및 헤파린 유사체는 PCSK9:LDLR 복합체 형성을 차단한다
- [0319] 근접 연결 검정 (PLA)을 사용하여, 본원 발명자는 외인성으로 첨가된 헤파린이 내인성 PCSK9의 결합에 대해 세포 표면 HSPG와 경쟁하여 PCSK9:LDLR 복합체 형성을 차단하는지를 시험하였다 (문헌참조: Soderberg et al., 2006).
- [0320] PLA (DuolinkII, Olink Bioscience)는 1차 항체로서 항-PCSK9 (R&D systems/AF3888), 및 항-LDLR (Abcam/ab52818)을 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 수행하였다. 서로로부터 30 nm 내에 위치한 PCSK9 및 LDLR은 환-형성 올리고뉴클레오타이드와 하이브리드화하여 롤링 서클 증폭을 프라이밍함에 의해 올리고뉴클레오타이드-접합된 2차 항체에 의해 가시화한다. 상기 증폭된 DNA는 상보적 형광-표지된 올리고뉴클레오타이드의 첨가에 의해 가시화한다 (문헌참조: Soderberg et al., 2006)
- [0321] 비침투화된 HepG2 세포에서 내인성 세포 표면 PCSK9 및 LDLR에 대한 상기 검정을 사용하여, PCSK9:LDLR 복합체의 풍부한 클러스터를 관찰하였다 (도 5d). 이들은 헤파린과의 항온처리시 수 및 강도 둘 다에서 현저히 감소하였고 이는 PCSK9의 HSPG로의 결합이 세포 표면 LDLR과의 후속적 복합체 형성에 중요함을 시사한다.
- [0322] 본원 발명자는 HepG2 세포의 헤파린 (18시간 동안 50 U/ml)으로의 항온처리는 2배 내지 3배보다 높은 수준의 LDLR 단백질 (도 5a-5b)을 유도하고 유사한 효과가 저분자량의 헤파린의 2개의 치료학적 제제와 함께 관찰됨을 밝혔다 (도 8a).
- [0323] 헤파린-처리된 HepG2 세포에서 세포 LDLR의 증가는 용량 의존적이었고 배지에서 PCSK9의 현저한 증가를 수반하였다 (도 6b). PCSK9 농도는 제조업자의 프로토콜에 따라 R&D 시스템으로부터 인간 (DPC900) 쿠안틴 ELISA 키

트를 사용하여 측정하였다.

- [0324] 헤파린에 의해 유도된 세포성 LDLR 및 세포외 PCSK9에서의 증가는 본원 발명자가 최고 헤파린 농도에서 PCSK9를 제외하고는 mRNA에서 어떠한 변화를 관찰하지 못했기 때문에 해독후 수준에서 일어났다 (도 6c).
- [0325] HepG2 세포로부터 RNA 추출은 iScript cDNA 합성 키트 (BIORAD)에 의해 0.5 μ g의 RNA 주형으로부터 cDNA 합성 후 뉴클레오스핀 (NucleoSpin) RNA 제조 키트 (Macherey-Nagel)를 사용하여 수행하였다. 실시간 PCR은 하기의 전사체를 검출하기 위한 프라이머를 사용하는 iQSYBR 그린 슈퍼믹스 및 iTaq로 수행하였다: LDLR (정배향 프라이머 5' 5'ACGGCGTCTCTTCTATGACA3', 역배향 프라이머 5'CCCTTGGTATCCGCAACAGA3'), PCSK9 (정배향 프라이머 5'CCTGGAGCGATTAC-CCCT3', 역배향 프라이머 5'CTGTATGCTGGTGTCTAGGAGA3'), 및 GAPDH (정배향 프라이머 5'ACAACCTTGGTATCGTGAAGG3', 역배향 프라이머 5'GCCATCAGCCACA-GTTTC3')
- [0326] 본원 발명자는 25 U/ml 헤파린이 PCSK9 mRNA 수준에서 2배 증가에도 불구하고 LDLR 수준에서의 대략 2.5 배 증가 (도 8b)로부터 명백한 바와 같이 PCSK9 활성을 효과적으로 길항시켰음을 발견하였다.
- [0327] 헤파린 (50 U/ml)과 24시간 항온처리된 HepG2 세포는 웨스턴 블롯팅에 의해 평가된 바와 같이 증가된 수준의 LDLR을 보여주었다 (도 5a). LDLR 수준은 또한 밀도측정기에 의해 정량하였다 (n=4) (도 5b). 헤파린과의 항온 처리는 또한 ELISA에 의한 측정시 배지에서 증가된 PCSK9 수준을 증가시켰다 (도 5c).
- [0328] 헤파린은 제조업자의 지침에 따른 PCSK9/LDLR 결합 검정 (도 6a) (BPS Bioscience)에 의해 분석된 바와 같이 PCSK9와 LDLR 간의 직접적인 상호작용을 방해하지 않는다. 간략하게, LDLR 세포의 도메인으로 코팅된 미세역가 플레이트 웰은 헤파린 (5 또는 50 U/ml) 또는 PCSK9의 LDLR 결합 도메인에 대한 항-PCSK9 항체 (BPS Bioscience #71207)의 존재하에 비오티틸화된 PCSK9로 항온처리하였다. 세척 후, 웰은 서양 고추냉이 퍼옥시다제 (HRP) 표지된-스트렙타비딘으로 항온처리하고 PCSK9의 LDLR 세포의 도메인으로의 결합은 HRP 기질의 첨가에 의해 그리고 화학발광 미세플레이트 판독기를 사용한 시그널의 평가에 의해 평가하였다.
- [0329] PCSK9와 LDLR 간의 상호작용은 헤파린 첨가에 의해 영향받지 않았고 이것은 PCSK9와 헤파린의 결합은 PCSK9와 세포 표면 HSPG의 상호작용을 차단시킴에 의해 LDLR 분해의 감소를 초래한다는 것을 나타낸다.
- [0330] 폰다파리누스 (Arixtra) (25, 100 또는 250 μ g/ml)로 24시간 항온처리된 HepG2 세포는 웨스턴 블롯팅에 의해 평가된 바와 같이 LDLR의 수준을 증가시켰다 (도 7). 이들 결과는 폰다파리누스와 같은 헤파린 유사체의 PCSK9로의 결합이 PCSK9와 세포 표면 HSPG의 상호작용을 차단시킴에 의해 LDLR 분해를 감소시킴을 지적한다.
- [0331] 실시예 6: 헤파린 모사체는 PCSK9:LDLR 상호작용을 차단한다.
- [0332] 헤파린의 구조를 모사하는 여러 분자는 다수의 치료학적 적용을 위해 지난 100년 동안 개발되었고, 이중 7개는 현재 임상 시험 중에 있다. 이들은 헤파린 모사체로 지칭되고 다양한 화학적 부류에 속하고 이는 다양한 올리고 사카라이드, 올리고뉴클레오타이드 및 나프탈렌 유도체를 포함한다. 본원 발명자는 HepG2 세포에서 PCSK9에 결합하고 LDLR을 증가시키는 이들의 능력에 대한 헤파린 모사체의 서브셋을 시험하였다 (도 9).
- [0333] PCSK9와 리간드 (수라민, 텍스트란 설페이트 5000, 텍스트란 5000, 펜토산 설페이트 및 S-dC-36) 간의 평형 결합 친화성은 미세규모 열이동 (MST)을 사용하여 평가하였다 (문헌참조: Jerabek-Willemsen et al., 2011). PCSK9는 MO-L003 모로리드 블루-NHS 표지화 키트 (NanoTemper Technologies)를 사용하여 표지시키고 단백질 대 염료의 1:1 몰비의 표지화 효율이 성취되었다. PCSK9는 100 nM의 최종 농도로 적용하였다. 비표지된 결합 파트너는 1:1 희석 (PBS + 0.05 % Tween-20 중에서)으로 적정하고, 여기서 최고 농도는 수라민에 대해 15.4 mM, 텍스트란 설페이트 5000에 대해 2.3 mM, 텍스트란 5000에 대해 2.3 mM, 펜토산 설페이트에 대해 16.3 mM 및 S-dC-36에 대해 250 μ M이었다. MST 측정은 20 % LED 및 80 % MST 파워를 사용하여 모노리드 NT.115 장비 (NanoTemper Technologies)에 대한 표준-처리된 모세관 (NanoTemper Technologies)에서 수행하였다. 레이저 온 앤드 오프 시간은 각각 5초 및 35초였다. 음성 대조군은 상기 언급된 바와 같이 동일한 조건하에서 모든 16개 모세관에서 MST 완충액 중 100 nM의 표지된 PCSK9를 사용하여 수행하였다. 결합 곡선은 수라민, 텍스트란 설페이트 5000 및 S-dC-36에 대한 80 % MST 파워에서 온도-점프 단계로부터; 및 펜토산 설페이트에 대해 80 % MST 파워에서 열이동+온도 점프 단계로부터 수득하였다. 각각의 결합 파트너에 대해, S자형 용량-반응 곡선은 GraphPad Prism 6을 사용하여 피팅하여 평균 KD 값을 수득하였다. PCSK9의 형광 켄칭이 고농도의 수라민의 존재하에 관찰되기 때문에, 변성 시험은 PCSK9를 10 % SDS로 전처리함에 이어서 MST 장치 상의 분석 전 90 °C에서 15분 동안 샘플을 가열시킴에 의해 수행하였다. 이것은 켄칭 효과를 제거하였고, 이는 비-변성 조건하에서 PCSK9의 형광 켄칭이 실제 리간드-결합 반응으로 인한 것임을 지적한다.

- [0334] 황화된 올리고사카라이드 텍스트란 설페이트 (도 9c) 및 펜토산 설페이트 (도 9f) 둘 다는 각각 179.5 μM 및 381.3 μM 의 친화성으로 MST를 사용하여 측정된 바와 같이 PCSK9에 직접 결합하고, 세포성 LDLR에서 용량-의존성 증가를 유도하였고 (도 9a-b 및 도 9d-e), 비히클 대조군과 비교하여 약 400 %의 평형에 도달하고 상기 검정에서 스타틴의 최대 효과보다 현저히 우수하였다. 상기 상호작용은 비-황화된 텍스트란은 PCSK9에 대해 어떠한 친화성을 보여주지 않기 때문에 설페이트 그룹의 존재에 의존하였다. 아프리카 수면병에서 구충제 약물인 황화된 나프탈렌 유도체 수라민은 PCSK9와 190 μM (도 9h)의 친화성으로 결합하고 LDLR에서 15배 이하의 증가를 유도하였고 (도 9a, 9g), 형광성 표지된 LDL 입자의 증가된 세포 취득을 수반하였다 (도 12). 본원 발명자는 36량체 단일 가닥 DNA 분자를 추가로 시험하였고 이것이 4.8 μM 의 KD로 PCSK9에 결합하는 것으로 밝혀졌고 (도 9k) 상기 농도 범위에서 강력한 억제 효과를 보여주었다 (도 9i-j).
- [0335] 실시예 7: 저분자량의 헤파린의 치료학적 제제는 PCSK9 유도된 분해에 대해 LDLR을 보호한다.
- [0336] 저분자량의 헤파린 제제 프라그민 (1-100 U/ml) 또는 Innohep (1-100 U/ml)과 밤새 항온처리된 HepG2 세포는 웨스턴 블롯팅에 의해 평가된 바와 같이 증가된 수준의 LDLR을 보여주었다 (도 8a). 프라그민 및 Innohep의 효과는 헤파린 (도 5a) 및 펜타-사카라이드 Arixtra (도 7)의 효과에 상응하였다.
- [0337] 이들 결과는 주형으로서 헤파린:PCSK9 복합체를 사용한 구조 기반 약물 디자인이 소분자 PCSK9 억제제의 개발에서 실행가능한 방법임을 보여준다.
- [0338] 실시예 8: 헤파린은 생체내 PCSK9 유도된 분해에 대해 LDLR을 보호한다.
- [0339] 마우스 (BALB6/cJRj)는 단독의 또는 헤파린 (50U)과 조합된 10 μg 의 인간 재조합 PCSK9의 단일 정맥내 투여 (꼬리 정맥)에 적용하였다. 주사 1시간 후, 마우스를 희생시키고 간 조직을 수거하였다. 막 단백질 제제 중에 LDLR의 웨스턴 블롯 분석은 단독의 PCSK9가 주사된 마우스와 비교하여 헤파린과 동시 주사된 마우스에서 간 LDLR의 수준이 상당히 높음을 보여주었다 (도 8b, 도 8c에서 정량된).
- [0340] 이들 결과는 PCSK9:헤파린 상호작용이 소형 분자 PCSK9 억제제의 개발을 위한 골격을 제공할 수 있음을 보여준다.
- [0341] 실시예 9: PCSK9의 HSPG 결합에 대해 지시된 폴리클로날 항체는 PCSK9 활성을 억제한다
- [0342] 폴리클로날 항체는 3개의 래트를 인간 HSPG 결합 도메인을 함유하는 키메라 래트 PCSK9를 암호화하는 DNA로 면역화시킴에 의해 제조되었다. 면역화된 동물로부터 수득된 혈청 샘플은 면역침전에 의해 PCSK9-결합 항체에 대해 시험하였다.
- [0343] 1 μl 의 면역 또는 면역전 래트 혈청으로부터의 항체는 GammaBind 비드 (GE Healthcare) 상에 고정화시키고, 이전에 기재된 바와 같이 PCSK9로 일시적으로 형질감염된 대사적으로 표지된 HEK293의 조건화된 배지로부터 35S 인간 PCSK9의 침전 (4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간)을 위해 사용하였다 (문헌참조: Gustafsen et al., 2014). 0.1% Triton X100을 함유하는 TBS에서 3회 세척 후, 침전된 단백질은 샘플을 20 mM 디티오에리트레이톨 (DTE)이 보충된 NUPAGE 샘플 완충액 중에서 샘플을 비등시킴에 의해 용출시키고, SDS-PAGE로 분리시키고 인영상화에 의해 가시화하였다.
- [0344] 모든 동물로부터의 면역 혈청은 35-S 표지된 PCSK9를 특이적으로 침전시켰다. PCSK9의 어떠한 하강도 면역전 동물 기원의 혈청으로 수행된 대조군 면역침전에서 검출되지 않았다 (도 8d).
- [0345] 면역 및 면역전 혈청 샘플로부터 정제된 IgG는 PCSK9 유도된 LDLR 분해의 시험관내 모델을 사용하여 시험하였고, 여기서, 면역 IgG로 항온처리된 HepG2 세포는 LDLR 수준에서 현저한 증가를 보여주었다 (도 8e). 이들 결과는 PCSK9의 HSPG 결합 도메인을 표적화하는 항체가 PCSK9 활성을 효율적으로 억제함을 지적한다.
- [0346] 실시예 10: PCSK9 HSPG 결합 도메인에서 지시된 PCSK9 억제 mAb의 생성
- [0347] PCSK9에서 HSPG 결합 도메인에 대한 모노클로날 항체 (mAb)는 3마리의 래트를 인간 HSPG 결합 도메인을 함유하는 키메라 래트 PCSK9를 암호화하는 DNA로 면역화시킴에 의해 제조된 (Aldevron Freiburg, Germany)에 의해 제조하였다. 모노클로날 항체 생산 하이브리도마 클론은 래트 비장 림프구를 골수종 세포와 융합시키고 후속적으로 mAb 함유 하이브리도마 상등액의 수거 전에 항체 생산 세포의 단일 세포 서브클로닝에 의해 수득하였다. 상기 개별 mAb는 GammaBind 비드 (GE Healthcare) 상에 고정화된 mAb 생산 하이브리도마 클론으로부터의 500 μl 의 조건화된 배지를 사용하여 35S 인간 PCSK9의 면역 침전에 의해 시험하였다. 본원 발명자는 26마리의 시험된 mAb 중 16개가 고유 35S 인간 PCSK9를 특이적으로 침전시킴을 밝혔다 (도 8f).

- [0348] HepG2 세포에서 PCSK9 결합 mAb의 추가의 기능성 시험은 12개의 클론이 PCSK9 활성을 억제하고 LDLR의 세포성 수준을 대략 2배로 증가시킴을 보여주었다 (도 8g).
- [0349] 이들 12개의 클론을 시험하여 이들이 R93R96R97R104R105H139 PCSK9 돌연변이체에 결합할 수 있는지를 확인하였다 (도 8h). 대략 2배로 LDLR의 세포성 수준을 증가시킬 수 있는 4개의 클론은 상기 돌연변이체에 결합할 수 없었다 (도 8f, 8g 및 8h에서 mAb 1G8, 5E11, 8HA 및 10E5와 비교하여). 추가의 시험은 mAb 10E5가 변이체 R96R97 및 R104R105 뿐만 아니라 WT PCSK9를 침전시키고 (도 8i), 반면 mAb 1G8 및 5E11은 단지 WT PCSK9만을 인지함을 보여주었다 (도 8i). 이들 결과는 이들 3개의 클론이 HSPG 결합 도메인에 특이적으로 결합함을 입증한다.
- [0350] 클론 5E11 및 8HA의 서열을 분석하였다 (서열번호 2, 4, 6 및 8).
- [0351] 실시예 11: 임상적 시험을 위해 인간화된 모노클로날 항체의 생성
- [0352] 모노클로날 항체는 래트 PCSK9 및 인간 PCSK9 HSPG 결합 모티프로 구성된 키메라 단백질을 암호화하는 DNA로 래트를 면역화시킴에 의해 생성하였고 후보물 항체는 ELISA 검정에서 인간 PCSK9에 결합하는 것에 대해 스크리닝함에 의해 밝혔다. 후보물 항체는 에피토프, 인간 PCSK9에 대한 친화성 및 고유 PCSK9의 인지와 관련하여 특성 분석된다. 선택된 후보물 항체는 HepG2 세포 배양 검정에서 PCSK9 기능을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험되고 대부분의 전망있는 항체는 내인성 쥐 PCSK9 프로모터의 제어하에 인간 PCSK9를 발현하는 유전자선이 마우스에서 시험된다. 투여시, 간에서 LDL 수용체 수준 및 혈장에서 콜레스테롤을 분석하여 항체의 PCSK9 중화 효과를 평가한다. 주요 후보물은 인간화되고 임상 시험을 위해 제조한다.
- [0353]
- [0354] 실시예 12: PCSK9의 HSPG 결합 부위에 대해 지시된 항체를 사용한 LDL 콜레스테롤의 감소
- [0355] 상승된 LDL 콜레스테롤 수준을 갖는 환자는 인간 PCSK9에서 HSPG 결합 부위에 대해 지시된 인간화된 항체로 이루어진 활성 화합물을 처방받는다. 상기 환자는 1 내지 28일의 간격으로 25 내지 500 mg의 조성물을 피하 주사 받는다. LDL-C 수준에서 현저한 감소가 관찰된다. 이들 데이터는 인간 PCSK9에서 HSPG 결합 부위에 대해 지시된 항체의 비경구 투여가 대상체에서 LDL-C 수준에서 감소를 유도할 수 있음을 보여준다.
- [0356] 실시예 13: 스타틴 치료에 응답하지 않는 환자에서 LDL 콜레스테롤의 감소
- [0357] 상승된 LDL 콜레스테롤을 갖는 환자는 스타틴 치료를 처방받는다. 환자는 스타틴 치료에 응답하지 않는다. 이어서 환자는 인간 PCSK9에서 HSPG 결합 부위에 대해 지시된 인간화된 항체를 포함하는 25-500 mg의 조성물의 피하 주사를 사용한 치료를 처방받는다. 1 내지 28일의 간격으로 주사한다. LDL-C 수준에서 현저한 감소가 관찰되고 이는 인간 PCSK9에서 HSPG 결합 부위에 대해 지시된 항체의 비경구 투여가 스타틴 치료에 반응하지 않는 환자에서 LDL-C 수준의 감소를 유도할 수 있음을 보여준다.
- [0358] 실시예 14: PCSK9의 HSPG 결합 부위에 대해 지시된 소형 분자 화합물을 사용한 LDL 콜레스테롤의 감소
- [0359] 상승된 LDL 콜레스테롤 수준을 갖는 환자는 인간 PCSK9에서 HSPG 결합 부위를 차단하기 위해 디자인된 소형 분자 화합물의 투여를 처방받는다. 상기 화합물은 0.1-30 mg/kg의 용량으로 경구로 투여된다. LDL-C 수준에서 현저한 감소가 관찰되었고 인간 PCSK9에서 HSPG 결합 부위를 차단하기 위해 디자인된 소형 분자의 경구 투여가 환자에서 LDL-C 수준에서의 감소를 유도할 수 있음을 보여준다.
- [0360] 실시예 15: PCSK9에서 HSPG 결합 부위에 대한 항체의 생성
- [0361] 정제된 마우스 PCSK9 키메라를 작제하고 여기서, 상기 마우스 HSPG 결합 서열 스트레치는 인간 서열 스트레치 (서열번호 1의 아미노산 잔기 78 내지 167 내에 포함되는)로 치환된다. 마우스는 키메라로 면역화시킨다. 클론은 후속적으로 2개 단계에서 직접적인 ELISA에 의해 선택한다. 제1 단계에서, 야생형 인간 PCSK9에 결합할 수 있는 항체는 정제된 야생형 인간 PCSK9로 코팅된 미세역가 웰을 사용하여 선택한다. 제2 선택 단계에서, 미세역가 웰은 HSPG에 결합할 수 없는 돌연변이체 인간 PCSK9로 코팅시킨다. 돌연변이체 PCSK9를 결합할 수 있는 항체를 선택한다. 고정화된 인간 PCSK9에 대해 선택된 항체의 친화성은 이들의 K_d 를 결정함에 의해 평가한다. 항체는 후속적으로 HepG2 세포에서 PCSK9-유도된 LDLR 분해를 억제하는 능력에 대해 시험된다.
- [0362] 따라서, 인간 PCSK9의 HSPG 결합 도메인에 지시되고 PCSK9 유도된 LDLR 분해를 억제할 수 있는 항체가 선택된다.

- [0363] 실시예 16: 바이아코어를 사용한 HSPG 결합 부위에 대해 지시된 항체의 선택
- [0364] PCSK9에서 HSPG 결합 부위에 대해 지시된 항체의 친화성 및 특이성은 문헌 (참조: Munck Petersen et al., 1999)에 기재된 바와 같이 활성화된 CM5 센서 칩을 장착한 Biacore 3000 장치 상에서 수행된 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 평가한다. 야생형 인간 PCSK9 또는 HSPG에 결합할 수 없는 인간 돌연변이체 PCSK9는 10 mM 나트륨 아세테이트 (pH 4.0) 중에서 밀도 74-83 fmol/mm²로 고정화시키고 남아있는 커플링 부위는 1 M 에탄올아민으로 차단시킨다. 항체 샘플은 10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, 및 0.005 % Tween 20 (CaHBS) 중에서 25 °C에서 5 μl/min으로 주사한다. 결합은 상대적 반응 유닛 (RU)으로 발현되고 고정화된 단백질 플로우 세포 및 상응하는 대조군 플로우 세포 간의 응답의 차이로서 계산된다. 역학적 파라미터는 예를 들어, BIAevaluation 4.1을 사용하여 결정된다.
- [0365] 실시예 17
- [0366] HSPG 결합 도메인에 대해 지시된 PCSK9 mAb는 내인성 쥐 PCSK9 프로모터의 제어하에 인간 PCSK9의 발현과 함께 LDLR (LDLR+/-)에 대한 관상 동맥 질환 마우스 모델 이형접합체를 사용하여 시험된다. 웨스턴형 식이 공급 동물은 6 내지 8개월 기간 동안 3주마다 PCSK9 mAb (10 mg/kg)로 처리한다. 실험 말기에 마우스를 희생시키고 대동맥에 죽상동맥경화 병변을 현미경에 의해 평가한다. 혈장 LDL-c는 실험 동안에 2개월 마다 ELISA에 의해 평가한다.
- [0367] 실시예 18: HSPG 및 LDLR 결합 부위에 대해 지시된 항체를 사용하여 조합 치료요법
- [0368] PCSK9 (서열번호 1의 아미노산 78 내지 167 중에서)의 HSPG-결합 도메인에 지시된 인간화된 항체는 PCSK9의 LDLR로의 결합을 억제하는 항체와 조합하여 사용된다. 공동상승작용 효과가 관찰됨에 의해 보다 낮은 양의 각각의 항체는 투여될 필요가 있고 감소된 부작용을 유도한다.
- [0369] 실시예 19: 스타틴 치료에 응답하지 않는 환자에서 LDL 콜레스테롤의 감소
- [0370] 환자에게 상승된 LDL-C 수준에 대한 스타틴 치료를 적용한다. 그러나, LDL-C 수준에서 초기 강하 후 PCSK9의 스타틴-유도된 증가된 발현으로 인해, 상기 치료는 LDL-C 수준을 상당히 감소시키는데 성공하지 않았다.
- [0371] 스타틴에 추가로, 환자에게 HSPG의 PCSK9로의 결합을 억제하는 화합물을 투여한다. 상기 투여는 주마다 수행하고 스타틴과 조합된 낮은 용량 (25 내지 150 mg)의 화합물과 함께 수행한다. LDL-C 수준의 현저한 감소가 관찰되고 LDL-C의 목적하는 수준에 도달한다.
- [0372] 본 실시예는 PCSK9의 HSPG-결합 도메인에 대해 지시된 항체의 투여와 함께 스타틴-기반 치료의 보충이 LDL-C 수준을 성공적으로 감소시킬 수 있음을 보여준다.
- [0373] 실시예 20: 돌연변이된 HSPG 결합 부위를 갖는 PCSK9는 LDL 콜레스테롤 수준을 증가시키는데 실패한다.
- [0374] 야생형 PCSK9 및 PCSK9의 HSPG-결합 돌연변이체는 CG 디뉴클레오타이드가 없는 발현 플라즈미드 (Invivogen)의 수역학적 꼬리 주사에 의해 마우스 간에서 과발현되고; 이들 플라즈미드는 CG 염기쌍의 메틸화에 의한 불활성화 경향이 있는 통상의 플라즈미드와 비교하여 장기 발현을 나타낸다. 야생형 PCSK9의 과발현은 LDLR의 증진된 분해를 유도하고, 이는 혈청 LDL 콜레스테롤을 상승시키고 이에 의해 "기능의 습득" 변이체로서 작용한다. PCSK9의 HSPG 돌연변이체는 LDL 수용체의 감소된 분해로 인해 덜 상승된 혈청 LDL 콜레스테롤 수준을 유도하는 "기능의 상실" 변이체로서 작용한다.
- [0375] 상기 결과는 동물에서 LDL 수용체의 분해를 위한 PCSK9 HSPG-결합 도메인의 중추 역할을 입증한다.
- [0376] 실시예 21: 헤파린 및 헤파린 모사체와 PCSK9의 상호작용을 기반으로 하는 소형 분자 PCSK9 억제제의 구조-기반 약물 디자인
- [0377] 저분자량의 헤파린 및 헤파린 모사체 중에서 선택된 후보 화합물은 HepG2 세포 배양 검정에서 PCSK9 기능을 억제하고 LDLR 수준을 증가시키는 이들의 능력에 대해 시험된다. 헤파린 유사체 폰다파리누스 (상표명 Arixtra)는 표준 화합물로서 사용된다. 수득된 구조적 정보는 3백만개 구입가능한 화합물의 기존의 데이터베이스를 스크리닝하기 위해 사용되는 3 내지 5개 약물 분자 구조 모델을 유래하기 위해 사용된다. 50개 화합물의 다양성-기반의 수집은 HepG2 세포에서 기능성 시험을 위해 선택된다. 성공적인 억제제는 분자 도킹 모델의 보정 및 구입가능한 화합물의 제2 스크리닝을 촉진시킨다. 50개 화합물은 구입 및 시험관내 시험을 위해 선택된다. 3개의 가장 전망있는 후보물은 후속적으로 마우스 모델에서 시험하여 간에서 LDLR 수준 및 혈장에서 콜레스테롤에 대한 생

체내 효과를 평가한다.

- [0378] 실시예 22: PCSK9 억제제 후보물의 시험
- [0379] PCSK9 억제제 후보물의 임상 전 시험은 내인성 쥐 PCSK9 프로모터의 제어하에 인간 PCSK9의 발현과 함께 LDLR (LDLR+/-)에 대한 관상 동맥 질환 마우스 모델 이형접합체를 사용하여 수행한다. 웨스턴 유형 식이 공급 동물은 절개된 대동맥에서 지방 침적물의 오일 적색 0 염색 후 현미경에 의한 죽상동맥경화성 플라크 영역의 평가 전 6 내지 8개월 기간 동안 PCSK9 억제제로 처리한다. 콜레스테롤의 혈장 농도는 실험 동안에 2개월 마다 ELISA에 의해 평가한다.
- [0380] 이들 연구는 PCSK9 억제제 후보물이 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 능력의 평가를 가능하게 한다.
- [0381] 실시예 23: 수라민은 PCSK9-유도된 분해로부터 LDLR을 보호한다
- [0382] 수라민은 비-탄수화물-기반 황화된 헤파린 모사체 부류에 속하고 트롬빈과 의 복합체의 구조적 모델에서 헤파린과 중첩 결합 부위를 보여준다 (문헌참조: Lima et al., 2009). 수라민 (0 내지 200 µg/ml)과의 밤새 항온처리의 PCSK9 억제 효과는 HepG2 세포에서 시험되었다 (도 9a-b). LDLR 수준은 최고 시험된 농도의 수라민 (200 µg/ml)을 사용한 세포에서 15배 상향 조절되었고, 수라민이 PCSK9 유도된 분해로부터 LDLR을 보호함을 시사한다.
- [0383] 실시예 24: 간 LDLR 수준에 대한 수라민의 효과
- [0384] 수라민의 생체내 시험은 적용된 웨스턴형 식이 상에 마우스와 함께 및 단독 또는 50-200 µg 수라민과 조합된 5 내지 20 µg의 인간 재조합 PCSK9의 단일 정맥내 투여 (꼬리 정맥)로 인해 웨스턴형 식이에 적용받지 않은 마우스와 함께 수행하였다. 5 내지 7마리의 마우스 그룹을 희생시켜 웨스턴 블롯 분석에 의한 간 LDLR 수준 (주사 후 1시간) 및 ELISA에 의한 혈장 LDL-c (주사 후 7시간)를 평가하였다.
- [0385] 이들 연구는 수라민 투여가 생체내 증가된 LDLR 수준을 유도함을 확인한다.
- [0386] 실시예 25: 텍스트란 설페이트 및 펜토산은 PCSK9-유도된 분해로부터 LDLR을 보호한다
- [0387] 변형된 폴리사카라이드 화합물의 헤파린 모사체 부류에서, 텍스트란 설페이트 (도 9a-b) 및 펜토산 (도 9d-e)은 HepG2 기반 시험관내 세포 검정에서 시험되었다. 밤새 항온처리 후 LDLR 수준은 텍스트란 설페이트 (0 내지 200 µg/ml)와의 치료 LDLR의 농도 의존적 증가를 보여주는 웨스턴 블롯팅에 의해 평가하였고 LDLR은 3배 이하로 상향 조절된다. 펜토산 (0-200 µg/ml) 항온처리는 50 µg/ml로부터의 농도에서 LDLR의 4배 증가를 유도하였다.
- [0388] 실시예 26: 간 LDLR 수준 상의 펜토산에 대한 효과
- [0389] 펜토산-폴리설페이트는 인간 PCSK9를 발현하는 마우스로 주사하여 PCSK9 유도된 분해로부터 LDLR을 보호하는 물질의 능력을 평가하였다.
- [0390] 이들 연구는 펜토산의 투여가 생체내 증가된 LDLR 수준을 유도함을 확인한다.
- [0391] 실시예 27: 혈청 콜레스테롤 수준에 대한 펜토산의 효과
- [0392] 상승된 혈청 콜레스테롤을 갖는 환자는 펜토산-폴리설페이트의 경구 또는 피하 주사로 처리하여 물질이 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 능력을 평가한다. 펜토산-폴리설페이트는 소화관으로부터 흡착되고 제조업자에 따른 경구 용량의 주입 후 2시간의 메디안을 갖는다. 이어서 콜레스테롤 수준을 측정한다.
- [0393] 이들 연구는 펜토산이 혈청 콜레스테롤의 감소된 수준을 유도함을 확인한다.
- [0394] 실시예 28: 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 S-dC-36은 PCSK9-유도된 분해로부터 LDLR을 보호한다
- [0395] 올리고뉴클레오타이드 s-dC-36 (0.5-5.0 µM)(도 9i-j)과 항온처리된 HepG2 세포는 세포성 LDLR 단백질 (5.0 µM의 S-dC-36에서 2배 증가)의 증가된 수준을 부여주었다. S-dC-36은 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 헤파린 모사체 부류에 속하고 상기 데이터는 S-dC-36이 PCSK9 유도된 분해로부터 LDLR을 보호함을 시사한다.
- [0396] 실시예 29: LDLR 보호를 위한 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 최적 길이의 결정
- [0397] 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 헤파린 결합 단백질에 결합하고 이들의 기능을 억제한다. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드가 다양한 단백질에 비특이적으로 결합하는 능력은 널리 보고되었다 (문헌참조: Yakubov et al., 1993; Stein 1995). 안티센스 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 정상적으

로 표적 mRNA에 특이적으로 결합하기 위한 상보성 염기 서열을 가져 mRNA의 분해를 유도하기 위해 디자인된다.

- [0398] PCSK9에 결합하여 분해로부터 LDLR을 보호하기 위한 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 최적의 길이는 HepG2 세포주를 사용한 세포 배양 검정에서 결정한다. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 염기 서열은 다양한 세포주 및 조직에서의 유전자 발현에 대해 최소 효과를 갖기 위해 선택된다.
- [0399] 실시예 30: LDLR 보호에 대한 최적화된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 효과
- [0400] 최적화된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 인간 PCSK9를 발현하는 마우스에 주사하여 물질이 PCSK9 유도된 분해로부터 LDLR을 보호하는 능력을 평가하였다.
- [0401] 실시예 31: 혈청 콜레스테롤 수준에 대한 최적화된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 효과
- [0402] 최적화된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 상승된 혈청 콜레스테롤을 갖는 환자에게 주사하여 물질이 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 능력을 평가하였다.
- [0403] 실시예 32: LDLR 수준에 대한 미포메르센의 효과
- [0404] HepG2 세포는 미포메르센으로 항온처리하여 물질이 LDLR의 수준을 증가시키는 능력을 평가한다. 미포메르센은 apoB100 안티센스 변형된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 및 콜레스테롤-감소 약물이다. 아포지질단백질 B100에 대한 전령 RNA를 표적화하는 안티센스 치료제이다. 가계성 고콜레스테롤혈증에 대하여 주마다 주사함으로써 투여한다.
- [0405] 이들 연구는 미포메르센이 증가된 LDLR 수준을 유도함을 보여준다.
- [0406] 실시예 33
- [0407] 수라민 또는 PPDAS (피리독살-포스페이트-6-아조페닐-2'-4'-디설폰산)로 처리된 ApoE^{-/-} 마우스는 간 LDLR 수준의 상향 조절을 위해 시험한다. 수라민 및 PPDAS는 apoE^{-/-} 마우스에서 플라크 크기를 감소시키는 것으로 보고되었다 (문헌참조: Guns et al., 2009).
- [0408] 실시예 34
- [0409] 수라민으로 처리된 ApoE^{-/-} 마우스는 간 LDLR 수준의 상향 조절을 위해 시험된다. 수라민은 apoE^{-/-} 마우스 (Guns et al., 2009)에서 플라크 크기를 감소시키는 것으로 보고되었다.
- [0410] -
- [0411] 실시예 36
- [0412] ATP와는 대조적으로, P2Y6-선택적 효능제 UDP는 J774 마크로파아지에서 유도성 산화질소 신타제 및 인터류킨-6의 mRNA 발현 및 활성을 증가시키고; 상기 효과는 수라민 (100-300 mM) 또는 피리독살-포스페이트-6-아조페닐-2'-4'-디설폰산 (PPADS, 10-30 mM)에 의해 차단시킨다. 최종적으로, 수라민 또는 PPADS (50 및 25 mg · kg⁻¹ · day⁻¹ 각각)을 사용한 콜레스테롤-공급 apoE^{-/-}마우스의 4주 치료는 플라크 조성 (상대적 SMC 및 마크로파아지 함량) 또는 세포 복제의 변화 없이 플라크 크기를 감소시킨다.
- [0413] 실시예 37
- [0414] mAb 5E11의 생체내 효과는 10-12 주령 수컷 BALB6/cJRj 마우스에서 시험한다. 5E11 (50-250 μg)의 존재 또는 부재하에 마우스에 0.9 % 식염수 (비히클 대조군) 또는 PCSK9 (10 μg)을 정맥내 (꼬리 정맥) 주사한다. 하나의 구현예에서, 마우스는 주사 1시간 후 수거하고 간 LDLR 표지는 웨스턴 블롯팅에 의해 평가한다. 병행 실험에서, 마우스에 5E11, 및 PCSK9에서 LDL 수용체 결합 부위에 대해 지시된 항체의 1:1 혼합물의 상당량을 주사하여 LDLR 및 HSPG 결합 부위 둘 다를 표적화하는 PCSK9 억제 효과를 평가하였다. 혈장 LDL-c 농도는 주사 후 특정 시점에서 ELISA에 의해 평가한다. 유사한 실험은 mAb 8H4를 사용하여 수행한다.
- [0415] **서열**
- [0416] 서열번호 1: PCSK9 단백질 - NCBI 승인번호: NG_009061.1
- [0417] MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLPAGARAQEDEDGYEELVLA LRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRC AKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLELALKLPVHDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNQCQKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNACQRLAR

AGVVLVTAAGNFRDDACLSPASAPEVITVGATNAQDQPVTGLTGLTGNFGRCDLDFAPGEDII GASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTL
 AELRQRLIHFSAKDVINEAWFPEDQRVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCR
 AHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKE
 HGIPAPQEQVTACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNCTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAIICCRSRHLAQASQELQ*

[0418] 서열번호 2 (3), 4 (5), 6 (7) 및 8 (9)은 지적된 바와 같이 래트 하이브리도마 BNT-8H4-B8/C7-E11, BNT-5E11-D4/G1-E4에 의해 발현되는 면역글로불린 유전자의 가변 영역의 서열 분석에 의해 수득하였다.

[0419] 서열번호 2: BNT-8H4-B8/C7-E11_VK DNA

[0420] gatattgtga tgaccacagtc tccctcactc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact cttagctgca aaggaagtca gaatattaac
 aattacttag cctggtacca acaaaagctc ggagaagctc ccaactcct gatctataat acaaacagtt taciaaacggg catcccatca
 aggttcagtg gcagtgatc tgggtacagat tgcacactca ccatcagaag cctgcagcct gaagatgttg ccacatattt ctgctatcag
 tataacaacg ggaacacggtt tggaggtggg accaagctgg agctgaaa

[0421] 유전자좌 BNT-8H4-B8/C7-E11_VK 318 bp DNA 선형

[0422] 특징 위치/수식어

[0423] J_분절 289.318

[0424] /표지=JK

[0425] V_영역 1 69.264

[0426] /표지=FWR3

[0427] V_영역 103.147

[0428] /표지=FWR2

[0429] V_영역 1.69

[0430] /표지=FWR1

[0431] V_분절 70.102

[0432] /표지=CDR1

[0433] V_분절 148.168

[0434] /표지=CDR2

[0435] V_분절 265.288

[0436] /표지=CDR3

[0437] CDS 1.318

[0438] /표지=VK

[0439] 서열번호 3: BNT-8H4-B8/C7-E11_VK DNA

[0440] DIVMTQSPSLLSASVGDVTLSCKGSQINNYLAWYQQLGEAPKLLIYNTNSLQTGIPSRFSGSGSGTDC
 TLTIRSLQPEDVATYFCYQYNNGNTFGGGTKLELK

[0441] 서열번호 4: BNT-5E11-D4/G1-E4_VK DNA

[0442] gatgtttgtg tgacacaaac tccagttttc ctgtctgtca cacttggaga tcagacttct atatcttgta ggtctagtca gaggctggaa
 tatagtgatg gatacactta tttggaatgg tacctacaga aaccgggcca gtctccacag ctccctcatct atgaagtttc caaccgattt
 tctgggggtcc cagacaggtt cattggcagt gggcicaggga cagatttcac cctcaagatc agcagagtag agcctgagga cttggggagtt
 tattactgct tccaaggtac acatgatcct ctacagttcg gttctgggac caagctggag atcaaaa

[0443] 유전자좌 BNT-5E11-D4/G1-E4_VK 336 bp DNA 선형

[0444] 특징 위치/수식어

[0445]	J_분절	307.336			
[0446]			/표지=JK		
[0447]	V_영역	184.279			
[0448]			/표지=FWR3		
[0449]	V_영역	118.162			
[0450]			/표지=FWR2		
[0451]	V_영역	1.69			
[0452]			/표지=FWR1		
[0453]	V_분절	70.117			
[0454]			/표지=CDR1		
[0455]	V_분절	163.183			
[0456]			/표지=CDR2		
[0457]	V_분절	280.306			
[0458]			/표지=CDR3		
[0459]	CDS	1.336			
[0460]			/표지=VK		
[0461]	서열번호 5: BNT-5E11-D4/G1-E4_VK 단백질				
[0462]	DVVLTQTPVFLSVTLGDQTSISCRSSQSLEYS DGYTYLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRFS GVPDRF I GSGSGTDFTLKI SRVEPEDLGVYYCFQGT HDPLT FGSGTKLEIK				
[0463]	서열번호 6: BNT-5E11-D4/G1-E4_VH DNA				
[0464]	유전자좌	BNT-5E11-D4/G1-E4_VH	336 bp	DNA	선형
[0465]	특징	위치/수식어			
[0466]	J_분절	304.336			
[0467]			/표지=JH		
[0468]	V_영역	199.294			
[0469]			/표지=FWR3		
[0470]	V_영역	109.150			
[0471]			/표지=FWR2		
[0472]	V_영역	1.90			
[0473]			/표지=FWR1		
[0474]	V_분절	91.108			
[0475]			/표지=CDR1		
[0476]	V_분절	151.198			
[0477]			/표지=CDR2		
[0478]	V_분절	295.303			
[0479]			/표지=CDR3		

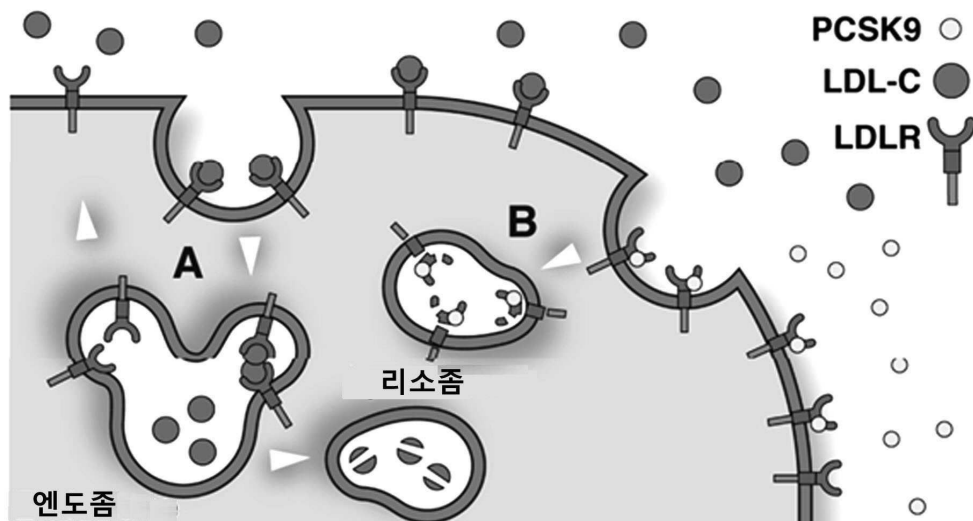
- [0480] CDS 1.336
- [0481] /표지=VH
- [0482] gaggtgcagc tgcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cttcacagtc actctccctc acctgttctg tcaactggta caccattacc
 agtggttatg attggagctg gatccggagg ttcccaggaa atacaatgga gtggatggga gacataagtt acagtggtag cactaactac
 aacccatcgc tcaaaagtcg agtctccatt acaagagaca catccaagaa tcagttcttc ctgcagtga actctgtaac tactggggat
 acagccacat attactgtgc aaaactacc ggctggggcc aaggcactct ggctactgtc tcttca
- [0483] 서열번호 7: BNT-5E11-D4/G1-E4_VH 단백질
- [0484] EVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYTITSGYDWSWIRRFPGNTMEWMGDISYSGSTNYNPSLKSRSVITRDTSKNQFFLQLNSVTGDTATYYCAKLPGW
 GQGTLVTVSS
- [0485] 서열번호 8: BNT-8H4-B8/C7-E11_VH DNA
- [0486] 유전자좌 BNT-8H4-B8/C7-E11_VH 354 bp DNA 서열번호 09-MAR-2016
- [0487] 특징 위치/수식어
- [0488] J_분절 322.354
- [0489] /표지=JH
- [0490] V_영역 202.297
- [0491] /표지=FWR3
- [0492] V_영역 112.153
- [0493] /표지=FWR2
- [0494] V_영역 1.90
- [0495] /표지=FWR1
- [0496] V_분절 91.111
- [0497] /표지=CDR1
- [0498] V_분절 154.201
- [0499] /표지=CDR2
- [0500] V_분절 298.321
- [0501] /표지=CDR3
- [0502] CDS 1.354
- [0503] /표지=VH
- [0504] caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cttcccagac cctcagctcg acttgccttt tctctgggtt ttcactgagc
 agttcaggta tatgtgtgag ctggattcgt cagccttcag ggaagggtct ggagtggctg gcaactatth gtgggagga tagtaagggc
 tacaaccctt ctctgaagaa ccggctcacg atctccaagg acacctcaa caaccaagca ctctcagga tcaccagtgt ggacactgca
 gataccgcca ttactactgt tgctcgggtt tattactggt actttgactt ctggggccca ggaacctatg tcaccgtgtc ctca
- [0505] 서열번호 9: BNT-8H4-B8/C7-E11_VH 단백질
- [0506] QVTLKESGPGILQPSQTLTCSFSGFSLSSSGICVSWIRQPSGKLEWLATICWEDSKGYNPSLKNRLTISKDTSNNQALLRITSVDTADTAIYYCARVYY
 WYDFWGPMTVTVSS
- [0507] 서열번호 10 - 서열번호 7의 CDR1
- [0508] SGYDWS
- [0509] 서열번호 11 - 서열번호 7의 CDR2

- [0510] DISYSGSTNY NPSLKS
- [0511]
- [0512] 서열번호 12 - 서열번호 7의 CDR3
- [0513] LPG
- [0514] 서열번호 13 - 서열번호 5의 CDR1
- [0515] RSSQSLEYSYD GYTYLE
- [0516] 서열번호 14 - 서열번호 5의 CDR2
- [0517] EVSNRFS
- [0518] 서열번호 15 - 서열번호 5의 CDR3
- [0519] FQGTHDPLT
- [0520] 서열번호 16 - 서열번호 9의 CDR1
- [0521] SSGICVS
- [0522]
- [0523] 서열번호 17 - 서열번호 9의 CDR2
- [0524] TICWEDSKGY NPSLKN
- [0525] 서열번호 18 - 서열번호 9의 CDR3
- [0526] VYYWYFDF
- [0527] 서열번호 19 - 서열번호 3의 CDR1
- [0528] KGSQNINNYL A
- [0529] 서열번호 20 - 서열번호 3의 CDR2
- [0530] NTNSLQT
- [0531] 서열번호 21 - 서열번호 3의 CDR2
- [0532] YQYNNGNT
- [0533] 문헌 참조
- [0534] Benimetskaya et al. (1995) *Nucleic Acids Res* 23: 4239-4245
- [0535] Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426.
- [0536] Chan et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 16;106(24):9820-5. doi: 10.1073/pnas.0903849106
- [0537] Cunningham et al. (2007) *Nat Struct Mol Biol*. 14(5): p. 413-9.
- [0538] Fisher et al. (2007) *J Biol Chem*. 282(28): p. 20502-12.
- [0539] Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik. (1995) *Nature*. 374, 168-173.
- [0540] Guns et al., 2009. *British Journal of Pharmacology* (2010), 159, 326-336
- [0541] Gustafsen et al. (2014) *Cell Metab* 19(2): p. 310-8
- [0542] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. (1993) *Nature*. 363(6428):446-8.
- [0543] Herbert *et al.*, *Circ Res* 79, 590-600 (1996).
- [0544] Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 90: 6444-6448.
- [0545] Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883.

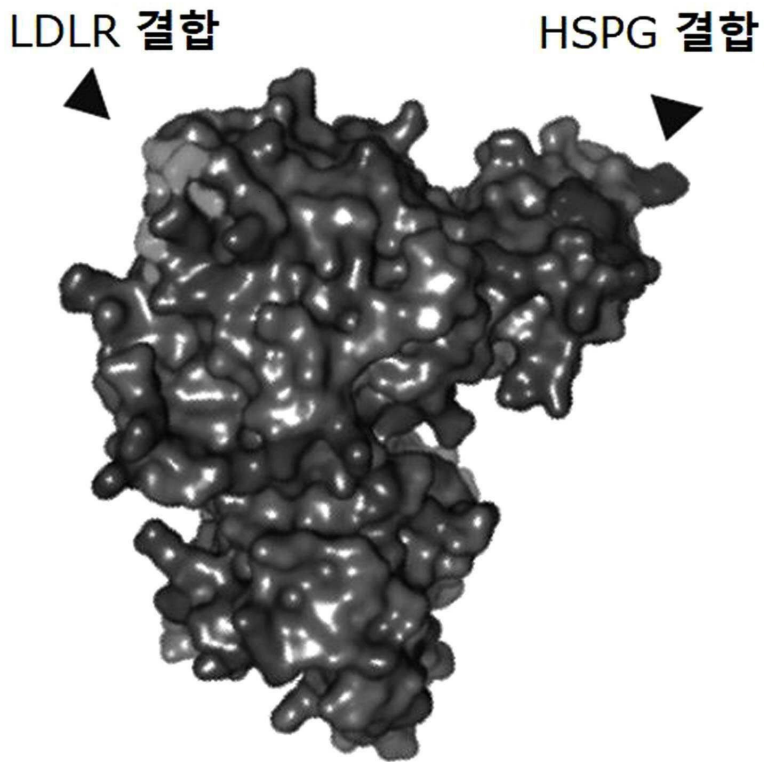
- [0546] Jerabek-Willemsen et al. (2011) *Assay Drug Dev Technol.* 9(4): p. 342-53.
- [0547] Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495.
- [0548] Lagace et al. (2006) *J Clin Invest.* 2006 Nov;116(11):2995-3005
- [0549] Lakoski et al. (2009) *J Clin Endocrinol Metab.* 94(7): p. 2537-43.
- [0550] Lima et al., *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1794(6):873-81.
- [0551] Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368 (6474):856-859.
- [0552] Munck Petersen et al (1999) *EMBO J* 18(3):595-604.
- [0553] McCoy, A.J., et al., Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity. *J Mol Biol*, 2003. 326(3): p. 823-33.
- [0554] Nour-Eldin HH, Hansen BG et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34(18):e122.
- [0555] Piper et al. (2007). *Structure*, 2007. 15(5): p. 545-52.
- [0556] Reiter Y, Brinkmann U, et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269(15):18327-31.
- [0557] Seidah et al. (2014) *Circ Res.* 2014 Mar 14;114(6):1022-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301621
- [0558] Sheridan (2013). *Nat Biotechnol.* 2013 Dec;31(12):1057-8. doi: 10.1038/nbt1213-1057.
- [0559] Soderberg *et al.*, *Nat Methods* 3, 995-1000 (2006).
- [0560] Stein et al. (1995) *Nat Med* 1: 1119-1121.
- [0561] Villiers BR, Stein V, Hollfelder F. (2010) *Protein Eng Des Sel.* 23(1):1-8.
- [0562] Ward ES, GuD, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. (1989) *Nature* 341:544-546.
- [0563] Wozniak-Knopp G, Stadlmann J, RuF (2012) *PLoS ONE* 7(1): e30083.
- [0564] Yabukov et al. (1993) *J Biol Chem.* 268(25):18818-23.
- [0565] Xu and Esko (2014) *Annu Rev Biochem.* 2014;83:129-57

도면

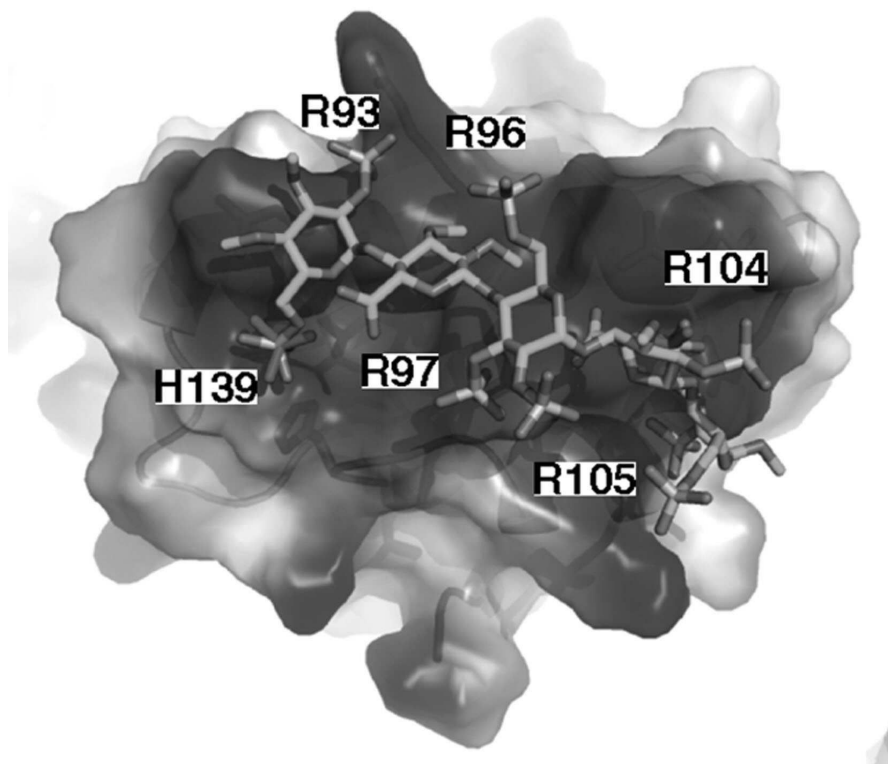
도면1



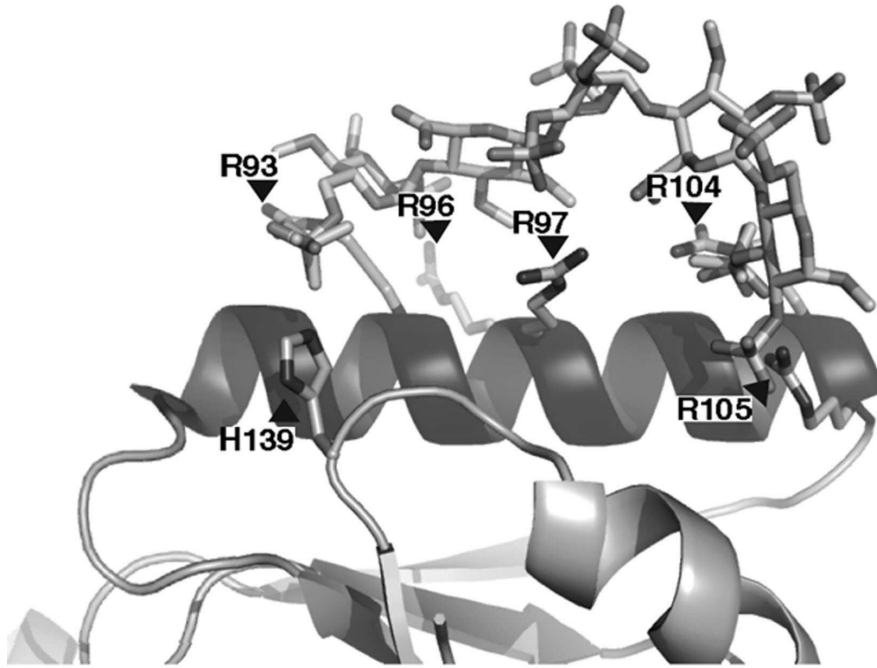
도면2a



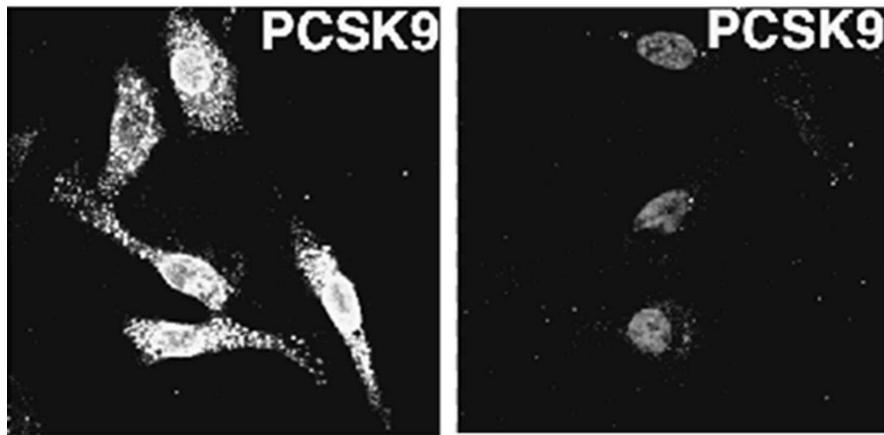
도면2b



도면2c



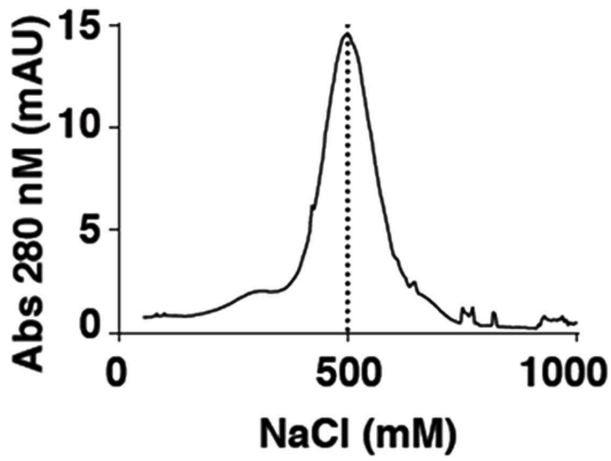
도면2d



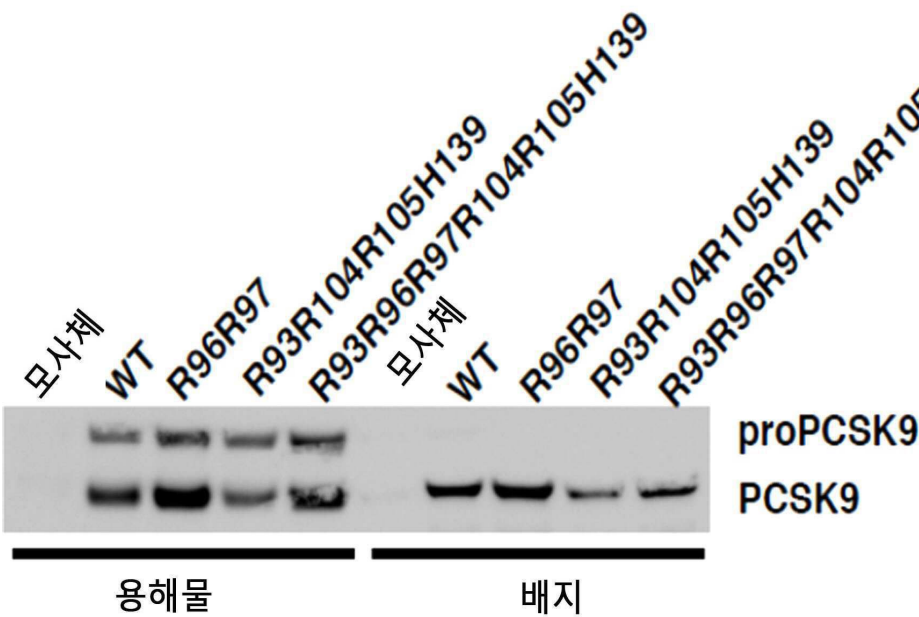
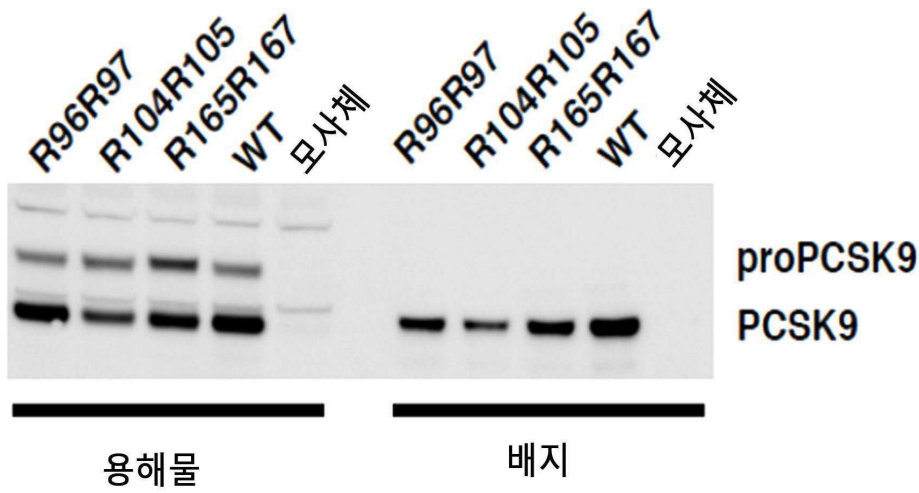
PBS

헤파리나제

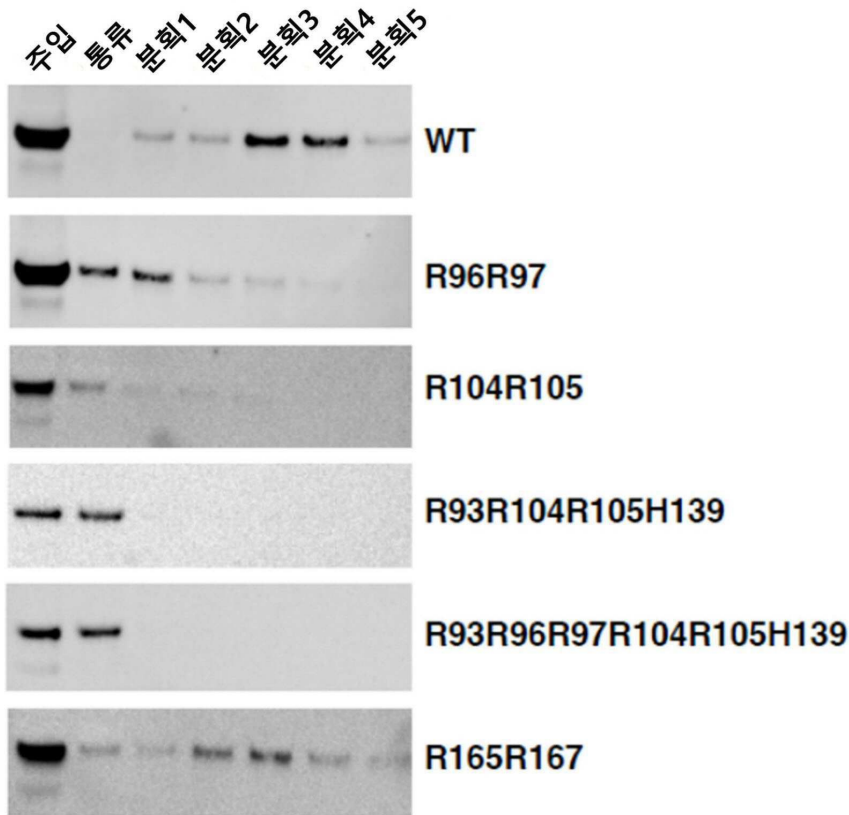
도면2e



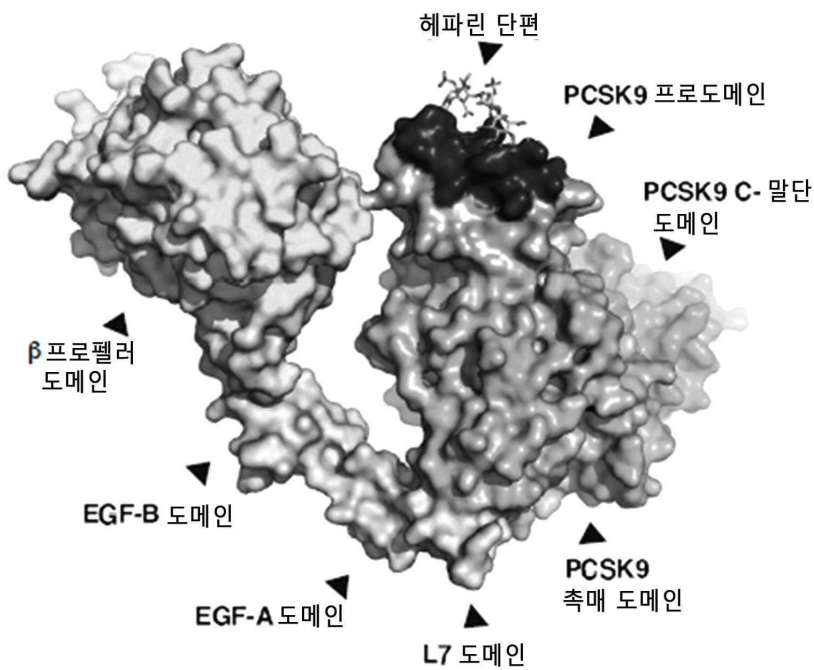
도면3a



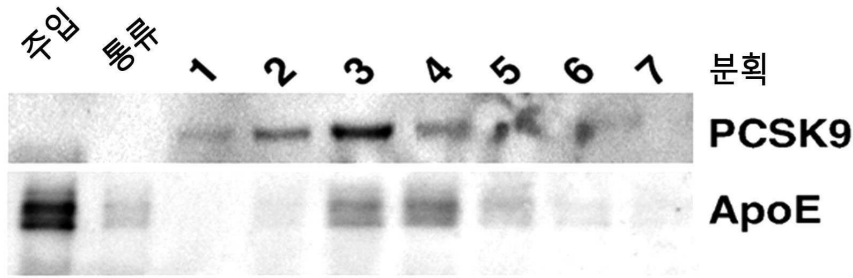
도면3b



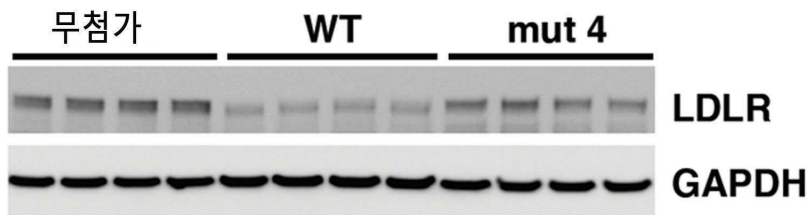
도면3c



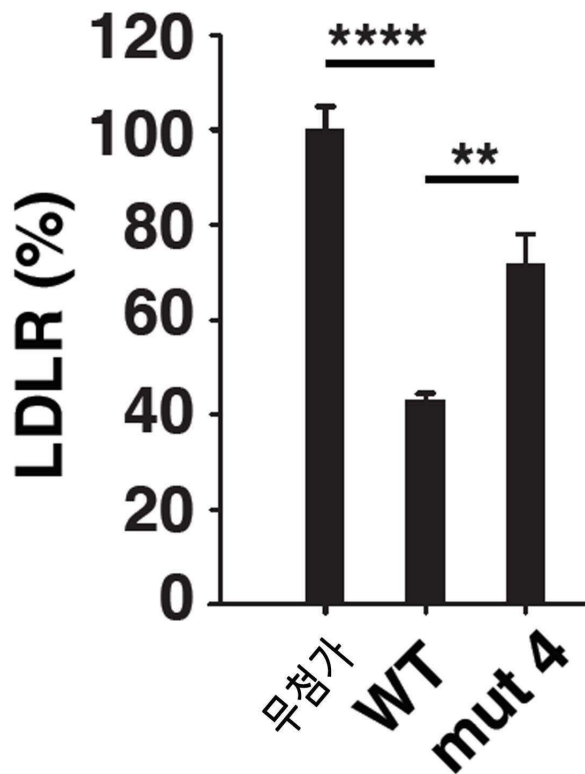
도면3d



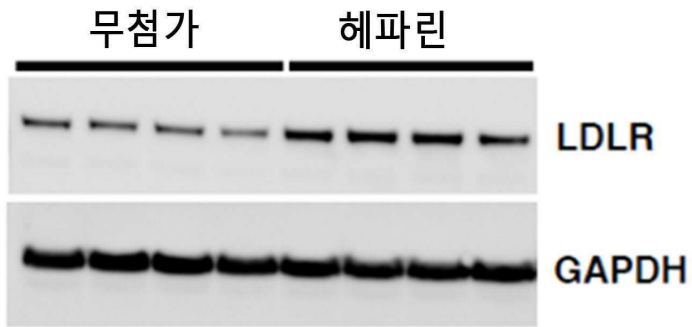
도면4a



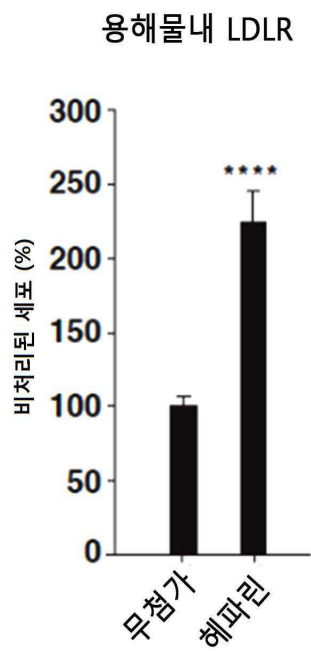
도면4b



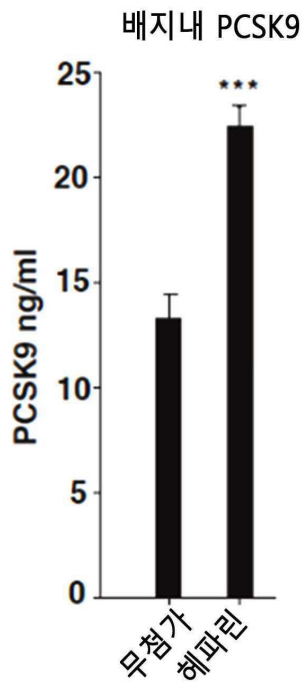
도면5a



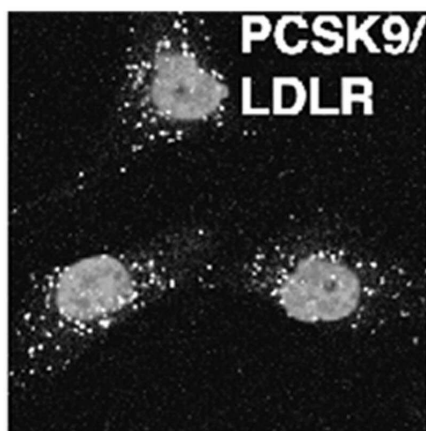
도면5b



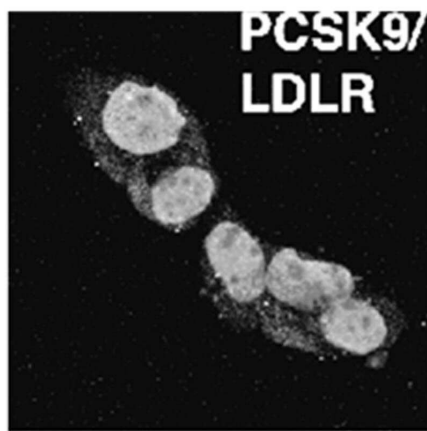
도면5c



도면5d

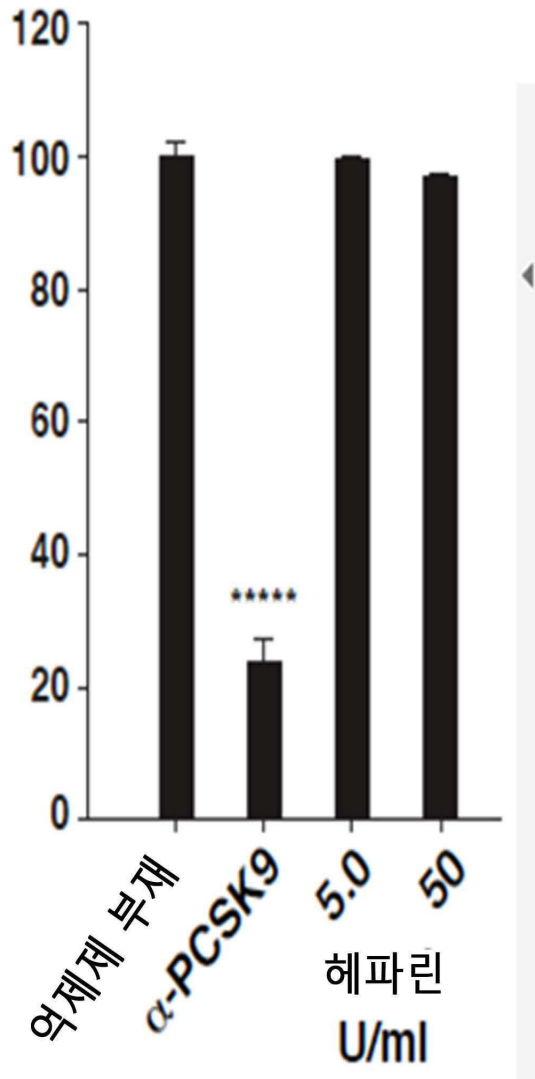


PBS

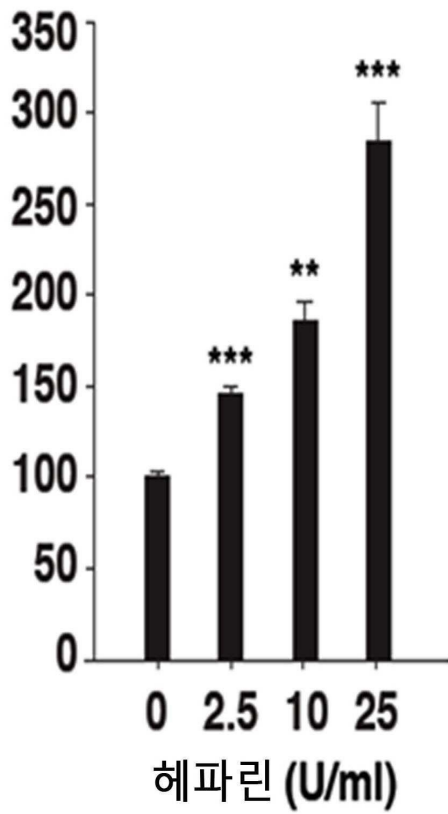


헤파린

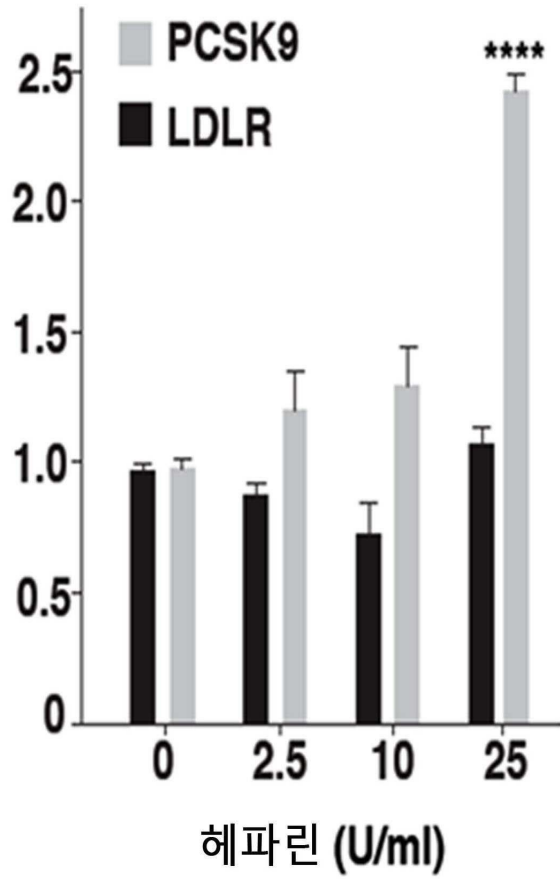
도면6a



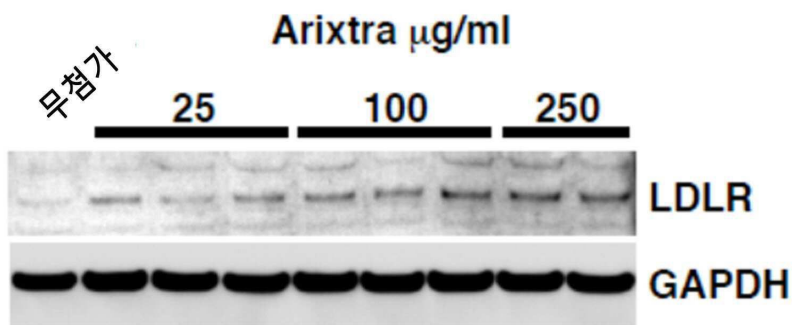
도면6b



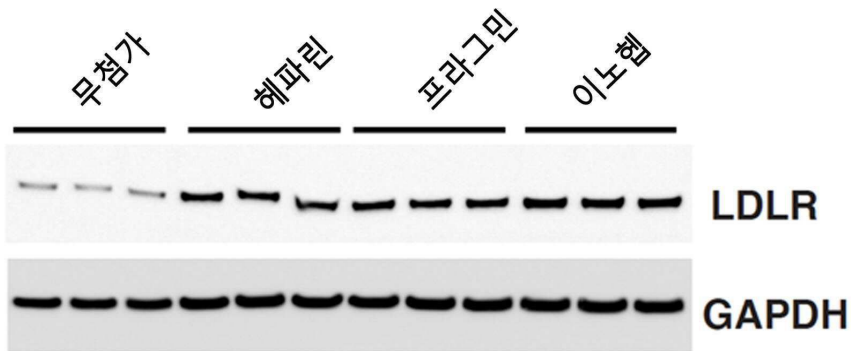
도면6c



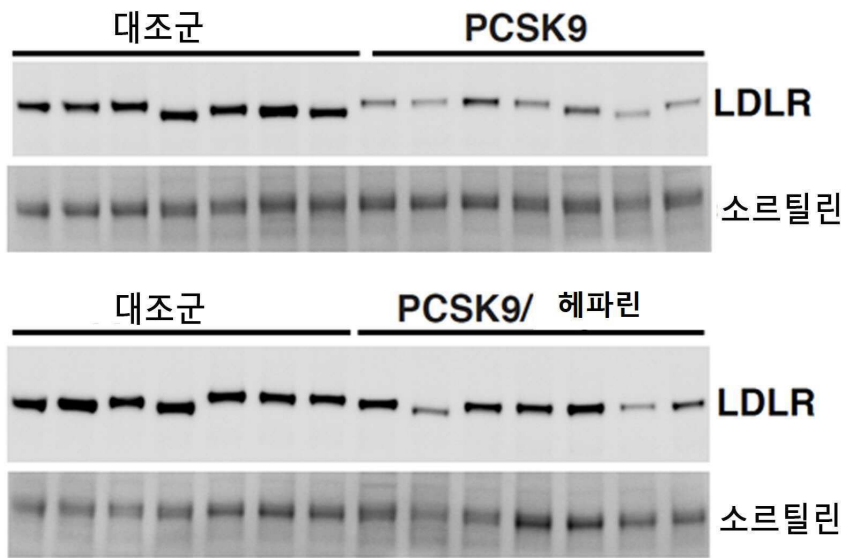
도면7



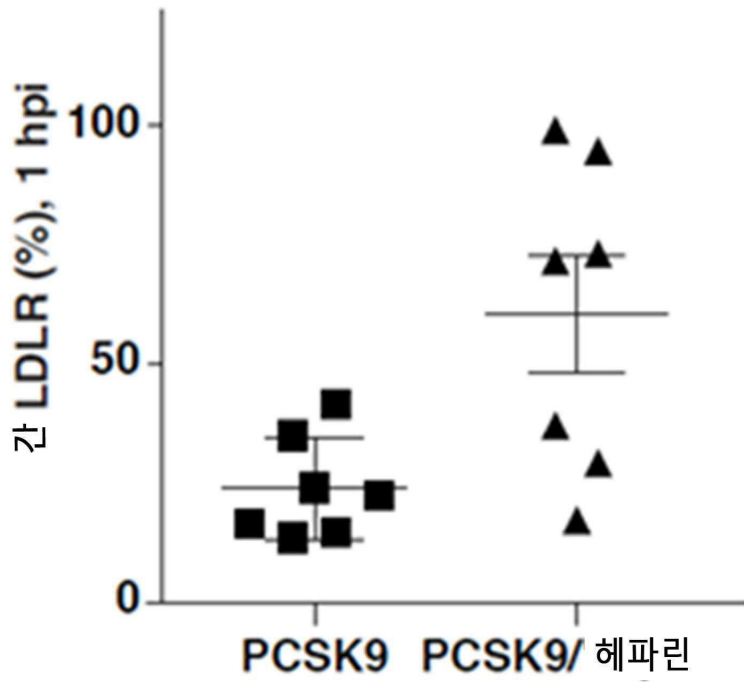
도면8a



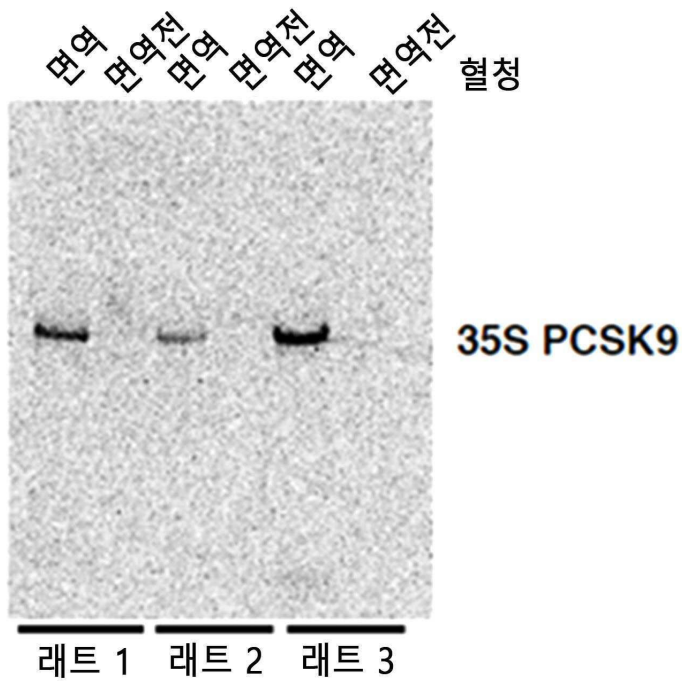
도면8b



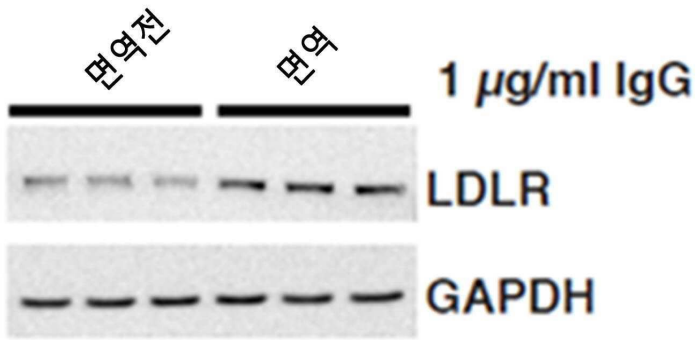
도면8c



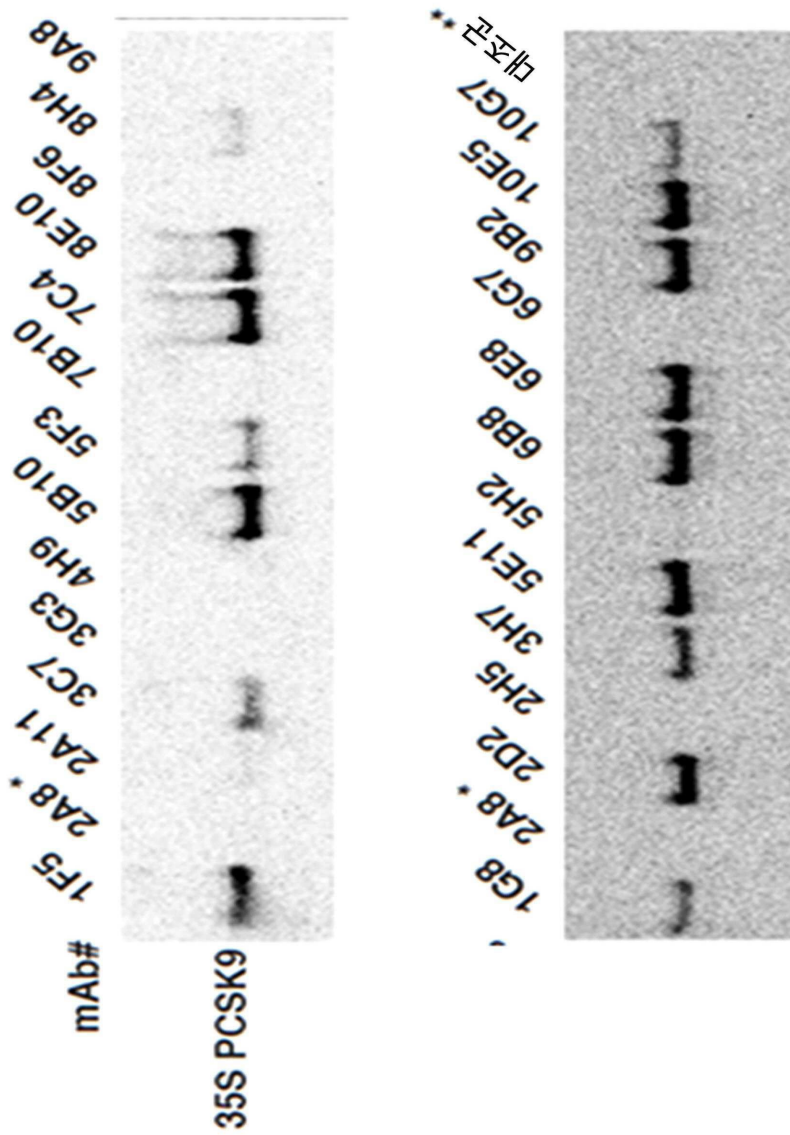
도면8d



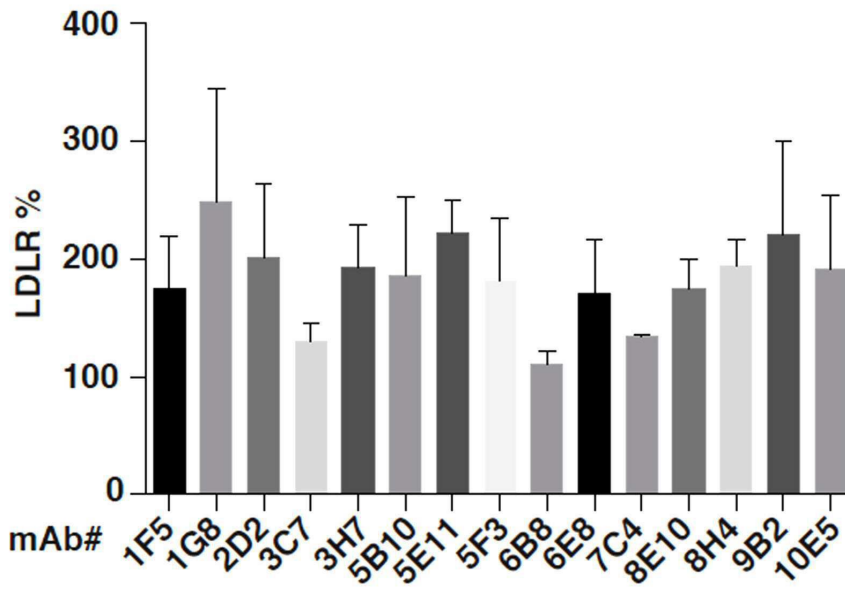
도면8e



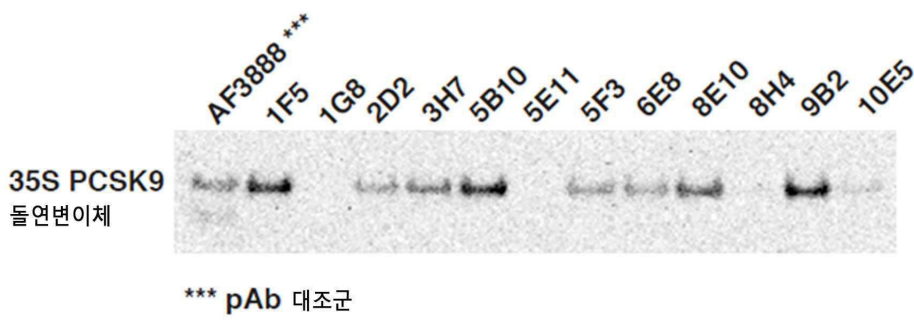
도면8f



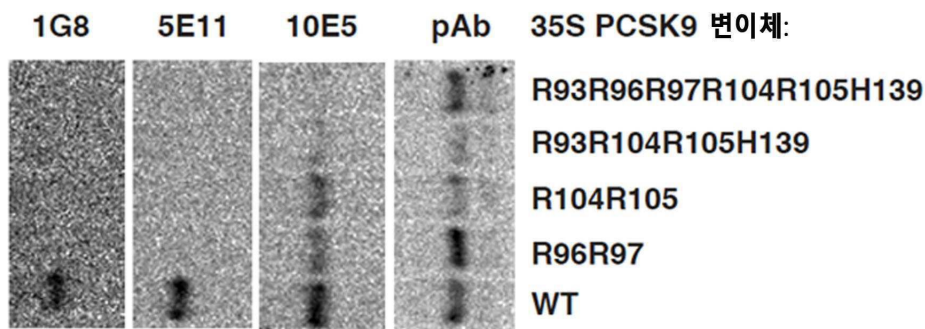
도면8g



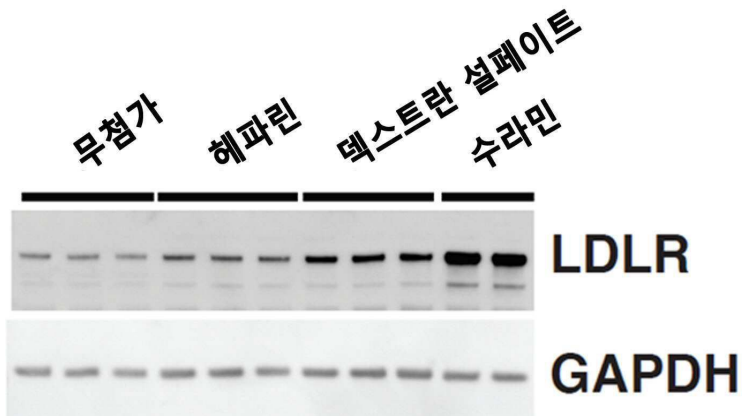
도면8h



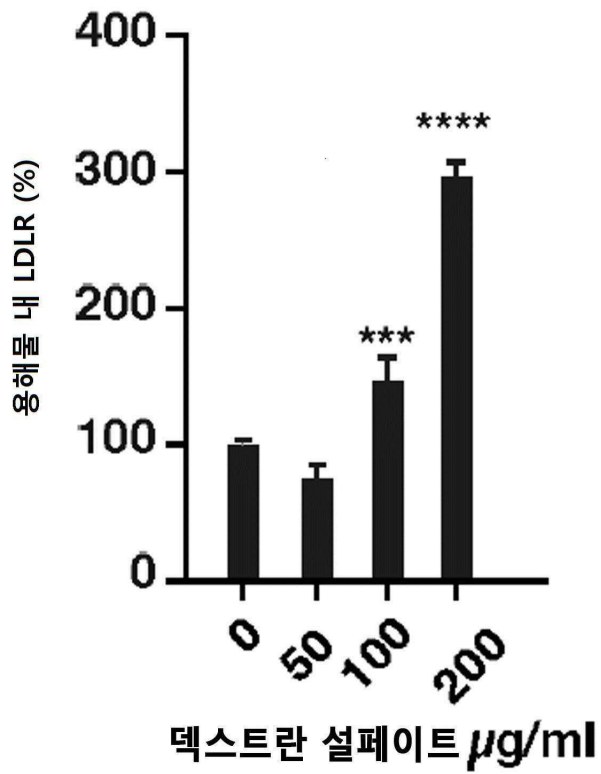
도면8i



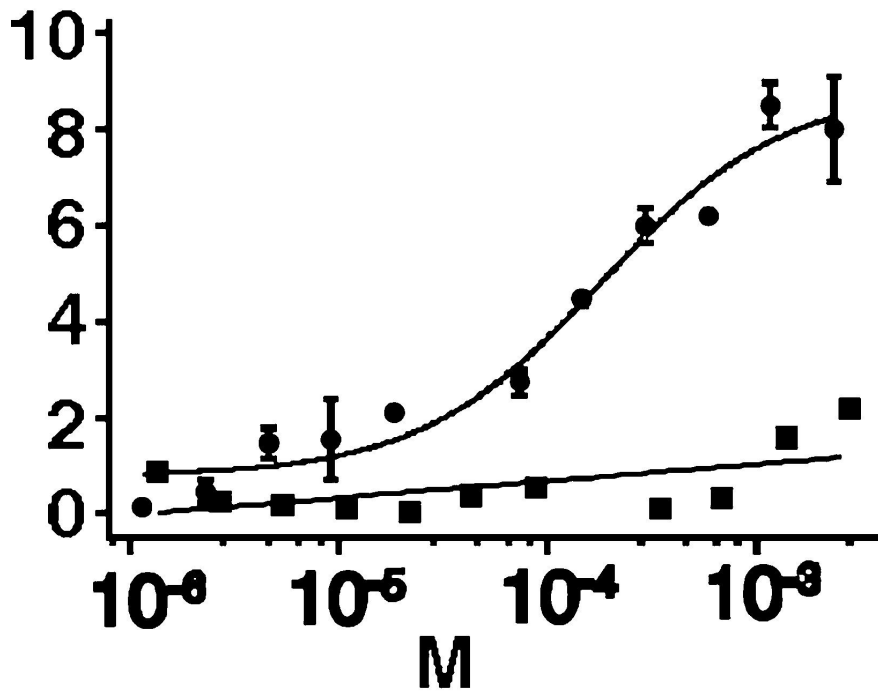
도면9a



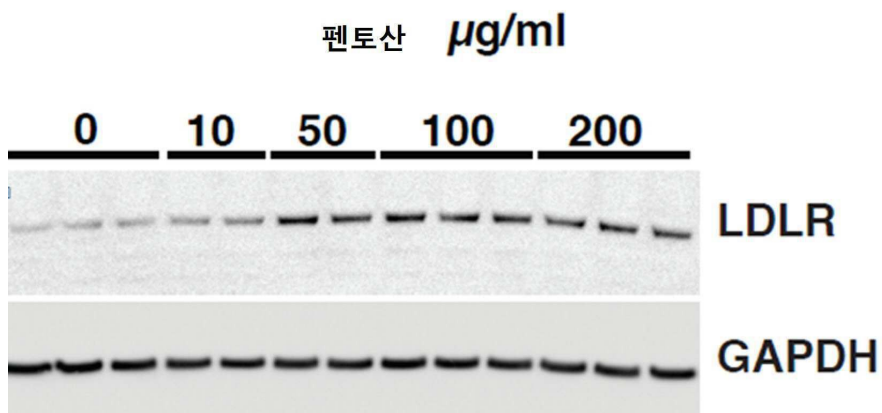
도면9b



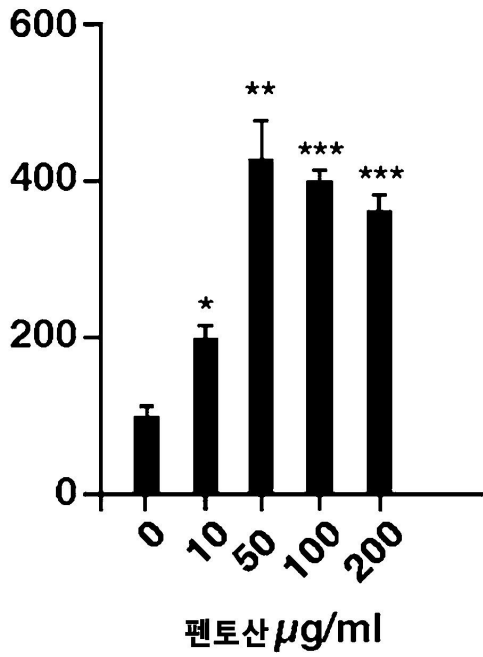
도면9c



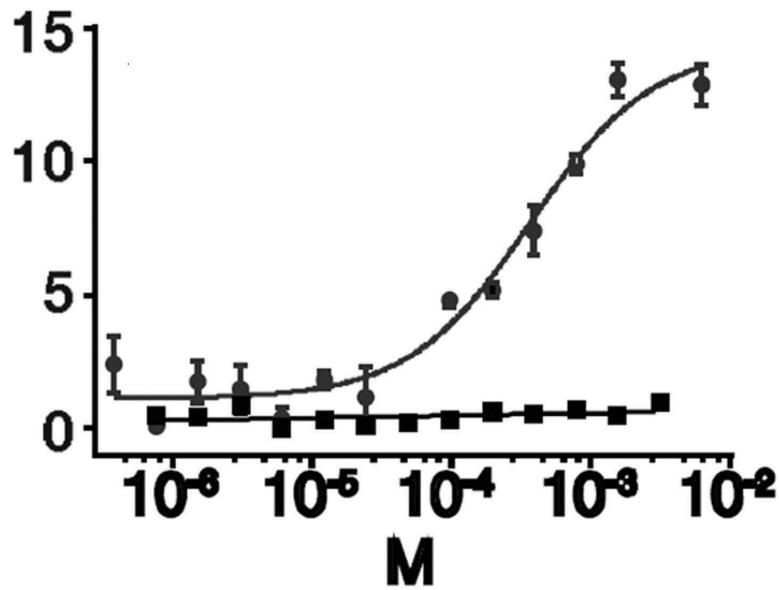
도면9d



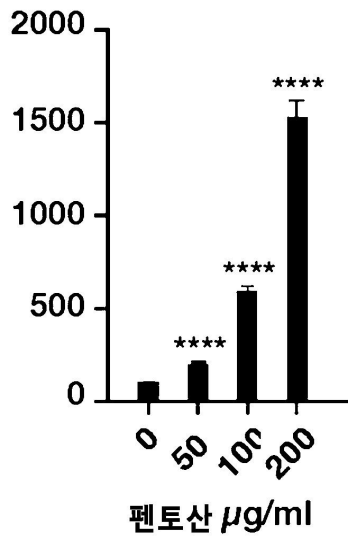
도면9e



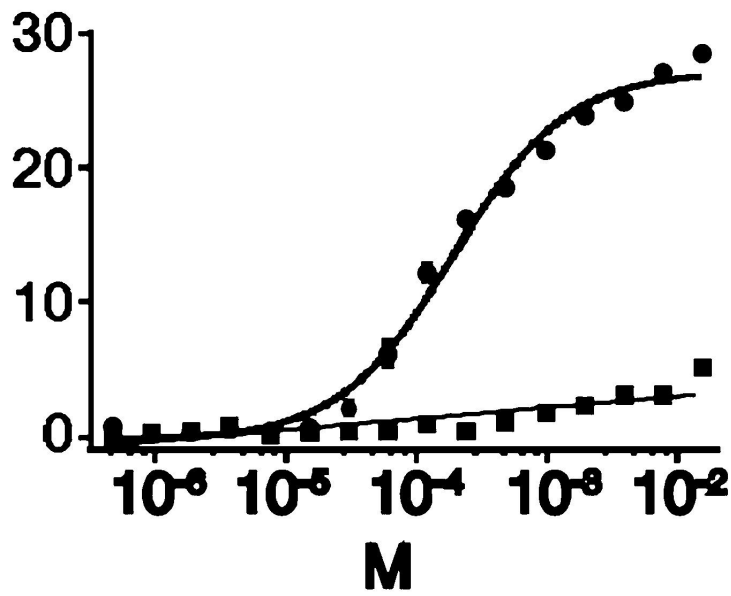
도면9f



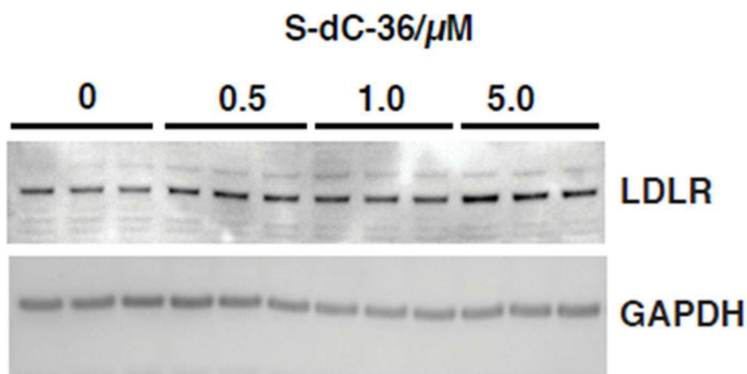
도면9g



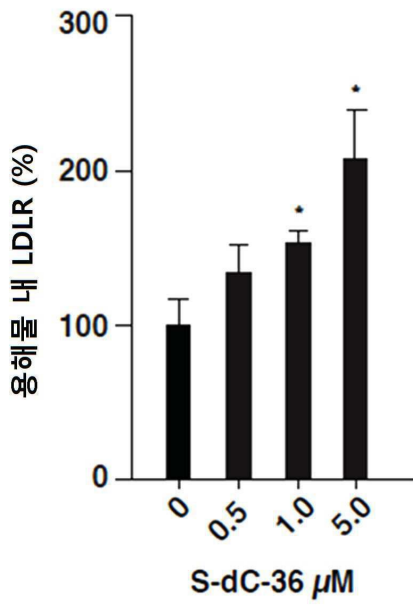
도면9h



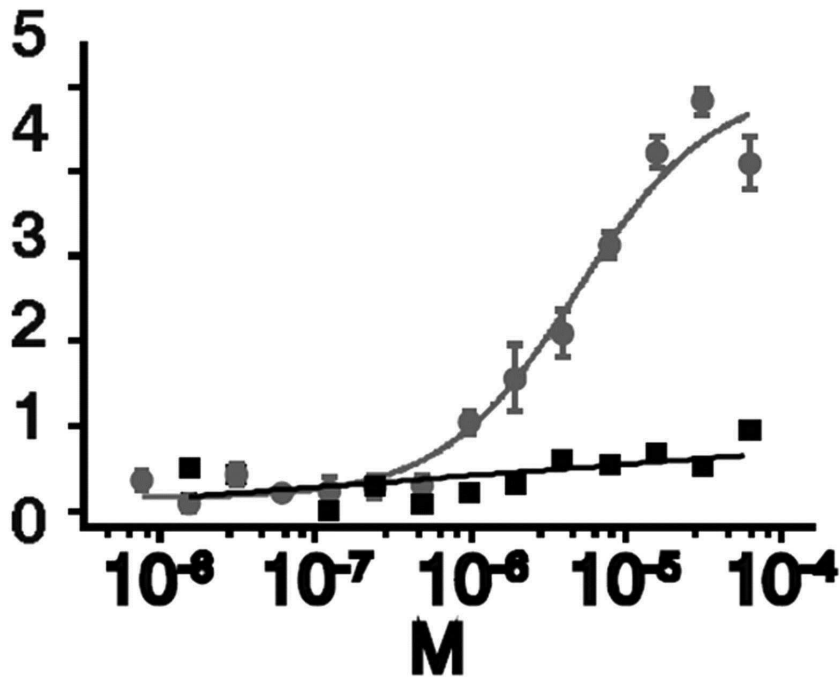
도면9i



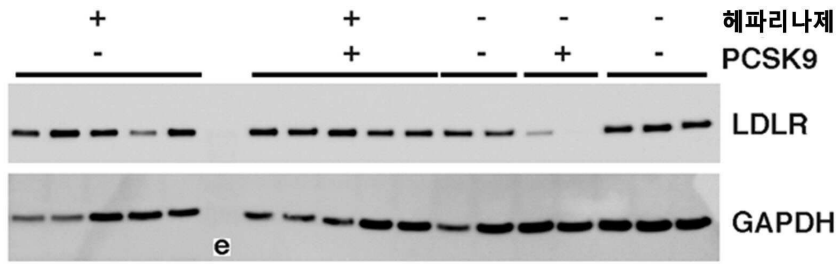
도면9j



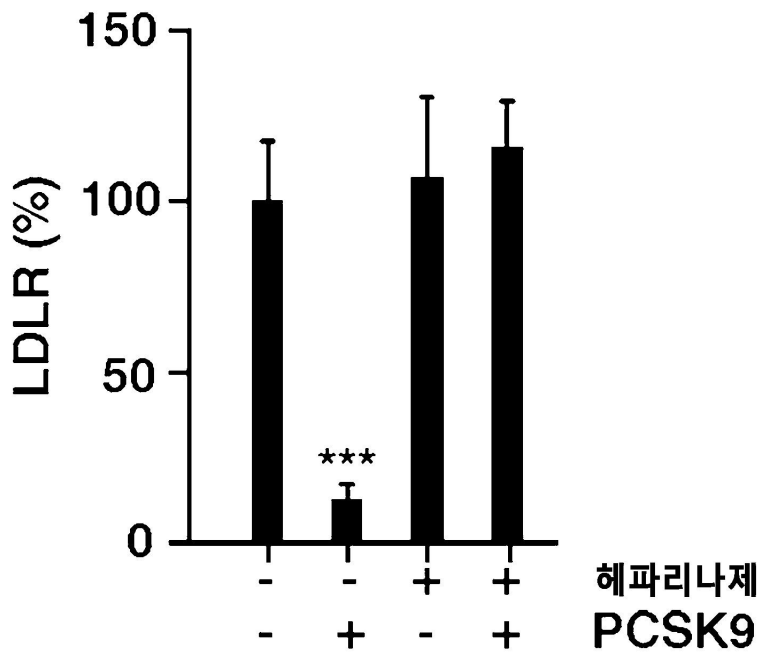
도면9k



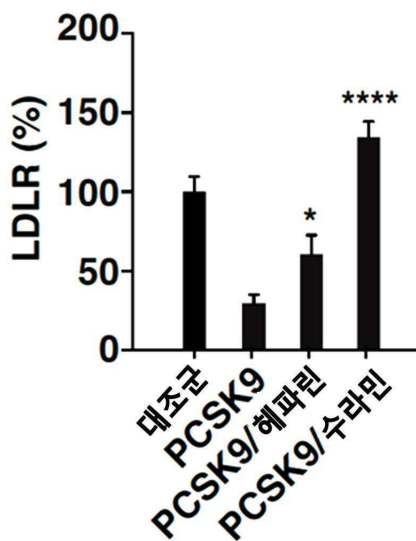
도면10a



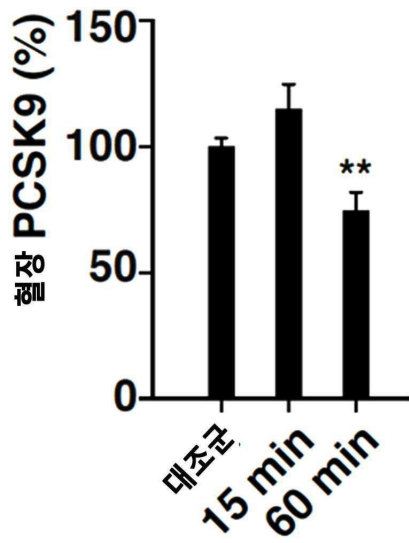
도면10b



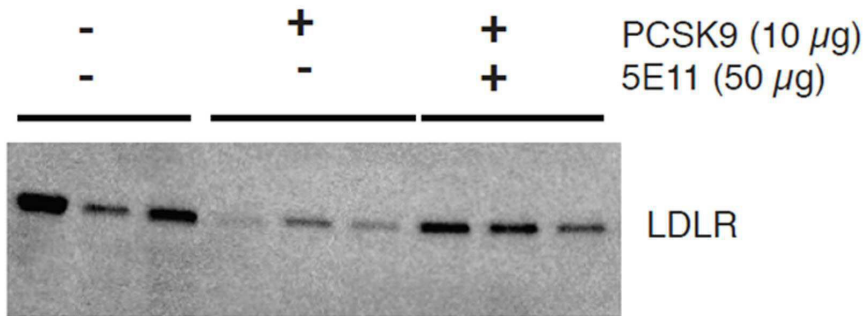
도면10c



도면10d

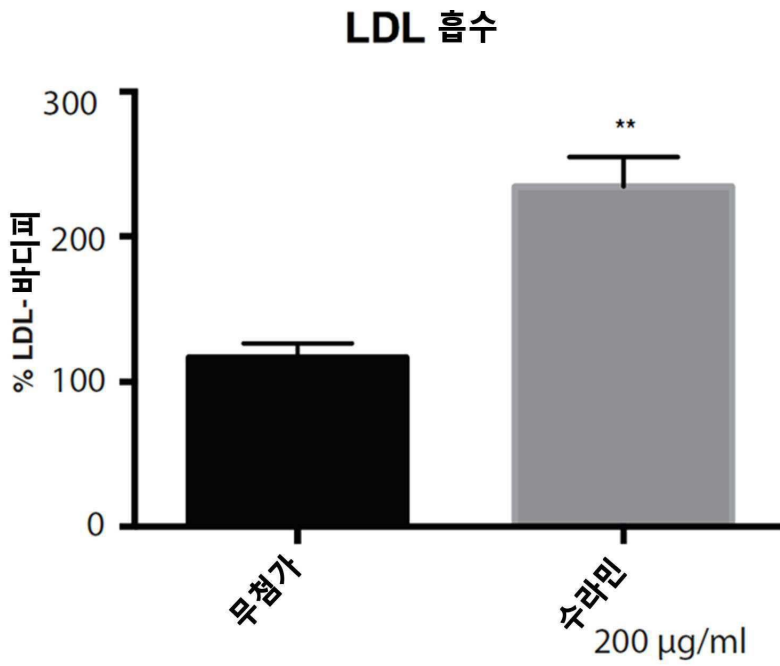


도면11

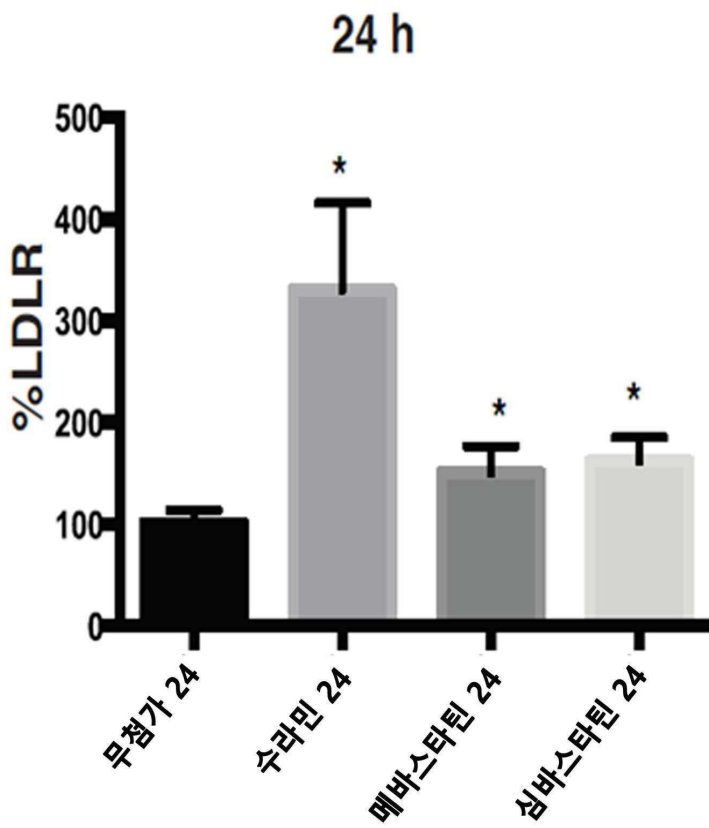


주사 1시간 후 마우스 간 LDLR1

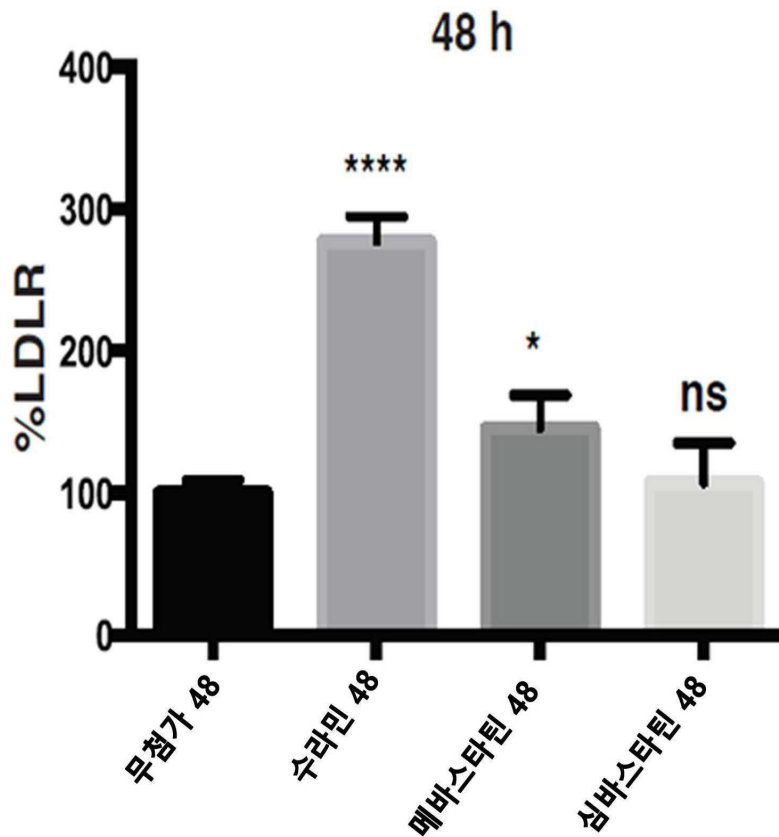
도면12



도면13a



도면13b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Aarhus Universitet

<120> INHIBITORS OF PCSK9 FOR TREATMENT OF LIPOPROTEIN METABOLISM DISORDERS

<130> IPA171000-DK

<150> PA 2015 70158

<151> 2015-03-20

<150> PA 2015 70623

<151> 2015-10-02

<150> PA 2015 70839

<151> 2015-12-21

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 692

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> BINDING
<222> (78)..(167)
<223> HSPG binding site
<220><221> MISC_FEATURE
<222>
(93)..(93)
<223> R93
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (96)..(96)
<223> R96
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(97)
<223> R97
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (104)..(104)
<223> R104
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> R105
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (136)..(136)
<223> K136
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (139)..(139)
<223> H139
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (165)..(165)
<223> R165
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (167)..(167)
<
223> R167
<400> 1

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

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

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

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

Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val Cys Arg Ala His
 500 505 510

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

Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ala
 530 535 540

Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly His Val Leu Thr
 545 550 555 560

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

Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly His Arg
 580 585 590

Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu Glu Cys
 595 600 605

Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val Thr Val
 610 615 620

Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu Pro Gly
 625 630 635 640

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

Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Glu Gly Ala Val
 660 665 670

Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser
 675 680 685

Gln Glu Leu Gln
 690

<210> 2

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequences obtained by sequencing of the variable regions of the

immunoglobulin genes expressed by rat hybridomas

BNT-8H4-B8/C7-E11, BNT-5E11-D4/G1-E4

<220><221> CDS

<222> (1)..(318)

<223> BNT-8H4-B8/C7-E11_VK

<220><221> V_region

<222> (1)..(69)

<220><221> V_segment

<222> (70)..(102)

<223> CDR1

<220><221> V_region

<222> (103)..(147)

<220><221> V_segment

<222> (148)..(168)

<223> CDR2

<220><221> V_region

<222> (169)..(264)

<220><221> V_segment

<222> (265)..(288)

<223> CDR3

<220><221> J_segment

<222> (289)..(318)

<400> 2

gat att gtg atg acc cag tct ccc tca ctc ctg tct gca tct gtg gga 48

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

1 5 10 15

gac aga gtc act ctt agc tgc aaa gga agt cag aat att aac aat tac 96

Asp Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr

20 25 30

tta gcc tgg tac caa caa aag ctc gga gaa gct ccc aaa ctc ctg atc 144

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

tat aat aca aac agt tta caa acg ggc atc cca tca agg ttc agt ggc 192

Tyr Asn Thr Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggt aca gat tgc aca ctc acc atc aga agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Cys Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat gtt gcc aca tat ttc tgc tat cag tat aac aac ggg aac acg 288
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Asn Thr
 85 90 95
 ttt gga ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa 318
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Cys Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Asn Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 4

<211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Sequences obtained by sequencing of the variable regions of the

immunoglobulin genes expressed by rat hybridomas

BNT-8H4-B8/C7-E11, BNT-5E11-D4/G1-E4

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<223> BNT-5E11-D4/G1-E4_VK

<220><221> V_region

<222> (1)..(69)

<223> FWR1

<220><221> V_segment

<222> (70)..(117)

<223> CDR1

<220><221> V_region

<222> (118)..(162)

<223> FWR2

<220><221> V_segment

<222> (163)..(183)

<223> CDR2

<220><221> V_region

<222> (184)..(279)

<223> FWR3

<220><221> V_segment

<222> (280)..(306)

<223>

> CDR3

<220><221> J_segment

<222> (307)..(336)

<223> JK

<400> 4

gat gtt gtg ttg aca caa act cca gtt ttc ctg tct gtc aca ctt gga

48

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

1 5 10 15
gat cag act tct ata tct tgt agg tct agt cag agt ctg gaa tat agt 96
Asp Gln Thr Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser

20 25 30

gat gga tac act tat ttg gaa tgg tac cta cag aaa ccg ggc cag tct 144
Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

cca cag ctc ctc atc tat gaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

gac agg ttc att ggc agt ggg tca ggg aca gat ttc acc ctc aag atc 240

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

65 70 75 80

agc aga gta gag cct gag gac ttg gga gtt tat tac tgc ttc caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

aca cat gat cct ctc acg ttc ggt tct ggg acc aag ctg gag atc aaa 336
Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

100 105 110

- <210> 6
- <211> 336
- <212> DNA
- <213> Artificial sequence
- <220><223> Sequences obtained by sequencing of the variable regions of the immunoglobulin genes expressed by rat hybridomas
 BNT-8H4-B8/C7-E11, BNT-5E11-D4/G1-E4
- <220><221> CDS
- <222> (1)..(336)
- <223> BNT-5E11-D4/G1-E4_VH
- <220><221> V_region
- <222> (1)..(90)
- <223> FWR1
- <220><221> V_segment
- <222> (91)..(108)
- <223> CDR1
- <220><221> V_region
- <222> (109)..(150)
- <223> FWR2
- <220><221> V_segment
- <222> (151)..(198)
- <223> CDR2
- <220><221> V_region
- <222> (199)..(294)
- <223> FWR3

<220><221> V_segment
 <222> (295)..(303)
 <223> CDR3
 <220><221> J_segment
 <222> (304)..(336)
 <223> JH
 <400> 6

gag gtg cag ctg cag gag tca gga cct ggc ctt gtg aaa cct tca cag 48
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

tca ctc tcc ctc acc tgt tct gtc act ggt tac acc att acc agt ggt 96
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Thr Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

tat gat tgg agc tgg atc cgg agg ttc cca gga aat aca atg gag tgg 144
 Tyr Asp Trp Ser Trp Ile Arg Arg Phe Pro Gly Asn Thr Met Glu Trp
 35 40 45

atg gga gac ata agt tac agt ggt agc act aac tac aac cca tcg ctc 192

Met Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

aaa agt cga gtc tcc att aca aga gac aca tcc aag aat cag ttc ttc 240
 Lys Ser Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

ctg cag ttg aac tct gta act act ggg gat aca gcc aca tat tac tgt 288
 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aaa cta ccc ggc tgg ggc caa ggc act ctg gtc act gtc tct tca 336
 Ala Lys Leu Pro Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Thr Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Asp Trp Ser Trp Ile Arg Arg Phe Pro Gly Asn Thr Met Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Leu Pro Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 8

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequences obtained by sequencing of the variable regions of the
 immunoglobulin genes expressed by rat hybridomas
 BNT-8H4-B8/C7-E11, BNT-5E11-D4/G1-E4

<220><221> CDS

<222> (1)..(354)

<223> BNT-8H4-B8/C7-E11_VH

<220><221> V_region

<222> (1)..(90)

<223> FWR1

<220><221> V_segment

<222> (91)..(111)

<223> CDR1

```

<220><221> V_region
<222> (112)..(153)
<223> FWR2
<220><221> V_segment
<222> (154)..(201)
<223> CDR2
<220><221> V_region
<222> (202)..(297)
<223> FWR3
<220><221> V_segment
<222> (298)..(321)
<223> CDR3
<220><221> J_segment
<222> (322)..(354)
<223> JH
<400> 8
cag gtt act ctg aaa gag tct ggc cct ggg ata ttg cag cct tcc cag      48

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1           5           10           15
acc ctc agt ctg act tgc tct ttc tct ggg ttt tca ctg agc agt tca      96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Ser
           20           25           30
ggg ata tgt gtg agc tgg att cgt cag cct tca ggg aag ggt ctg gag      144
Gly Ile Cys Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

           35           40           45
tgg ctg gca act att tgt tgg gag gat agt aag ggc tac aac cct tct      192
Trp Leu Ala Thr Ile Cys Trp Glu Asp Ser Lys Gly Tyr Asn Pro Ser

           50           55           60
ctg aag aac cgg ctc acg atc tcc aag gac acc tcc aac aac caa gca      240
Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Ala

65           70           75           80
ctc ctc agg atc acc agt gtg gac act gca gat acc gcc att tac tac      288

```

Leu Leu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95
 tgt gct cgg gtt tat tac tgg tac ttt gac ttc tgg ggc cca gga acc 336
 Cys Ala Arg Val Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly Thr
 100 105 110
 atg gtc acc gtg tcc tca 354

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Ser
 20 25 30

Gly Ile Cys Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Thr Ile Cys Trp Glu Asp Ser Lys Gly Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Ala
 65 70 75 80

Leu Leu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Val Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR1 of SEQ ID NO: 7

<400> 10

Ser Gly Tyr Asp Trp Ser

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR2 of SEQ ID NO: 7

<400> 11

Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR3 of SEQ ID NO: 7

<400> 12

Leu Pro Gly

1

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR1 of SEQ ID NO: 5

<400> 13

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

1 5 10 15

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR2 of SEQ ID NO: 5

<400> 14

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR3 of SEQ ID NO: 5

<400> 15

Phe Gln Gly Thr His Asp Pro Leu Thr

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR1 of SEQ ID NO: 9

<400> 16

Ser Ser Gly Ile Cys Val Ser

1 5

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR2 of SEQ ID NO: 9

<400> 17

Thr Ile Cys Trp Glu Asp Ser Lys Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR3 of SEQ ID NO: 9

<400> 18

Val Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Phe

1 5

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR1 of SEQ ID NO: 3

<400> 19

Lys Gly Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR2 of SEQ ID NO: 3

<400> 20

Asn Thr Asn Ser Leu Gln Thr

1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR3 of SEQ ID NO: 3

<400> 21

Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Asn Thr

1 5