

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5860052号  
(P5860052)

(45) 発行日 平成28年2月16日(2016.2.16)

(24) 登録日 平成27年12月25日(2015.12.25)

|                              |                      |
|------------------------------|----------------------|
| (51) Int.Cl.                 | F I                  |
| <b>C07K 14/775 (2006.01)</b> | C O 7 K 14/775 Z N A |
| <b>A61K 38/00 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 37/02        |
| <b>A61P 9/00 (2006.01)</b>   | A 6 1 P 9/00         |
| <b>A61P 9/10 (2006.01)</b>   | A 6 1 P 9/10         |
|                              | A 6 1 P 9/10 1 0 3   |

請求項の数 21 (全 90 頁)

|               |                               |           |                      |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2013-526414 (P2013-526414)  | (73) 特許権者 | 591003013            |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年8月25日 (2011.8.25)        |           | エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  |
| (65) 公表番号     | 特表2013-540106 (P2013-540106A) |           | F. HOFFMANN-LA ROCH  |
| (43) 公表日      | 平成25年10月31日 (2013.10.31)      |           | E AKTIENGESELLSCHAFT |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2011/064602             |           | T                    |
| (87) 国際公開番号   | W02012/028526                 |           | スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  |
| (87) 国際公開日    | 平成24年3月8日 (2012.3.8)          |           | グレンツァーヘルストラッセ124     |
| 審査請求日         | 平成25年2月28日 (2013.2.28)        | (74) 代理人  | 110001508            |
| (31) 優先権主張番号  | 10188392.4                    |           | 特許業務法人 津国            |
| (32) 優先日      | 平成22年10月21日 (2010.10.21)      | (72) 発明者  | バダー, マルティン           |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                    |           | ドイツ国、82377 ペンツベルク、シ  |
| (31) 優先権主張番号  | 10008993.7                    | (72) 発明者  | ユパーバーヴェーク 17         |
| (32) 優先日      | 平成22年8月30日 (2010.8.30)        |           | ベーナー, モニカ            |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                    |           | ドイツ国、81379 ミュンヘン、スレ  |
| 前置審査          |                               |           | ーフォクトシュトラッセ 24       |
|               |                               |           | 最終頁に続く               |

(54) 【発明の名称】 テトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、それを含有する脂質粒子及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- アポリポタンパク質 A - I 又はその変異体と、
- 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルコリン及び 1 , 2 - ジパルミトイル - ホスファチジルコリンと、
- 界面活性剤

からなる脂質粒子であって、

- 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルコリンの 1 , 2 - ジパルミトイル - ホスファチジルコリンに対するモル比が 99 : 1 ~ 25 : 75 である、脂質粒子。

【請求項2】

アポリポタンパク質 A - I 又はその変異体が、3つの単量体を含む多量体であることを特徴とする、請求項1に記載の脂質粒子。

【請求項3】

アポリポタンパク質 A - I が、配列番号 01 又は配列番号 02 又は配列番号 06 又は配列番号 66 又は配列番号 67 のアミノ酸配列を有するテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の脂質粒子。

【請求項4】

アポリポタンパク質 A - I のアミノ酸配列が、1以上の保存的アミノ酸変更を有することを特徴とする、請求項1~3のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項5】

アポリポタンパク質 A - I のアミノ酸配列が、配列番号 0 1 又は配列番号 0 2 又は配列番号 0 6 又は配列番号 6 6 又は配列番号 6 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 相同であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 6】

キュビリン、スカベンジャー受容体クラス B 1 型 ( S R - B I )、A T P - 結合カセット 1 ( A B C A - 1 )、レシチン - コレステロールアシルトランスフェラーゼ ( L C A T )、コレステリル - エステル転移タンパク質 ( C E T P )、又はリン脂質転移タンパク質 ( P L T P ) からなる群より選択される受容体に結合することを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 7】

脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が、4 0 ~ 1 2 0 であることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 8】

アポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が、5 0 ~ 1 1 0 であることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 9】

アポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が、5 4 ~ 1 0 2 であることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 1 0】

脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が、6 0 ~ 9 0 であることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 1 1】

脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が、6 0 ~ 8 8 であることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 1 2】

脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が、6 2 ~ 8 0 であることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 1 3】

脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が、6 4 ~ 7 0 であることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 1 4】

脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が、6 6 ~ 8 6 であることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 1 5】

脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が、約 6 6 であることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の脂質粒子を含む、医薬組成物。

【請求項 1 7】

検出可能な標識を含む請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の脂質粒子を含む、組成物

【請求項 1 8】

医薬として使用するための請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の脂質粒子。

【請求項 1 9】

- 急性冠動脈症候群の患者における二次予防のための医薬、あるいは
- アテローム動脈硬化を予防又は処置するための医薬、あるいは
- コレステロール逆輸送及び/又はプラーク軽減を誘導するための医薬、あるいは
- 被験体の血管におけるアテロームプラークを除去/溶解/安定化するため、又は被験体の動脈壁から肝臓にコレステロールを再分配するための医薬、あるいは
- 被験体における弁狭窄を予防又は処置するための医薬、あるいは

10

20

30

40

50

- 被験体におけるHDL粒子の数を増加させるための医薬、あるいは
  - 被験体においてコレステロール逆輸送を開始させるための医薬、あるいは
  - 内毒素を除去するための医薬、あるいは
  - 敗血症性ショックを予防するための医薬、
  - 狭心症を処置するための医薬、あるいは
  - 心筋梗塞を処置するための医薬、あるいは
  - 不安定狭心症を処置するための医薬、あるいは
  - 末梢動脈障害(PAD)、頸動脈狭窄、大脳動脈狭窄又は冠状動脈動脈狭窄等の動脈狭窄を処置するための医薬、あるいは
  - 血管性認知症を処置するための医薬、あるいは
  - 一過性黒内障を処置するための医薬
- として使用するための請求項1～15のいずれか一項に記載の脂質粒子。

10

## 【請求項20】

医薬を製造するための請求項1～15のいずれか一項に記載の脂質粒子の使用。

## 【請求項21】

- 急性冠動脈症候群の患者における二次予防のための医薬、あるいは
- アテローム動脈硬化を予防又は処置するための医薬、あるいは
- コレステロール逆輸送及び/又はプラーク軽減を誘導するための医薬、あるいは
- 被験体の血管におけるアテロームプラークを除去/溶解/安定化するため、又は被験体の動脈壁から肝臓にコレステロールを再分配するための医薬、あるいは
- 被験体における弁狭窄を予防又は処置するための医薬、あるいは
- 被験体におけるHDL粒子の数を増加させるための医薬、あるいは
- 被験体においてコレステロール逆輸送を開始させるための医薬、あるいは
- 内毒素を除去するための医薬、あるいは
- 敗血症性ショックを予防するための医薬、
- 狭心症を処置するための医薬、あるいは
- 心筋梗塞を処置するための医薬、あるいは
- 不安定狭心症を処置するための医薬、あるいは
- 末梢動脈障害(PAD)、頸動脈狭窄、大脳動脈狭窄又は冠状動脈動脈狭窄等の動脈狭窄を処置するための医薬、あるいは
- 血管性認知症を処置するための医薬、あるいは
- 一過性黒内障を処置するための医薬

20

を製造するための請求項1～15のいずれか一項に記載の脂質粒子の使用。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、リポタンパク質及び脂質粒子の分野におけるものである。アポリポタンパク質、ホスファチジルコリン及び脂質を含む脂質粒子に加えて、テトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、及びこれらの使用について本明細書に報告する。

## 【0002】

## 発明の背景

血漿リポタンパク質は、血液において脂質輸送及び代謝を行う可溶性のタンパク質-脂質複合体である。いくつかの主なクラスのリポタンパク質は、その密度、サイズ、化学組成及び機能に基づいて識別される。特に、高密度脂質粒子とも呼ばれる高密度リポタンパク質(HDL)粒子は、180kDa～360kDaの様々な平均分子量の幾つかのサブクラスで構成される。これらの脂質及びタンパク質の平均含有量は、各々50重量%である。ホスファチジルコリン(PC)が脂質全体の38%を占め、次いで、コレステロールエステル、ならびに遊離コレステロールを含む少量の他の極性及び無極性の脂質である。主なタンパク質構成要素は、アポリポタンパク質A-I(Apo A-I)であり、これはヒトHDLにおける総タンパク質重量の約60%に相当する。

40

50

## 【 0 0 0 3 】

HDL粒子及びその主なポリペプチドであるアポリポタンパク質A-Iは、コレステロール逆輸送(RCT)に関与する。コレステロール逆輸送において、アポリポタンパク質A-Iは、細胞、例えば血管壁の細胞からのコレステロールの流出、脂質の結合、及びレシチン-コレステロール-アセチル-トランスフェラーゼの活性化を増加させて、肝臓による血漿の流れを介してコレステロールを排泄する。これは、細胞膜タンパク質であるATP-結合カセット輸送体-A-I(ABCA-I)の関与する能動輸送プロセスである。

## 【 0 0 0 4 】

アポリポタンパク質A-I及びアポリポタンパク質に基づく治療法、例えば再構成されたHDL粒子は、1970年代後半及び1980年代前半には既に同定されていた。アポリポタンパク質A-I-Milanoを含有する脂質粒子については、臨床的証拠(動脈硬化の患者におけるプラークの著しい減少を意味する)を示すことができた。野生型アポリポタンパク質A-Iの二量体型であるアポリポタンパク質A-I-Milanoは、アポリポタンパク質A-I分子の天然に存在する突然変異体に従って設計された。アミノ酸残基173(アルギニン)をシステインに置換してジスルフィド結合の形成を可能にすることにより、二量体が形成可能になる。

## 【 0 0 0 5 】

WO2009/131704では、無機物質を含むコアを含む、コレステロール及び他の分子を隔離するのに適切なナノ構造が報告されている。WO2006/125304では、冠動脈疾患を処置又は予防するための医薬組成物が報告されている。脂質代謝及び心血管疾患に関連するアポリポタンパク質をコードする組成物は、US2002/0142953に報告されている。WO2005/084642では、アポリポタンパク質-コキレート(cochelate)組成物が報告されている。WO2009/036460では、改変型のヒトアポリポタンパク質A-Iポリペプチド及びその使用が報告されている。二量体型及び/又はオリゴマー型のヒトアポリポタンパク質A-Iタンパク質突然変異タンパク質の植物による生産が、WO2008/017906に報告されている。WO2007/137400では、弁狭窄を処置するための方法及び化合物が報告されている。WO2006/100567では、帯電したリポタンパク質複合体及びその使用が報告されている。

## 【 0 0 0 6 】

US2002/0156007では、アポリポタンパク質類似体が報告されている。テトラネクチン三量体化ポリペプチドが、US2010/0028995に報告されている。Graversen, J.H.らによるJ. Cardiovascular Pharmacol. (51 (2008) 170-177)では、アポリポタンパク質A-Iの三量体化が、血漿クリアランスを遅らせ、そして抗アテローム動脈硬化特性を保つことが報告されている。心血管疾患を処置するための新規治療手段である高密度リポタンパク質投与は、Sirtori, C.R., et al. (Curr. Med. Chem. Immunol. Endocrine Metabol. Agents 5 (2005) 321-333)に報告されている。

## 【 0 0 0 7 】

WO03/097696では、虚血再灌流を処置するための方法及び組成物が報告されている。ナノスケール結合型二重層、使用及び製造の方法が、WO2009/097587に報告されている。WO2007/098122では、黄プラーク変性及び関連する眼症状を処置するための方法が報告されている。アポリポタンパク質類似体は、WO02/38609に報告されている。WO2005/041866では、医薬製剤が報告されている。冠不全症候群を処置及び予防するための方法及び投与計画が報告されている。脂質異常症性(dislipidemic)障害を処置するための遺伝子治療、アポリポタンパク質A-Iアゴニストを供給するアプローチ、及びその使用が、WO99/16409に報告されている。WO2008/106660では、単離されたリン脂質-タンパク質粒子が報告されている。アポリポタンパク質(APO A-I)模倣ペプチド/リン脂質複合体を使用する拡張機能障害を予防及び処置するための方法が、WO2010/083611に報告されている。WO2008/156873では、APO A-Iペプチド模倣体が報告されている。封入HDL模倣ペプチドが、WO2008/094905に報告されている。WO98/56906では、三量体化モジュールが報告されている。

## 【 0 0 0 8 】

発明の概要

10

20

30

40

50

本明細書においては、1つの態様として、特に培養中の副生成物の形成が少ない改善された生成特性、及び改善された下流加工特性を有するテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I について報告する。

【0009】

また、本明細書において、1つの態様として、アポリポタンパク質と、ホスファチジルコリンと、更なる脂質、例えば、リン脂質、リゾリン脂質、ガラクトセレブロシド、ガングリオシド、セレブロシド、グリセリド、脂肪酸、トリグリセリドもしくはステロイド脂質、コレステロール、コレステロールエステル、又はこれらの類似体もしくは誘導体を含む脂質粒子について報告する。

【0010】

1つの実施形態では、脂質粒子は、アポリポタンパク質を1種のみ含む。

【0011】

1つの実施形態では、脂質粒子は、1つのアポリポタンパク質、ホスファチジルコリン、更なる脂質及び界面活性剤からなる。

【0012】

1つの実施形態では、更なる脂質は、ホスファチジルコリンであり、両ホスファチジルコリンは、ホスファチジルコリンのホスホグリセロール骨格にエステル化される1つもしくは2つのカルボン酸部分又はカルボン酸部分誘導体において異なる。

【0013】

更なる実施形態では、アポリポタンパク質は、ヒトのアポリポタンパク質 A であり、別の実施形態では、多量体化ドメインにコンジュケートされたヒトのアポリポタンパク質であり、そして、更なる実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I である。1つの実施形態では、アポリポタンパク質は、配列番号 01、02、06、66 及び 67 から選択されるアミノ酸配列を有するアポリポタンパク質であるか、又は選択された配列と少なくとも 70% の配列同一性を有するアポリポタンパク質の変異体である。

【0014】

1つの実施形態では、脂質粒子は、

- a) アポリポタンパク質と、
- b) ホスファチジルコリンと、
- c) 更なる脂質とを含み、

前記脂質が、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルセリン、スフィンゴシン E - リン酸、コール酸 (cholate) もしくはジミリストイルホスファチジルグリセロールである場合、前記アポリポタンパク質は、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I である、及び/又は

前記脂質が、小さなアルキル鎖リン脂質、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリン、スフィンゴ脂質、ガングリオシド、セレブロシド、リゾレシチン、セファリン、カルジオリピン、リン酸ジセチル又はコレステロールである場合、前記アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質 A - I ミラノではない。

【0015】

別の実施形態では、脂質粒子は、

- a) アポリポタンパク質と、
- b) ホスファチジルコリンと、
- c) 更なる脂質とを含み、

前記脂質が、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴシン E - リン酸もしくはコール酸である場合、前記アポリポタンパク質は、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I である、及び/又は

前記脂質が、小さなアルキル鎖リン脂質、スフィンゴミエリン、スフィンゴ脂質、ガングリオシド、セレブロシド、リゾレシチン、セファリン、カルジオリピン、リン酸ジセチル又はコレステロールである場合、前記アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質 A -

10

20

30

40

50

Iミラノではない。

【0016】

1つの実施形態では、更なる脂質は、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジン酸以外の任意の脂質である。

【0017】

1つの実施形態では、更なる脂質は、第2のホスファチジルコリンである。1つの実施形態では、ホスファチジルコリンはPOPCであり、そして、第2のホスファチジルコリンはDPPCである。

【0018】

1つの実施形態では、ホスファチジルコリンの脂質に対するモル比は、99：1～1：99である。別の実施形態では、ホスファチジルコリンの脂質に対するモル比は、99：1～10：90である。更なる実施形態では、ホスファチジルコリンの脂質に対するモル比は、99：1～25：75である。別の実施形態では、アポリポタンパク質は、ホスファチジルコリン及び脂質と非共有結合する。

【0019】

1つの実施形態では、POPCのDPPCに対するモル比は、99：1～1：99である。別の実施形態では、POPCのDPPCに対するモル比は、99：1～10：90である。更なる実施形態では、POPCのDPPCに対するモル比は、99：1～25：75である。

【0020】

別の実施形態では、アポリポタンパク質は、POPC及びDPPCと非共有結合する。

【0021】

1つの実施形態では、アポリポタンパク質は、3つのアポリポタンパク質単量体を含む多量体である。別の実施形態では、多量体は、3つのテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I単量体を含む。

【0022】

1つの実施形態では、脂質粒子は、0.75重量%未満の界面活性剤を含む。1つの実施形態では、界面活性剤は、糖系界面活性剤、ポリオキシアルキレン系界面活性剤、胆汁酸塩系界面活性剤、合成界面活性剤及びこれらの組合せから選択される。別の実施形態では、界面活性剤はコール酸である。

【0023】

1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体1個当たりのホスファチジルコリン分子及び脂質分子の合計数は、40～120、1つの実施形態では50～110、1つの実施形態では54～102、1つの実施形態では60～90、1つの実施形態では65～70である。

【0024】

1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体1個当たりのホスファチジルコリン分子及び脂質分子の合計数は、60～90である。1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体1個当たりのホスファチジルコリン分子及び脂質分子の合計数は、60～88である。1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体1個当たりのホスファチジルコリン分子及び脂質分子の合計数は、62～80である。1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体1個当たりのホスファチジルコリン分子及び脂質分子の合計数は、64～70である。1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体1個当たりのホスファチジルコリン分子及び脂質分子の合計数は、約66である。

【0025】

1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体1個当たりのPOPC及びDPPCの分子の合計数は、40～115、更なる実施形態では50～110、そして、別の実施形態では54～102である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 6 】

1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりのPOPC及びDPPCの分子の合計数は、60～90である。1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりのPOPC及びDPPCの分子の合計数は、60～88である。1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりのPOPC及びDPPCの分子の合計数は、62～80である。1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりのPOPC及びDPPCの分子の合計数は、64～70である。1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりのPOPC及びDPPCの分子の合計数は、約66である。

## 【 0 0 2 7 】

1つの実施形態では、脂質粒子は、キュピリン、スカベンジャー受容体クラスB1型(SR-BI)、ATP-結合カセット1(ABCA-1)、レシチン-コレステロールシルトランスフェラーゼ(LCAT)、コレステリル-エステル転移タンパク質(CE1P)、又はリン脂質転移タンパク質(PLTP)からなる群より選択される受容体に結合することができる。

## 【 0 0 2 8 】

本明細書に報告される更なる態様は、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質を含む医薬組成物である。

## 【 0 0 2 9 】

本明細書に報告される1つの態様は、医薬として使用するための、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質である。

## 【 0 0 3 0 】

本明細書に報告される1つの態様は、医薬を製造するための、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質の使用である。

## 【 0 0 3 1 】

本明細書に報告される1つの態様は、以下の医薬を製造するための、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質の使用である：

- 急性冠動脈症候群の患者における二次予防のための医薬、あるいは
- アテローム動脈硬化を予防又は処置するための医薬であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質が、被験体においてコレステロール逆輸送及び/又はプラーク軽減を誘導するのに十分な量含まれる医薬、あるいは
- コレステロール逆輸送及び/又はプラーク軽減を誘導するための医薬、あるいは
- 被験体の血管におけるアテロームプラークを除去/溶解/安定化するため、又は被験体の動脈壁から肝臓にコレステロールを再分配するための医薬、あるいは
- 被験体における弁狭窄を予防又は処置するための医薬、あるいは
- 被験体におけるHDL粒子の数を増加させるための医薬、あるいは
- 被験体においてコレステロール逆輸送を開始させるための医薬、あるいは
- 内毒素を除去するための医薬、あるいは
- 敗血症性ショックを予防するための医薬、
- 狭心症を処置するための医薬、あるいは

10

20

30

40

50

- 心筋梗塞を処置するための医薬、あるいは
- 不安定狭心症を処置するための医薬、あるいは
- 末梢動脈障害（PAD）、頸動脈狭窄、大脳動脈狭窄又は冠状動脈動脈狭窄等の動脈狭窄を処置するための医薬、あるいは
  - 血管性認知症を処置するための医薬、あるいは
  - 一過性黒内障を処置するための医薬。

## 【0032】

本明細書に報告される1つの態様は、医薬の製造における、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質の使用である。

10

## 【0033】

本明細書に報告される1つの態様は、以下の医薬を製造するための方法である：

- 急性冠動脈症候群の患者における二次予防のための医薬、あるいは
- アテローム動脈硬化を予防又は処置するための医薬であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質が、被験体においてコレステロール逆輸送及び/又はプラーク軽減を誘導するのに十分な量含まれる医薬、あるいは
  - コレステロール逆輸送及び/又はプラーク軽減を誘導するための医薬、あるいは
  - 被験体の血管におけるアテロームプラークを除去/溶解/安定化するため、又は被験体の動脈壁から肝臓にコレステロールを再分配するための医薬、あるいは
  - 被験体における弁狭窄を予防又は処置するための医薬、あるいは
  - 被験体におけるHDL粒子の数を増加させるための医薬、あるいは
  - 被験体においてコレステロール逆輸送を開始させるための医薬、あるいは
  - 内毒素を除去するための医薬、あるいは
  - 敗血症性ショックを予防するための医薬、
  - 狭心症を処置するための医薬、あるいは
  - 心筋梗塞を処置するための医薬、あるいは
  - 不安定狭心症を処置するための医薬、あるいは
  - 末梢動脈障害（PAD）、頸動脈狭窄、大脳動脈狭窄又は冠状動脈動脈狭窄等の動脈狭窄を処置するための医薬、あるいは
    - 血管性認知症を処置するための医薬、あるいは
    - 一過性黒内障を処置するための医薬。

20

30

## 【0034】

本明細書に報告される1つの態様は、以下の方法である：

- 急性冠動脈症候群の患者における二次予防のための方法、あるいは
- アテローム動脈硬化を予防又は処置するための方法であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質が、被験体においてコレステロール逆輸送及び/又はプラーク軽減を誘導するのに十分な量含まれる方法、あるいは
  - コレステロール逆輸送及び/又はプラーク軽減を誘導するための方法、あるいは
  - 被験体の血管におけるアテロームプラークを除去/溶解/安定化するため、又は被験体の動脈壁から肝臓にコレステロールを再分配するための方法、あるいは
  - 被験体における弁狭窄を予防又は処置するための方法、あるいは
  - 被験体におけるHDL粒子の数を増加させるための方法、あるいは
  - 被験体においてコレステロール逆輸送を開始させるための方法、あるいは
  - 内毒素を除去するための方法、あるいは
  - 敗血症性ショックを予防するための方法、

40

50



- 狭心症を処置するための方法、あるいは
- 心筋梗塞を処置するため、あるいは
- 不安定狭心症を処置するための方法、あるいは
- 末梢動脈障害 (PAD)、頸動脈狭窄、大脳動脈狭窄又は冠状動脈動脈狭窄等の動脈狭窄を処置するための方法、あるいは
  - 血管性認知症を処置するための方法、あるいは
  - 一過性黒内障を処置するための方法。

## 【0035】

本明細書に報告される1つの態様は、以下の処置において使用するための、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質である：

- 急性冠動脈症候群、又は
- アテローム動脈硬化、又は
- 被験体の血管におけるアテロームプラーク、又は
- 被験体における弁狭窄、又は
- 敗血症性ショック、又は
- 狭心症、又は
- 心筋梗塞、又は
- 不安定狭心症、又は
- 動脈狭窄、又は
- 末梢動脈障害 (PAD)、又は
- 頸動脈狭窄、又は
- 大脳動脈狭窄、又は
- 冠状動脈動脈狭窄、又は
- 血管性認知症、又は
- 一過性黒内障。

## 【0036】

本明細書に報告される1つの態様は、以下において使用するための、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質である：

- コレステロール逆輸送の誘導、あるいは
- プラーク軽減の誘導、あるいは
- アテロームプラークの除去又は溶解又は安定化、あるいは
- 動脈壁から肝臓へのコレステロールの再分配、あるいは
- HDL粒子の数の増加、あるいは
- 内毒素の除去。

## 【0037】

本明細書に報告される1つの態様は、急性冠動脈症候群、又はアテローム動脈硬化、又は血管におけるアテロームプラーク、又は弁狭窄、又は敗血症性ショック、又は狭心症、又は心筋梗塞、不安定狭心症、又は動脈狭窄、又は末梢動脈障害 (PAD)、又は頸動脈狭窄、又は大脳動脈狭窄、又は冠状動脈動脈狭窄、又は血管性認知症、又は一過性黒内障を有する個体を処置する方法であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質の有効量を前記個体に投与することを含む方法である。

## 【0038】

本明細書に報告される1つの態様は、個体においてコレステロール逆輸送を誘導するか、又はプラーク軽減を誘導するか、又はアテロームプラークを除去もしくは溶解もしくはは

10

20

30

40

50

安定化するか、又は動脈壁から肝臓へコレステロールを再分配するか、又はHDL粒子の数を増加させるか、又は内毒素を除去する方法であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質の有効量を前記個体に投与して、コレステロール逆輸送を誘導するか、又はプラーク軽減を誘導するか、又はアテロームプラークを除去もしくは溶解もしくは安定化するか、又は動脈壁から肝臓へコレステロールを再分配するか、又はHDL粒子の数を増加させるか、又は内毒素を除去することを含む方法である。

【0039】

1つの実施形態では、非正常な脂質レベルは、体液におけるレベルである。別の実施形態では、体液は、全血又は血清である。

10

【0040】

1つの実施形態では、非正常な脂質レベルは、上昇したコレステロールレベルである。

【0041】

1つの実施形態では、脂質含有沈着物は、血管におけるプラークである。

【0042】

1つの実施形態では、疾患は心血管疾患である。

【0043】

本明細書に報告される1つの態様は、非正常な脂質レベル又は身体の構成要素における脂質含有沈着物を特徴とする疾患又は症状を処置する方法であって、

20

i) 治療上有効量の本明細書に報告される脂質粒子を、処置又は人工系を必要とする被験体に投与することと、

ii) 場合により、被験体の脂質レベル又は脂質含有沈着物の変化についてモニタすることを含む方法である。

【0044】

本明細書に報告される1つの態様は、急性冠動脈症候群の患者における二次予防のための方法であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質を、それを必要としている被験体に投与することを含む方法である。

30

【0045】

本明細書に報告される1つの態様は、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質を含む診断用組成物であって、サンプル又は被験体内における標識アポリポタンパク質又は標識脂質粒子の検出を可能にするために前記アポリポタンパク質が標識されている組成物である。

【0046】

本明細書に報告される1つの態様は、診断のための、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質の使用である。

40

【0047】

本明細書に報告される1つの態様は、非正常な脂質レベル又は脂質含有沈着物の存在を特徴とする疾患又は症状に罹患している被験体の予防又は処置のための、本明細書に報告される脂質粒子の使用である。

【0048】

本明細書に報告される1つの態様は、本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I又は本明細書に報告される融合タンパク質をコードする核酸、及び本明細書に報告される核酸を含む細胞である。

【0049】

50

本明細書に報告される1つの態様は、配列番号01又は配列番号02又は配列番号66又は配列番号67のアミノ酸配列を有するテトラネクチン - アポリポタンパク質A - I、又はその薬学的に許容しうる塩もしくはそのプロドラッグである。1つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質A - Iは、1以上の保存的アミノ酸変更を有する配列番号01又は配列番号02又は配列番号66又は配列番号67のアミノ酸配列を有する。1つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質A - Iは、1以上のアミノ酸が置換、付加、又は欠失されている配列番号01又は配列番号02又は配列番号66又は配列番号67のアミノ酸配列を有する。

【0050】

本明細書に報告される1つの態様は、配列番号01又は配列番号02又は配列番号66又は配列番号67のアミノ酸配列を有するテトラネクチン - アポリポタンパク質A - Iである。1つの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号01又は配列番号02又は配列番号66又は配列番号67のアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有する。

【0051】

1つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質A - I単量体又はテトラネクチン - アポリポタンパク質A - I三量体は、キュビリン、スカベンジャー受容体クラスB1型(SR - BI)、ATP - 結合カセット1(ABCA - 1)、レシチン - コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)、コレステリル - エステル転移タンパク質(CELP)、又はリン脂質転移タンパク質(PLTP)からなる群より選択される受容体に結合することができる。

【0052】

本明細書に報告される1つの態様は、3つのテトラネクチン - アポリポタンパク質A - I単量体を含む多量体であって、前記テトラネクチン - アポリポタンパク質A - I単量体が互いに共有結合していない多量体である。

【0053】

本明細書に報告される1つの態様は、配列番号01、配列番号02又は配列番号66のアミノ酸配列を含む融合タンパク質、前記融合タンパク質をコードする核酸、及び前記融合タンパク質をコードする核酸を含むプラスミドである。

【0054】

1つの実施形態では、融合タンパク質は、N - 末端から - C末端方向に以下を含む：

- アミノ酸メチオニン(M)、
- CDLPQTHSL(配列番号55)のアミノ酸配列を有するインターフェロン配列の断片、
- GSリンカー、
- HHHHHH(配列番号56)のアミノ酸配列を有するヘキサ - ヒスチジンタグ、
- GSリンカー、
- VVAPPAP(配列番号60)のアミノ酸配列を有するIgAプロテアーゼ切断部位、

及び

- 配列番号02のアミノ酸配列を有するテトラネクチン - アポリポタンパク質A - I。

【0055】

1つの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号57のアミノ酸配列を有する。

【0056】

本明細書に報告される1つの態様は、本明細書に報告される融合タンパク質をコードする核酸を含む細胞である。1つの実施形態では、細胞は、CSPZ-2、K12株294(ATCC 31446)、B、X 1776(ATCC 31537)、W3110(ATCC 273325)、BL21、RM\_82、SCS\_110、G、XL-1\_F-、SE\_13009、LA\_5709、C600、CSH\_1、TG\_1、UT400、及びUT5600等の大腸菌(E.coli)株から選択される。

【0057】

本明細書に報告される1つの態様は、

- a) 配列番号 0 1、配列番号 0 2、配列番号 6 6 及び配列番号 6 7 のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を有するテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I と、  
 b) ホスファチジルコリンと、  
 c) 脂質とを含む脂質粒子である。

## 【 0 0 5 8 】

1 つの実施形態では、脂質は、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルセリン、スフィンゴシン I - リン酸、コール酸、又はジミリストイルホスファチジルグリセロールから選択される。

## 【 0 0 5 9 】

1 つの実施形態では、脂質は、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジン酸以外の任意の脂質である。

## 【 0 0 6 0 】

- 1 つの実施形態では、脂質粒子は、  
 a) 配列番号 0 1、配列番号 0 2、配列番号 6 6 及び配列番号 6 7 のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を有するテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I と、  
 b) 第 1 のホスファチジルコリンと、  
 c) 第 2 のホスファチジルコリンとを含む。

## 【 0 0 6 1 】

1 つの実施形態では、第 1 のホスファチジルコリンは P O P C であり、そして、第 2 のホスファチジルコリンは D P P C である。1 つの実施形態では、脂質粒子を生成するための第 1 のホスファチジルコリンの第 2 のホスファチジルコリンに対するモル比は、9 9 : 1 ~ 1 : 9 9 である。1 つの実施形態では、脂質粒子を生成するための第 1 のホスファチジルコリンの第 2 のホスファチジルコリンに対するモル比は、9 9 : 1 ~ 1 0 : 9 0 である。1 つの実施形態では、脂質粒子を生成するための第 1 のホスファチジルコリンの第 2 のホスファチジルコリンに対するモル比は、9 9 : 1 ~ 2 5 : 7 5 である。1 つの実施形態では、脂質粒子を生成するための第 1 のホスファチジルコリンの第 2 のホスファチジルコリンに対するモル比は、9 9 : 1 ~ 5 0 : 5 0 である。1 つの実施形態では、脂質粒子を生成するための第 1 のホスファチジルコリンの第 2 のホスファチジルコリンに対するモル比は、約 7 5 : 2 5 である。

## 【 0 0 6 2 】

1 つの実施形態では、第 1 のホスファチジルコリンは P O P C であり、そして、第 2 のホスファチジルコリンは D P P C である。1 つの実施形態では、脂質粒子における第 1 のホスファチジルコリンの第 2 のホスファチジルコリンに対するモル比は、9 9 : 1 ~ 1 : 9 9 である。1 つの実施形態では、脂質粒子における第 1 のホスファチジルコリンの第 2 のホスファチジルコリンに対するモル比は、9 9 : 1 ~ 1 0 : 9 0 である。1 つの実施形態では、脂質粒子における第 1 のホスファチジルコリンの第 2 のホスファチジルコリンに対するモル比は、9 9 : 1 ~ 2 5 : 7 5 である。1 つの実施形態では、脂質粒子における第 1 のホスファチジルコリンの第 2 のホスファチジルコリンに対するモル比は、9 9 : 1 ~ 5 0 : 5 0 である。1 つの実施形態では、脂質粒子における第 1 のホスファチジルコリンの第 2 のホスファチジルコリンに対するモル比は、約 7 5 : 2 5 である。

## 【 0 0 6 3 】

1 つの実施形態では、アポリポタンパク質は、第 1 のホスファチジルコリン及び脂質と非共有結合する。1 つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、第 1 のホスファチジルコリン及び第 2 のホスファチジルコリンと非共有結合する。

## 【 0 0 6 4 】

1 つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、3 つのテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 単量体を含む多量体である。

## 【 0 0 6 5 】

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、脂質粒子は、0.75重量%未満の界面活性剤を含む。1つの実施形態では、界面活性剤は、糖系界面活性剤、ポリオキシアルキレン系界面活性剤、胆汁酸塩系界面活性剤、合成界面活性剤及びこれらの組合せから選択される。1つの実施形態では、界面活性剤は、コール酸又はツヴァイタージェント (Zwittergent) である。

【0066】

1つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体1個当たりのリン脂質分子の合計数は、40～120、更なる実施形態では50～110、そして、別の実施形態では54～102である。1つの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリンである。

【0067】

本明細書に報告される1つの態様は、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質を含む医薬組成物である。

【0068】

本明細書に報告される1つの態様は、医薬として使用するための、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質である。

【0069】

本明細書に報告される1つの態様は、以下の医薬を製造するための、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質の使用である：

- 続発性主要有害心イベント (MACE) の予防のための医薬、
- 急性冠動脈症候群の患者における二次予防のための医薬、あるいは
- アテローム動脈硬化を予防又は処置するための医薬であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タンパク質が、被験体においてコレステロール逆輸送及び/又はプラーク軽減を誘導するのに十分な量含まれる医薬、あるいは
- コレステロール逆輸送及び/又はプラーク軽減を誘導するための医薬、あるいは
- 被験体の血管におけるアテロームプラークを除去/溶解/安定化するため、又は被験体の動脈壁から肝臓にコレステロールを再分配するための医薬、あるいは
- 被験体における弁狭窄を予防又は処置するための医薬、あるいは
- 被験体におけるHDL粒子の数を増加させるための医薬、あるいは
- 被験体においてコレステロール逆輸送を開始させるための医薬、あるいは
- 内毒素を除去するための医薬、あるいは
- 敗血症性ショックを予防するための医薬、
- 狭心症を処置するための医薬、あるいは
- 心筋梗塞を処置するための医薬、あるいは
- 不安定狭心症を処置するための医薬、あるいは
- 末梢動脈障害 (PAD)、頸動脈狭窄、大脳動脈狭窄又は冠状動脈動脈狭窄等の動脈狭窄を処置するための医薬、あるいは
- 血管性認知症を処置するための医薬、あるいは
- 一過性黒内障を処置するための医薬。

【0070】

本明細書に報告される1つの態様は、医薬の製造における、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質A-I多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I、又は本明細書に報告される融合タン

10

20

30

40

50

パク質の使用である。

【 0 0 7 1 】

本明細書に報告される 1 つの態様は、以下の医薬を製造するための方法である：

- 急性冠動脈症候群の患者における二次予防のための医薬、あるいは
- 続発性主要有害心イベント ( M A C E ) の予防のための医薬、あるいは
- アテローム動脈硬化を予防又は処置するための医薬であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質 A - I 多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I、又は本明細書に報告される融合タンパク質が、被験体においてコレステロール逆輸送及び / 又はプラーク軽減を誘導するのに十分な量含まれる医薬、あるいは
- コレステロール逆輸送及び / 又はプラーク軽減を誘導するための医薬、あるいは
- 被験体の血管におけるアテロームプラークを除去 / 溶解 / 安定化するため、又は被験体の動脈壁から肝臓にコレステロールを再分配するための医薬、あるいは
- 被験体における弁狭窄を予防又は処置するための医薬、あるいは
- 被験体における HDL 粒子の数を増加させるための医薬、あるいは
- 被験体においてコレステロール逆輸送を開始させるための医薬、あるいは
- 内毒素を除去するための医薬、あるいは
- 敗血症性ショックを予防するための医薬、
- 狭心症を処置するための医薬、あるいは
- 心筋梗塞を処置するための医薬、あるいは
- 不安定狭心症を処置するための医薬、あるいは
- 末梢動脈障害 ( P A D )、頸動脈狭窄、大脳動脈狭窄又は冠状動脈動脈狭窄等の動脈狭窄を処置するための医薬、あるいは
- 血管性認知症を処置するための医薬、あるいは
- 一過性黒内障を処置するための医薬。

10

20

【 0 0 7 2 】

本明細書に報告される 1 つの態様は、以下の方法である：

- 急性冠動脈症候群の患者における二次予防のための方法、あるいは
- 続発性主要有害心イベント ( M A C E ) の予防のための方法、あるいは
- アテローム動脈硬化を予防又は処置するための方法であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質 A - I 多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I、又は本明細書に報告される融合タンパク質が、被験体においてコレステロール逆輸送及び / 又はプラーク軽減を誘導するのに十分な量含まれる方法、あるいは
- コレステロール逆輸送及び / 又はプラーク軽減を誘導するための方法、あるいは
- 被験体の血管におけるアテロームプラークを除去 / 溶解 / 安定化するため、又は被験体の動脈壁から肝臓にコレステロールを再分配するための方法、あるいは
- 被験体における弁狭窄を予防又は処置するための方法、あるいは
- 被験体における HDL 粒子の数を増加させるための方法、あるいは
- 被験体においてコレステロール逆輸送を開始させるための方法、あるいは
- 内毒素を除去するための方法、あるいは
- 敗血症性ショックを予防するための方法、
- 狭心症を処置するための方法、あるいは
- 心筋梗塞を処置するため、あるいは
- 不安定狭心症を処置するための方法、あるいは
- 末梢動脈障害 ( P A D )、頸動脈狭窄、大脳動脈狭窄又は冠状動脈動脈狭窄等の動脈狭窄を処置するための方法、あるいは
- 血管性認知症を処置するための方法、あるいは
- 一過性黒内障を処置するための方法。

30

40

【 0 0 7 3 】

50

本明細書に報告される１つの態様は、以下の処置又は予防において使用するための、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質 A - I 多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I、又は本明細書に報告される融合タンパク質である：

- 急性冠動脈症候群、又は
- 続発性主要有害心イベント（MACE）、又は
- アテローム動脈硬化、又は
- 被験体の血管におけるアテロームプラーク、又は
- 被験体における弁狭窄、又は
- 敗血症性ショック、又は
- 狭心症、又は
- 心筋梗塞、又は
- 不安定狭心症、又は
- 動脈狭窄、又は
- 末梢動脈障害（PAD）、又は
- 頸動脈狭窄、又は
- 大脳動脈狭窄、又は
- 冠状動脈動脈狭窄、又は
- 血管性認知症、又は
- 一過性黒内障。

10

20

#### 【0074】

本明細書に報告される１つの態様は、以下において使用するための、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告されるアポリポタンパク質 A - I 多量体、又は本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I、又は本明細書に報告される融合タンパク質である：

- コレステロール逆輸送の誘導、あるいは
- プラーク軽減の誘導、あるいは
- アテロームプラークの除去又は溶解又は安定化、あるいは
- 動脈壁から肝臓へのコレステロールの再分配、あるいは
- HDL 粒子の数の増加、あるいは
- 内毒素の除去。

30

#### 【0075】

本明細書に報告される１つの態様は、急性心イベントを有する ER に存在する患者において介入後に適用されたときに続発性主要有害心イベント（MACE）を予防するための方法、あるいは急性冠動脈症候群を有するか又はアテローム動脈硬化を有するか又は血管にアテロームプラークを有するか又は弁狭窄を有するか又は敗血症性ショックを有するか又は狭心症を有するか又は心筋梗塞を有するか又は不安定狭心症を有するか又は動脈狭窄を有するか又は末梢動脈障害（PAD）を有するか又は頸動脈狭窄を有するか又は大脳動脈狭窄を有するか又は冠状動脈動脈狭窄を有するか又は血管性認知症を有するか又は一過性黒内障を有する個体を処置するための方法であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告される多量体、又は本明細書に報告される融合タンパク質、又は本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の有効量を前記個体に投与することを含む方法である。

40

#### 【0076】

本明細書に報告される１つの態様は、個体においてコレステロール逆輸送を誘導するか、又はプラーク軽減を誘導するか、又はアテロームプラークを除去もしくは溶解もしくは安定化するか、又は動脈壁から肝臓へコレステロールを再分配するか、又は HDL 粒子の数を増加させるか、又は内毒素を除去する方法であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告される多量体、又は本明細書に報告される融合タンパク質、又は本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の有効量を前記個体に投

50

与して、コレステロール逆輸送を誘導するか、又はプラーク軽減を誘導するか、又はアテロームプラークを除去もしくは溶解もしくは安定化するか、又は動脈壁から肝臓へコレステロールを再分配するか、又はHDL粒子の数を増加させるか、又は内毒素を除去することを含む方法である。

【0077】

1つの実施形態では、非正常な脂質レベルは、体液におけるレベルである。別の実施形態では、体液は、全血又は血清である。

【0078】

1つの実施形態では、非正常な脂質レベルは、上昇したコレステロールレベルである。

【0079】

1つの実施形態では、脂質含有沈着物は、血管におけるプラークである。

【0080】

1つの実施形態では、疾患は心血管疾患である。

【0081】

本明細書に報告される1つの態様は、非正常な脂質レベル又は身体の構成要素における脂質含有沈着物を特徴とする疾患又は症状を処置する方法であって、

i) 治療上有効量の本明細書に報告される脂質粒子を、処置又は人工系を必要とする被験体に投与することと、

ii) 場合により、被験体の脂質レベル又は脂質含有沈着物の変化についてモニタすることを含む方法である。

【0082】

本明細書に報告される1つの態様は、急性冠動脈症候群の患者における二次予防のための方法であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告される多量体、又は本明細書に報告される融合タンパク質、又は本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を、それを必要としている被験体に投与することを含む方法である。

【0083】

本明細書に報告される1つの態様は、続発性主要有害CVイベント(MACE)を予防するための方法であって、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告される多量体、又は本明細書に報告される融合タンパク質、又は本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を、それを必要としている被験体に介入後に投与することを含み、前記被験体が、急性CVイベントを有するERに存在する被験体である方法である。

【0084】

本明細書に報告される1つの態様は、本明細書に報告される脂質粒子、又は本明細書に報告される多量体、又は本明細書に報告される融合タンパク質、又は本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を含む診断用組成物であって、サンプル又は被験体内における標識アポリポタンパク質又は標識脂質粒子の検出を可能にするために前記アポリポタンパク質が標識されている組成物である。

【0085】

本明細書に報告される1つの態様は、本明細書に報告される脂質粒子の診断のための使用である。

【0086】

本明細書に報告される1つの態様は、非正常な脂質レベル又は脂質含有沈着物の存在を特徴とする疾患又は症状に罹患している被験体の予防又は処置のための、本明細書に報告される脂質粒子の使用である。

【0087】

本明細書に報告される1つの態様は、本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 又は本明細書に報告される融合タンパク質をコードする核酸、及び本明細書に報告される核酸を含む細胞である。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 8 8 】

本明細書に報告される 1 つの態様は、配列番号 0 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドであるか、又は配列番号 0 1 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するその変異体である。

## 【 0 0 8 9 】

本明細書に報告される 1 つの態様は、配列番号 0 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドであるか、又は配列番号 0 2 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するその変異体である。

## 【 0 0 9 0 】

本明細書に報告される 1 つの態様は、配列番号 0 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチドであるか、又は配列番号 0 6 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するその変異体である。

10

## 【 0 0 9 1 】

本明細書に報告される 1 つの態様は、配列番号 6 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチドであるか、又は配列番号 6 6 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するその変異体である。

## 【 0 0 9 2 】

本明細書に報告される 1 つの態様は、配列番号 6 7 のアミノ酸配列を有するポリペプチドであるか、又は配列番号 6 7 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するその変異体である。

20

## 【 0 0 9 3 】

本明細書に報告される 1 つの態様は、

- アポリポタンパク質 A - I 又はその変異体と、
  - 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルコリン及び 1 , 2 - ジパルミトイル - ホスファチジルコリンとを含む脂質粒子であって、
- 前記脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が 5 0 ~ 9 0 であり、そして、
- 前記アポリポタンパク質 A - I が配列番号 0 1 のアミノ酸配列を有する脂質粒子である。

## 【 0 0 9 4 】

1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、6 0 ~ 8 8 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、6 2 ~ 8 0 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、6 4 ~ 7 0 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、約 6 6 である。

30

## 【 0 0 9 5 】

本明細書に報告される 1 つの態様は、

- アポリポタンパク質 A - I 又はその変異体と、
  - 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルコリン及び 1 , 2 - ジパルミトイル - ホスファチジルコリンとを含む脂質粒子であって、
- 前記脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が 6 0 ~ 9 0 であり、そして、前記アポリポタンパク質 A - I が配列番号 0 2 のアミノ酸配列を有する脂質粒子である。

40

## 【 0 0 9 6 】

1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、6 0 ~ 8 8 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、6 2 ~ 8 0 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、6 4 ~ 7 0 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当た

50

りのリン脂質分子の数は、約 66 である。

【0097】

本明細書に報告される 1 つの態様は、

- アポリポタンパク質 A - I 又はその変異体と、
  - 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルコリン及び 1 , 2 - ジパルミトイル - ホスファチジルコリンとを含む脂質粒子であって、
- 前記脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が 60 ~ 90 であり、そして、
- 前記アポリポタンパク質 A - I が配列番号 06 のアミノ酸配列を有する脂質粒子である。

10

【0098】

1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、60 ~ 88 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、62 ~ 80 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、64 ~ 70 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、約 66 である。

【0099】

本明細書に報告される 1 つの態様は、

- アポリポタンパク質 A - I 又はその変異体と、
  - 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルコリン及び 1 , 2 - ジパルミトイル - ホスファチジルコリンとを含む脂質粒子であって、
- 前記脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が 60 ~ 90 であり、そして、
- 前記アポリポタンパク質 A - I が配列番号 66 のアミノ酸配列を有する脂質粒子である。

20

【0100】

1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、60 ~ 88 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、62 ~ 80 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、64 ~ 70 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、約 66 である。

30

【0101】

本明細書に報告される 1 つの態様は、

- アポリポタンパク質 A - I 又はその変異体と、
  - 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルコリン及び 1 , 2 - ジパルミトイル - ホスファチジルコリンとを含む脂質粒子であって、
- 前記脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数が 60 ~ 90 であり、そして、
- 前記アポリポタンパク質 A - I が配列番号 67 のアミノ酸配列を有する脂質粒子である。

40

【0102】

1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、60 ~ 88 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、62 ~ 80 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、64 ~ 70 である。1 つの実施形態では、脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、約 66 である。

【0103】

50

## 発明の詳細な説明

## 定義

用語「アポリポタンパク質」は、それぞれ脂質又はリポタンパク質の粒子に含まれるタンパク質を意味する。

## 【0104】

用語「アポリポタンパク質 A - I」は、タンパク質 - 脂質及びタンパク質 - タンパク質の相互作用特性を有する両親媒性の螺旋状ポリペプチドを意味する。アポリポタンパク質 A - I は、267 のアミノ酸残基のプレプロアポリポタンパク質として肝臓及び小腸によって合成され、これは、243 のアミノ酸残基を有する成熟ポリペプチドに切断されるプロアポリポタンパク質として分泌される。アポリポタンパク質 A - I は、多くの場合プロリンであり、場合によっては、幾つかの残基で構成される伸長からなるリンカー部分によって分離されている、各22のアミノ酸残基からなる6~8つの異なるアミノ酸反復からなる。例示的なヒトのアポリポタンパク質 A - I のアミノ酸配列は、GenPeptデータベースエントリNM-000039又はデータベースエントリX00566;GenBank NP-000030.1(gi 4557321)に報告されている。ヒトのアポリポタンパク質 A - I (配列番号06)には、P27H、P27R、P28R、R34L、G50R、L84R、D113E、A-A119D、D127N、K131の欠失、K131M、W132R、E133K、R151C(アミノ酸残基151がArgからCysに変化している、アポリポタンパク質 A - I - Paris)、E160K、E163G、P167R、L168R、E171V、P189R、R197C(アミノ酸残基173がArgからCysに変化している、アポリポタンパク質 A - I - Milano)及びE222K等の天然の変異体が存在する。また、保存的アミノ酸変更を有する変異体も含まれる。

10

20

## 【0105】

1つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、免疫グロブリン A プロテアーゼ (IgA プロテアーゼ) の切断部位の断片を含む。IgA プロテアーゼから公知である認識部位は、以下の配列を含み、「」は切断される結合の位置を意味する：

## 【0106】

## 【表1】

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| Pro-Ala-Pro ↓ Ser-Pro | (配列番号 61) |
| Pro-Pro ↓ Ser-Pro     | (配列番号 62) |
| Pro-Pro ↓ Ala-Pro     | (配列番号 63) |
| Pro-Pro ↓ Thr-Pro     | (配列番号 64) |
| Pro-Pro ↓ Gly-Pro     | (配列番号 65) |

30

ここでは、最初の3つがより頻繁に選択され、そして切断される。

## 【0107】

用語「アポリポタンパク質ミミック」は、それぞれのアポリポタンパク質の機能を模倣する合成ポリペプチドを意味する。例えば、「アポリポタンパク質 A - I ミミック」は、コレステロールの除去、すなわちコレステロールの逆流出に関して、天然アポリポタンパク質 A - I と同等の生物学的機能を示す合成ポリペプチドである。1つの実施形態において、アポリポタンパク質 A - I ミミックは、疎水性 - 親水性界面に集合する正に帯電したアミノ酸残基と親水性面の中心に集合する負に帯電したアミノ酸残基とを有する少なくとも1つの両親媒性の $\alpha$ -ヘリックスを含む。アポリポタンパク質 A - I の機能を模倣するために、アポリポタンパク質ミミックは、15~29のアミノ酸残基、1つの実施形態では22のアミノ酸残基の反復ポリペプチドを含む (PVLDEFREKLNEELEALKQKLIK (配列番号04); PVLDFRELLNELLEAL KQKLIK (配列番号05))。

40

## 【0108】

用語「心血管疾患」は、一般的に、動脈硬化症、冠状動脈性心疾患、脳血管疾患、大動脈腸骨動脈疾患、虚血性心疾患又は末梢血管疾患等の心臓又は血管に関する疾患又は症状

50

を意味する。このような疾患は、心筋梗塞、卒中、狭心症、一過性脳乏血発作、鬱血性心不全、大動脈瘤等の疾患の結果として有害事象に先立って発見することはできず、ほとんどの場合、被験体は死に至る。

【0109】

用語「コール酸」は、3, 7, 12 - トリヒドロキシ - 5 - コラン - 24 - 酸又はその塩、特にナトリウム塩を意味する。

【0110】

用語「臨界ミセル濃度」及びその省略形「CMC」（これらは互換的に使用することができる）は、それを超えると個々の界面活性剤分子（単量体）が、自発的にミセル（ミセル、球状、棒状、ラメラ構造等）に凝集する界面活性剤又は界面活性剤の濃度を意味する。

10

【0111】

用語「保存的アミノ酸変更」は、本発明に係る脂質粒子又はアポリポタンパク質の特性に影響を与えたり変化させたりしないアミノ酸配列の変更を意味する。変更は、部位特異的変異誘発及びPCR介在性突然変異誘発等の当技術分野において公知である標準的な技術により導入することができる。保存的アミノ酸変更としては、あるアミノ酸残基が、類似する側鎖を有するアミノ酸残基に置換されているものが挙げられる。類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。したがって、「変異体」タンパク質とは、本明細書において、10以下、1つの実施形態では約2～約5の付加、欠失、及び/又は置換により、「親」タンパク質のアミノ酸配列とはアミノ酸配列が異なる分子を指す。アミノ酸配列変更は、Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327, and Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033に記載されているような分子モデリングに基づく突然変異誘発によって行うことができる。

20

30

【0112】

異なるアミノ酸配列の相同性及び同一性は、BLOSUM30、BLOSUM40、BLOSUM45、BLOSUM50、BLOSUM55、BLOSUM60、BLOSUM62、BLOSUM65、BLOSUM70、BLOSUM75、BLOSUM80、BLOSUM85又はBLOSUM90等の周知のアルゴリズムを使用して計算することができる。1つの実施形態では、アルゴリズムは、BLOSUM30である。

【0113】

脂質粒子の形成は、それぞれの転移温度において、界面活性剤で可溶化した脂質と共にアポリポタンパク質をインキュベートすることにより行うことができる。用語「界面活性剤」は、表面活性化学物質を意味する。「界面活性剤」は、一般に、無極性の疎水性部分と極性の親水性部分とを有する両親媒性分子である。用語「両性イオン性界面活性剤」は、全体としてゼロ電荷を有し、そして、同時に少なくとも1つの正に帯電した部分と少なくとも1つの負に帯電した部分とを含む表面活性化学化合物を意味する。1つの実施形態では、界面活性剤は、糖系界面活性剤、ポリオキシアルキレン系界面活性剤、胆汁酸塩系界面活性剤、合成界面活性剤又はこれらの組合せから選択される。用語「糖系界面活性剤」は、n - オクチル - ベータ - D - グルコピラノシド、n - ノニル - ベータ - D - グルコピラノシド、n - ドデシル - ベータ - D - マルトピラノシド、又は5 - シクロヘキシルペンチル - ベータ - D - マルトピラノシド、及びこれらの誘導体から選択される界面活性剤を意味する。用語「胆汁酸塩系界面活性剤」は、コール酸ナトリウム、コール酸カリウム、コール酸リチウム、3 - [(3 - クロルアミドプロピル)ジメチルアンモニオ] - イル - プロパンスルホネート (CHAPS)、3 - [(3 - クロルアミドプロピル)ジメチル

40

50

アンモニオ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホネート (CHAPS)、及びこれらの誘導体から選択される界面活性剤を意味する。用語「ポリオキシアルキレン系界面活性剤」は、Tween20、Triton X-100、Pluronic F68、及びこれらの誘導体から選択される界面活性剤を意味する。用語「合成界面活性剤」は、Zwittergent 3-6、Zwittergent 3-8、Zwittergent 3-10、Zwittergent 3-12、及びこれらの誘導体から選択される界面活性剤を意味する。

【0114】

剤、例えば医薬製剤の「有効量」は、ある投薬量で、そして、必要な期間、所望の処置又は予防の結果を得るのに有効な量を指す。

【0115】

用語「高密度リポタンパク質粒子」又はその省略形「HDL粒子」(これらは互換的に使用することができる)は、主なタンパク質性の化合物としてアポリポタンパク質A-Iを含む脂質-タンパク質複合体を意味する。

【0116】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養物」は、互換的に使用され、そして、外因性の核酸が導入されている細胞を指し、このような細胞の後代も含む。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含み、これらは、継代数にかかわらず、それに由来する一次形質転換細胞及び後代を含む。後代は、親細胞と核酸含有量において完全に同一ではなくてもよく、突然変異を含有していてもよい。最初に形質転換された細胞においてスクリーニング又は選択したのと同じ機能又は生物活性を有する変異体後代も本明細書に含まれる。

【0117】

用語「脂質流出の増加」及びその文法的等価物は、細胞又はプラークからの脂質流出のレベル及び/又は割合の増加、脂質流出の促進、脂質流出の強化、脂質流出の補助、脂質流出のアプレギュレート、脂質流出の改善、及び/又は脂質流出の増大を意味する。1つの実施形態では、脂質流出は、リン脂質、トリグリセリド、コレステロール、及び/又はコレステロールエステルの排出を含む。

【0118】

「個体」又は「被験体」は、哺乳類である。哺乳類は、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ)、霊長類(例えば、ヒト及びサル等の非ヒト霊長類)、ウサギ、及びげっ歯類(例えば、マウス及びラット)を含むが、これらに限定されない。特定の態様では、個体又は被験体はヒトである。

【0119】

用語「DPPC」は、リン脂質1,2-ジ-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリンを指し、1,2-ジパルミトイル-ホスファチジルコリンとも呼ばれる。

【0120】

用語「多量体」は、2以上の単量体からなる複合体を意味する。多量体は、単量体間の非共有相互作用によって形成される。各単量体は、多量体化ドメインを含む。1つの実施形態では、多量体は、2つ又は3つの単量体を含む。別の実施形態では、多量体化ドメインは、各単量体に含まれる個々の多量体化ドメイン間の非共有相互作用を介して相互作用する。用語「多量体化ドメイン」は、2以上の単量体分子を共有結合又は非共有結合させることができるアミノ酸配列を意味する。多量体化ドメインは、異なるか、類似するか、又は同一のアミノ酸配列の多量体化ドメインと相互作用することができる。1つの実施形態では、多量体化ドメインは、配列番号53のコンセンサスアミノ酸配列と少なくとも68%同一であるアミノ酸配列を有するテトラネクチン三量体化構造エレメント又はその誘導体である。1つの実施形態では、配列番号53の位置50におけるシステイン残基は、異なるアミノ酸残基、別の実施形態では、セリン残基又はトレオニン残基又はメチオニン残基によって置換されている。多量体化ドメインを含むポリペプチドは、同じく多量体化ドメインを含む1以上の他のポリペプチドと結合することができる。多量体の形成は、適切な条件下でポリペプチドを混合することにより簡便に開始させることができる。別の実

10

20

30

40

50

施形態では、多量体化ドメインは、アミノ酸配列のN末端又はC末端から1～10残基が欠失しているか又は付加されている配列番号53のアミノ酸配列を有する。更なる実施形態では、多量体化ドメインは、アミノ酸配列のN末端から6個又は9個のアミノ酸残基が欠失している配列番号53のアミノ酸配列を有する。更に別の実施形態では、多量体化ドメインは、N末端のアミノ酸残基L又はN末端のアミノ酸残基C及びLが欠失している配列番号53のアミノ酸配列を有する。1つの実施形態では、多量体化ドメインは、テトラネクチン三量体化構造エレメントであり、そして、配列番号54のアミノ酸配列を有する。多量体は、1つの実施形態では、ホモマーである。

**【0121】**

多量体化ドメインを含む異なるアポリポタンパク質を組み合わせると多量体に組み込むこともできるので、多量体は、ホモマーであってもヘテロマーであってもよい。1つの実施形態では、多量体は、ホモ三量体である。

10

**【0122】**

1つの実施形態によれば、多量体化ドメインはテトラネクチンから得られる。1つの実施形態では、多量体化ドメインは、配列番号54のアミノ酸配列を有するテトラネクチン三量体化構造エレメントを含む。テトラネクチン三量体化構造エレメントの三量体化作用は、2つの他のテトラネクチン三量体化構造エレメントのコイルドコイル構造と相互作用して三量体を形成するコイルドコイル構造により引き起こされる。テトラネクチン三量体化構造エレメントは、ヒトのテトラネクチン、ウサギのテトラネクチン、マウスのテトラネクチン、又はサメ軟骨のC型レクチンから得ることができる。1つの実施形態では、テ

20

**【0123】**

用語「非共有相互作用」は、イオン性相互作用力(例えば、塩橋)、非イオン性相互作用力(例えば、水素結合)又は疎水性相互作用力(例えば、ファンデルワールス力又はスタッキング相互作用)等の非共有結合力を意味する。

**【0124】**

レファレンスポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性の割合(%)」は、配列のアライメントを作成し、そして、必要に応じて、配列同一性の割合を最大化するためにギャップを導入した後の、レファレンスポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基の割合であると定義され、任意の保存的アミノ酸置換は配列同一性の一部として考慮されない。アミノ酸配列同一性の割合を決定するためのアライメントは、当技術分野における技術の範囲内にある様々な方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェア等の公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して行うことができる。当業者は、比較される配列の完全長に対して最大のアライメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列のアライメントを作成するために適切なパラメータを決定することができる。しかし、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性の割合(%)の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して求められる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラム

30

40

**【0125】**

アミノ酸配列比較のためにALIGN-2を使用する場合、所与のアミノ酸配列Bに対する所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性の割合(%) (あるいは、所与のアミノ酸配列

50

B に対して特定のアミノ酸配列同一性の割合（％）を有する又は含む所与のアミノ酸配列 A と表現することもできる）は、以下の通り計算される：

$$100 \times \text{分数} X / Y$$

（式中、X は、配列アラインメントプログラムALIGN-2による A 及び B のアラインメントにおいて同一であると記録されたアミノ酸残基の数であり、そして、Y は、B におけるアミノ酸残基の総数である）。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは等しくない場合、B に対する A のアミノ酸配列同一性の割合（％）が、A に対する B のアミノ酸配列同一性の割合（％）とは等しくなることが理解されるであろう。特に別記しない限り、本明細書において使用されるアミノ酸配列の同一性の割合（％）の値は全て、ALIGN-2 コンピュータプログラムを使用して、直前の段落に記載の通り得られる。

10

【0126】

用語「医薬製剤」は、それに含有されている活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、そして、前記製剤が投与される被験体に対して許容し得ないほど毒性である追加成分を含有しない調製物を指す。

【0127】

「薬学的に許容しうる担体」は、医薬製剤における活性成分以外の成分であって、被験体に対して無毒である成分を指す。薬学的に許容しうる担体は、バッファ、賦形剤、安定剤又は保存剤を含むが、これらに限定されない。

【0128】

用語「ホスファチジルコリン」は、1つのグリセロール部分、2つのカルボン酸部分、及び1つのホスホコリン部分からなる分子を意味し、前記グリセロール部分は、それぞれエステル結合、すなわち、2つのカルボン酸エステル結合及び1つのリン酸エステル結合により他の部分に共有結合し、前記リン酸エステル結合は、前記グリセロール部分の1-ヒドロキシル基又は3-ヒドロキシル基のいずれかに結合する。用語「カルボン酸部分」は、少なくとも1つのアシル基（R-C(O)O）を含む有機部分を意味する。ホスファチジルコリンは、任意の種類又は起源であってよい。1つの実施形態では、ホスファチジルコリンは、卵ホスファチジルコリン、大豆ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジラウリルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、1-ミリストイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン、1-パルミトイル-2-ミリストイルホスファチジルコリン、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン、1-オレオイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン、ならびにこれらの類似体及び誘導体から選択される。

20

30

【0129】

本明細書において用いられるとき、リン脂質は全て、任意の起源、すなわち（適切な場合には）大豆、乳、卵又は更にはヒト以外の動物の内臓等に由来してよく、これらは、天然由来であっても、半合成であっても、更には完全に合成であってもよい。

【0130】

用語「POPC」は、リン脂質1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリンを指し、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルコリンとも呼ばれる。

40

【0131】

本明細書で使用するとき、「処置」（及び「処置する」又は「処置されている」等の文法上の変形）は、処置される個体の自然経過を変化させようとする臨床的介入を指し、そして、予防のために又は臨床病理の間に行うことができる。処置の望ましい効果は、疾患の発生又は再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的帰結の減少、転移の予防、疾患の進行の速度低下、病状の回復又は軽減、及び寛解又は予後の改善を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、疾患の発

50

現を遅らせるか又は疾患の進行を緩徐にするために使用される。

【 0 1 3 2 】

用語「変異体」は、本明細書に報告されるアポリポタンパク質又はアポリポタンパク質ミミックの変異体も含み、前記変異体においては、それぞれのアポリポタンパク質又はアポリポタンパク質ミミックのアミノ酸配列は、1以上のアミノ酸の置換、付加又は欠失を含む。アミノ酸変更は、アポリポタンパク質受容体又はアポリポタンパク質転換酵素に対するアポリポタンパク質の親和性を増加させる場合も減少させる場合もあり、又はそれぞれのアポリポタンパク質に比べてアポリポタンパク質変異体の安定性を上昇させる場合もあり、それぞれのアポリポタンパク質に比べて水溶液中におけるアポリポタンパク質変異体の溶解度を上昇させる場合もあり、又はそれぞれのアポリポタンパク質に比べて宿主細胞におけるアポリポタンパク質変異体の組換え体生成を増加させる場合もある。

10

【 0 1 3 3 】

脂質粒子

本明細書においては

- a) テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I と、
- b) ホスファチジルコリンと、
- c) 更なる脂質とを含む脂質粒子が報告される。

【 0 1 3 4 】

1つの実施形態では、脂質粒子は、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I と、第1のホスファチジルコリンと、第2のホスファチジルコリンとを含む。1つの実施形態では、第1のホスファチジルコリンと第2のホスファチジルコリンとは、ホスホグリセロール骨格にエステル化される1つもしくは2つのカルボン酸部分又はカルボン酸部分誘導体において異なる。1つの実施形態では、第1のホスファチジルコリンはPOPCであり、そして、第2のホスファチジルコリンはDPPCである。1つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I とホスファチジルコリンとは、脂質粒子において非共有結合している。1つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、組み換えにより生成されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I である。

20

【 0 1 3 5 】

脂質の組合せの選択により、アポリポタンパク質を含む脂質粒子の有効性及び肝臓安全性が決定される。DMP Cを含有する脂質粒子に関するウサギを使用したインビボ研究では、30 mg/kgで処理されたウサギは、重篤な副作用を示すが生き残り、一方、100 mg/kgで処理されたウサギが死亡することが見出された。

30

【 0 1 3 6 】

インビトロにおける機能試験では、DPPC又はPOPC等の単一のホスファチジルコリンを含有する脂質粒子がLCATを活性化することが確認された。

【 0 1 3 7 】

脂質粒子が異なるリン脂質の組合せを含む場合、コレステロール排出がより多いことも示された。

【 0 1 3 8 】



## 【表 2】

表 1: ウサギを使用するインビボ研究のために調製された脂質組成の異なるリン脂質の組合せ

| 脂質粒子を生成するために使用したリン脂質のモル比 | LCAT 基質 | コレステロール排出 |
|--------------------------|---------|-----------|
| POPC                     | yes     | yes       |
| POPC:DPPC<br>3:1         | yes     | yes       |
| POPC:DPPC<br>1:1         | yes     | yes       |
| POPC:DPPC<br>1:3         | no      | yes       |
| DPPC                     | no      | yes       |

10

20

## 【0139】

これら結果は、インビボデータによっても確認され、全ての組合せについてコレステロールの動員が実証された。しかし、単一のホスファチジルコリン DPPC のみ又は DPPC とスフィンゴミエリン (SM) との組合せを含有する脂質粒子については、肝酵素の増加を測定することができる (図 1)。

## 【0140】

技術的な視点からみると、純粋な POPC による形成と比べて、純粋な DPPC を含む脂質粒子による形成の方が都合がよい。沈殿物形成のリスクは、異なるリン脂質の組合せを使用することにより低減される。また、純粋な DPPC は相転移温度が 41 であるので、相転移温度が 4 である純粋な POPC と比較して、脂質粒子の調製がより容易である。また、得られる生成物がより均質である。これは、タンパク質 - 脂質組成物の測定 (タンパク質コンジュゲート分析) もできる分析ツールである SEC - MALLS を介する脂質粒子の分析によって確認することができる。サイズ排除クロマトグラフィー (UV280 検出) において分割されたサンプルのクロマトグラムを図 2 に示す。分離されたピーク又は半ば離れたピークが複数発生したことからサンプルの不均質性が分かる。

30

## 【0141】

脂質粒子を生成するために純粋な POPC を使用する場合の脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりの POPC 分子の数は、1 つの実施形態では 40 ~ 85、1 つの実施形態では 50 ~ 80、1 つの実施形態では 54 ~ 75 である。

## 【0142】

脂質粒子を生成するために純粋な DPPC を使用する場合の脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりの DPPC 分子の数は、1 つの実施形態では 50 ~ 150、1 つの実施形態では 65 ~ 135、1 つの実施形態では 76 ~ 123、そして、1 つの実施形態では 86 ~ 102 である。

40

## 【0143】

脂質粒子を生成するために 1 : 3 のモル比の POPC と DPPC との混合物を使用する場合の脂質粒子におけるアポリポタンパク質単量体 1 個当たりのリン脂質分子の数は、1 つの実施形態では約 50 ~ 約 120、1 つの実施形態では約 65 ~ 約 105、そして、1 つの実施形態では約 72 ~ 約 96 である。

## 【0144】

50

脂質粒子を生成するために1：1のモル比のPOPCとDPPCとの混合物を使用する場合の脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりの脂質分子の数は、1つの実施形態では50～120、1つの実施形態では60～100、1つの実施形態では71～92、そして、1つの実施形態では約71～約85である。

【0145】

脂質粒子を生成するために3：1のモル比のPOPCとDPPCとの混合物を使用する場合の脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりの脂質分子の数は、1つの実施形態では50～105である。

【0146】

脂質粒子を生成するために3：1のモル比のPOPCとDPPCとの混合物を使用する場合の脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりの脂質分子の数は、1つの実施形態では60～95である。

10

【0147】

脂質粒子を生成するために3：1のモル比のPOPCとDPPCとの混合物を使用する場合の脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりの脂質分子の数は、1つの実施形態では60～90である。

【0148】

脂質粒子を生成するために3：1のモル比のPOPCとDPPCとの混合物を使用する場合の脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりの脂質分子の数は、1つの実施形態では60～88である。

20

【0149】

脂質粒子を生成するために3：1のモル比のPOPCとDPPCとの混合物を使用する場合の脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりの脂質分子の数は、1つの実施形態では62～80である。

【0150】

脂質粒子を生成するために3：1のモル比のPOPCとDPPCとの混合物を使用する場合の脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりの脂質分子の数は、1つの実施形態では66～86である。

【0151】

脂質粒子を生成するために3：1のモル比のPOPCとDPPCとの混合物を使用する場合の脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりの脂質分子の数は、1つの実施形態では64～70である。

30

【0152】

脂質粒子を生成するために3：1のモル比のPOPCとDPPCとの混合物を使用する場合の脂質粒子におけるアポリタンパク質単量体1個当たりの脂質分子の数は、1つの実施形態では約66である。

【0153】

アポリタンパク質及びPOPCを含む脂質粒子を生成する場合、1つの実施形態ではアポリタンパク質のPOPCに対するモル比1：40～1：100を使用し、1つの実施形態ではモル比1：40～1：80を使用し、そして、1つの実施形態ではモル比約1：60を使用する。

40

【0154】

アポリタンパク質及びDPPCを含む脂質粒子を生成する場合、1つの実施形態ではアポリタンパク質のDPPCに対するモル比1：70～1：100を使用し、1つの実施形態ではモル比1：80～1：90を使用し、そして、1つの実施形態ではモル比約1：80を使用する。

【0155】

アポリタンパク質、POPC及びDPPCを含む脂質粒子(POPCとDPPCとのモル比1：3)を生成する場合、1つの実施形態ではアポリタンパク質のPOPC及びDPPCに対するモル比1：60～1：100を使用し、1つの実施形態ではモル比1：

50

70 ~ 1 : 90 を使用し、そして、1つの実施形態ではモル比約 1 : 80 を使用する。

【0156】

アポリポタンパク質、DPPC 及び POPC を含む脂質粒子 (POPC と DPPC とのモル比 1 : 1) を生成する場合、1つの実施形態ではアポリポタンパク質の POPC 及び DPPC に対するモル比 1 : 60 ~ 1 : 100 を使用し、1つの実施形態ではモル比 1 : 60 ~ 1 : 80 を使用し、そして、1つの実施形態ではモル比約 1 : 70 を使用する。

【0157】

アポリポタンパク質、DPPC 及び POPC を含む脂質粒子 (POPC と DPPC とのモル比 3 : 1) を生成する場合、1つの実施形態ではアポリポタンパク質の POPC 及び DPPC に対するモル比 1 : 60 ~ 1 : 100 を使用し、1つの実施形態ではモル比 1 : 50 ~ 1 : 70 を使用し、そして、1つの実施形態ではモル比約 1 : 60 を使用する。

10

【0158】

1つの実施形態では、脂質粒子を生成するために脂質の混合物を使用する場合、前記混合物は、4 ~ 45、1つの実施形態では 10 ~ 38、そして、1つの実施形態では 15 ~ 35 の相転移温度を有する。

【0159】

脂質粒子は、1つの実施形態では脂質粒子 1 個当たり平均数 1 ~ 10 個のアポリポタンパク質分子、1つの実施形態では脂質粒子 1 個当たり平均数 1 ~ 8 個のアポリポタンパク質分子、そして、1つの実施形態では脂質粒子 1 個当たり平均数 1 ~ 4 個のアポリポタンパク質分子を含む。

20

【0160】

1つの実施形態では、脂質粒子は、脂質粒子 1 個当たり平均数少なくとも 1、又は 2、又は 3、又は 4、又は 5、又は 6、又は 7、又は 8、又は 9、又は 10 個のアポリポタンパク質分子を含む。1つの実施形態では、平均数は 1 である。

【0161】

1つの実施形態では、脂質粒子は、アポリポタンパク質に加えて 1 以上の更なるポリペプチドを含む。

【0162】

限定するものではないが、脂質粒子は、酵素の補因子として及び / 又は脂質、特にコレステロールを取り込むためのキャリアとして機能し得る。

30

【0163】

1 以上の界面活性剤が、本明細書に報告される脂質粒子中に存在し得る。このような界面活性剤は、任意の界面活性剤、すなわち、薬学的に許容しうる界面活性剤又は無毒な濃度の他の界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤又はイオン性界面活性剤等であってよい。非イオン性界面活性剤は、1 以上のヒドロキシル基を含有する有機化合物のアルキレンオキシド誘導体であってよい。1つの実施形態では、非イオン性界面活性剤は、エトキシ化及び / 又はプロポキシ化されたアルコール、あるいはそのエステル化合物又は混合物から選択される。別の実施形態では、エステルは、ソルビトールと脂肪酸とのエステル、例えば、ソルビタンモノオレエート又はソルビタンモノパルミテート、油性ショ糖エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンステロールエーテル、ポリオキシエチレン - ポリプロポキシアルキルエーテル、ブロック重合体及びセチルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油又は硬化ヒマシ油誘導体、及びポリグリセリン脂肪酸エステルから選択される。1つの実施形態では、非イオン性界面活性剤は、Pluronic (登録商標)、Poloxamer (登録商標)、Span (登録商標)、Tween (登録商標)、Polysorbate (登録商標)、Tyloxapol (登録商標)、Emulphor (登録商標) 又は Cremophor (登録商標) から選択される。

40

【0164】

イオン性界面活性剤は、胆管剤であってよい。1つの実施形態では、イオン性界面活性剤は、コール酸もしくはデオキシコール酸、又はこれらの塩及び誘導体から、あるいはオ

50

レイン酸、リノール酸等の遊離脂肪酸から選択される。

【0165】

1つの実施形態では、イオン性界面活性剤は、 $C_{10}$  -  $C_{24}$  アルキルアミン又はアルカノールアミン等のカチオン性脂質、及びカチオン性コレステロールエステルから選択される。

【0166】

1つの実施形態では、脂質粒子は、0.75重量%未満の界面活性剤を含む。

【0167】

1つの実施形態では、脂質粒子は、0.3重量%未満の界面活性剤を含む。

【0168】

1つの実施形態では、界面活性剤は、糖系界面活性剤、ポリオキシアルキレン系界面活性剤、胆汁酸塩系界面活性剤、合成界面活性剤又はこれらの組合せから選択される。1つの実施形態では、界面活性剤はコール酸である。

【0169】

コレステロールが血液へ動員される効率は、アポリポタンパク質をインビボで投与した後に、総コレステロール濃度とアポリポタンパク質濃度とのそれぞれの可動域を比較することにより測定することができる。定量的評価については、基準線補正された総コレステロールの濃度 - 時間曲線下面積及びアポリポタンパク質の濃度 - 時間曲線下面積 (AUC) の指数を計算した。

【0170】

本明細書に報告される脂質粒子、特に配列番号01のテトラネクチン - アポリポタンパク質と3:1のモル比のPOPC及びDPPCとを含む脂質粒子は、インビボにおいてコレステロール動員の増強を示す。

【0171】

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I

上に概説した脂質粒子に加えて、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I も本明細書に報告される。

【0172】

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、ヒトのテトラネクチン三量体化構造エレメントと野性型のヒトのアポリポタンパク質 A - I との融合タンパク質である。ヒトのテトラネクチン部分のアミノ酸配列は、天然に存在する切頭部位である位置10のイソロイシン残基から始まる最初の9アミノ酸だけ短くしてもよい。この切頭の結果として、位置4のトレオニン残基におけるO-グリコシル化部位が欠損する。テトラネクチン三量体化構造エレメントとヒトのアポリポタンパク質 A - I との間で、5アミノ酸残基「SLKGS」(配列番号03)が除去された。

【0173】

発現及び精製を改善するために、N末端精製タグ、例えば、ヘキサヒスチジンタグとIgAプロテアーゼ切断部位とを含むコンストラクトを作製してもよい。特異的な切断の結果として、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I のN末端において2個のアミノ酸(第1のアミノ酸としてアラニン又はグリシン又はセリン又はプロリン、そして、第2のアミノ酸としてプロリン)が維持される。テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、配列番号01のアミノ酸配列を有してよい。

【0174】

テトラネクチン三量体化構造エレメントは、個々のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 単量体の各々の間の非共有相互作用により構成される、三量体のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 多量体を形成することを可能にするドメインを備える。

【0175】

別の精製法を使用することにより、精製タグ及びIgAプロテアーゼ切断部位を省略し、配列番号02のアミノ酸配列のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を得ることもできる。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 7 6 】

1つの実施形態では、アポリポタンパク質は、保存的アミノ酸置換を含む変異体であってもよい。

## 【 0 1 7 7 】

アポリポタンパク質 A - I は、酵素的に、NMR分光法を介して、又はモノクローナルもしくはポリクローナルな抗アポリポタンパク質 A - I 抗体の使用によって測定することができる。したがって、本明細書に報告される他の態様は、本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I に特異的に結合するポリクローナル及びモノクローナルな抗体である。このような抗体は、当業者に公知の方法によって得ることができる。また、イムノアッセイで使用するための抗体の標識も、当業者に公知の方法を用いて実施することができる。

10

## 【 0 1 7 8 】

1つの実施形態では、アポリポタンパク質は、保存的アミノ酸置換を含む変異体、又はアポリポタンパク質 A - I ミミックであってよい。1つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、配列番号 0 2 又は配列番号 6 6 又は配列番号 6 7 のアミノ酸配列を有し、ここで、X は、配列番号 6 8 ~ 配列番号 1 0 5 から選択される。

## 【 0 1 7 9 】

したがって、1つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、以下のアミノ酸配列を有する：

## 【 0 1 8 0 】

## 【表 3】

IVNAKKDVVNTKMFEELEKSRDLTLAQEVALLKEQQALQTVDEPPQSPWDR  
VKDLATVYVDVLEKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSK  
LREQLGPVTQEFWDNLEKETEGRLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKW  
QEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVD  
ALRTHLAPYSDELRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKA  
KPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ (配列番号 02)

20

## 【 0 1 8 1 】

1つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、以下のアミノ酸配列を有する：

## 【 0 1 8 2 】

## 【表 4】

(A,G,S,T)PIVNAKKDVVNTKMFEELEKSRDLTLAQEVALLKEQQALQTVDEP  
PQSPWDRVKDLATVYVDVLEKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDS  
VTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGRLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLD  
DFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDR  
ARAHVDALRTHLAPYSDELRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHL  
STLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ (配列番号 66)

30

40

## 【 0 1 8 3 】

1つの実施形態では、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、以下のアミノ酸配列を有する：

## 【 0 1 8 4 】

## 【表 5】

(M)HHHHHHXIVNAKKDVVNTKMFELKSRLDTLAQEVALLKEQQALQTV  
 DEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDN  
 WDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQP  
 YLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPGEM  
 RDRARAHVDALRTHLAPYSDELRLAARLEALKENGGARLAEYHAKAT  
 EHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ (配列番  
 号 67)

10

## 【 0 1 8 5 】

式中、Xは、以下のアミノ酸配列：A、G、S、P、AP、GP、SP、PP、GSAP（配列番号 6 8）、GSGP（配列番号 6 9）、GSSP（配列番号 7 0）、GSPP（配列番号 7 1）、GGGS（配列番号 7 2）、GGGS（配列番号 7 3）、GGSGGS（配列番号 7 4）、GGSGSGGS（配列番号 7 5）、GGSGSGSGGS（配列番号 7 6）、GGSGSGSGSGGS（配列番号 7 7）、GGGSAP（配列番号 7 8）、GGSGP（配列番号 7 9）、GGSSP（配列番号 8 0）、GGSP（配列番号 8 1）、GGGSAP（配列番号 8 2）、GGSGP（配列番号 8 3）、GGSGSP（配列番号 8 4）、GGSGSP（配列番号 8 5）、GGSGSGSAP（配列番号 8 6）、GGSGSGSGP（配列番号 8 7）、GGSGSGSGSP（配列番号 8 8）、GGSGSGSGSP（配列番号 8 9）、GGSGSGSGSGSAP（配列番号 9 0）、GGSGSGSGSGSGP（配列番号 9 1）、GGSGSGSGSGSGSP（配列番号 9 2）、GGSGSGSGSGSGSP（配列番号 9 3）、GGGSAP（配列番号 9 4）、GGSGP（配列番号 9 5）、GGSGSP（配列番号 9 6）、GGSGSP（配列番号 9 7）、GGSGSGSGSAP（配列番号 9 8）、GGSGSGSGSGP（配列番号 9 9）、GGSGSGSGSGSP（配列番号 1 0 0）、GGSGSGSGSGSP（配列番号 1 0 1）、GGSGSGSGSGSGSAP（配列番号 1 0 2）、GGSGSGSGSGSGSGP（配列番号 1 0 3）、GGSGSGSGSGSGSGSP（配列番号 1 0 4）、及びGGSGSGSGSGSGSGSP（配列番号 1 0 5）のいずれであってもよい。

20

## 【 0 1 8 6 】

ポリペプチドが大腸菌株において組み換えにより生成される場合、N末端のメチオニン残基は、通常、大腸菌のプロテアーゼによって効率的には切断されないことに留意しなければならない。したがって、生成されるポリペプチドの一部には、N末端のメチオニン残基が存在する。

30

## 【 0 1 8 7 】

特性：

本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 又は本明細書に報告される脂質粒子は、非正常な脂質レベル、又は血管におけるプラーク等の身体の構成要素内における脂質の沈着物を特徴とする疾患又は症状を処置及び / 又は診断するために使用することができる。

## 【 0 1 8 8 】

L C A T によって触媒されるコレステロールのエステル化を補助する本明細書に報告される脂質粒子の能力を測定するために、コレステロールのエタノール溶液を添加することにより、コレステロールを脂質粒子に組み込むことができる。純粋な P O P C を含有する脂質粒子は、野生型のアポリポタンパク質 A - I 又はテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 等のアポリポタンパク質成分とは無関係に、D P P C を含有する複合体よりも優れた L C A T 基質である（図 3）。

40

## 【 0 1 8 9 】

様々な P O P C と D P P C との混合物を含む脂質粒子におけるコレステロールのエステル化の初速度は、前記混合物が単一の純粋なホスファチジルコリンよりも優れた L C A T 基質であることを示す。このことは、コレステロールのエステル化の初速度から分かる（表 2 及び図 4 を参照されたい）。

## 【 0 1 9 0 】

50

## 【表 6】

表 2: 様々なリン脂質の混合物を含む脂質粒子におけるコレステロールのエステル化の初速度

| 脂質粒子を生成するために使用されるリン脂質のモル比 | $K_m$<br>[ $\mu M$ ] | $V_{max}$<br>[nmol エステル/時間/ $\mu g$ LCAT] |
|---------------------------|----------------------|---|
| POPC                      | 4.6                  | 1.6                                       |
| POPC:DPPC 3:1             | 0.4                  | 1.9                                       |
| POPC:DPPC 1:1             | 0.5                  | 1.8                                       |
| POPC:DPPC 1:3             | 1.0                  | 1.7                                       |
| DPPC                      | 0.9                  | 1.8                                       |

10

## 【0191】

THP-1 単球性白血病細胞をホルボールミスチン酸アセテートに曝露することにより得られ、そして、放射性標識されたコレステロールトレーサがロードされているマクロファージ（例えば、ヒト THP-1 細胞）を、コレステロールアクセプター試験化合物に曝露してよい。

20

## 【0192】

アクセプター試験化合物によって誘導される流出速度を、上清におけるコレステロール放射活性の、細胞及びその上清における放射活性の合計に対する比として計算し、そして、アクセプターを含有しない媒体に曝露した細胞と比較し、そして、直線適合によって分析する。主に ABCA-1 をアップレギュレートし、そして、ABCA-1 媒介輸送に流出を偏らせることが知られている RXR-LXR アゴニストに曝露された細胞、及び曝露されていない細胞を用いて、並行実験を実施してよい。

## 【0193】

RXR-LXR 脂質粒子で予め処理されない細胞では、脂質付加 (lipidated) されていないテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I により得られる流出に比べてコレステロール排出がより増加することが分かる。一連の試験において、流出に対する脂質混合の影響はほとんどみられない (図 5)。RXR-LXR で予め処理された細胞では、脂質付加されていないテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I を用いても、コレステロール排出が同等に増加することが分かる。予め処理されていない細胞でみられた増加と比較して、全体的な増加はより多かった。一連の試験において、流出に対する脂質混合の影響はほとんどみられない (図 6)。

30

## 【0194】

様々な脂質粒子をウサギにおいてインビボで試験した。静脈注射として脂質粒子を適用し、そして、適用後 96 時間にわたって連続的に血液サンプリングを実施した。肝酵素、コレステロール及びコレステロールエステルの値を測定した。血漿中濃度は、全ての試験した脂質粒子について同等であり、血漿中濃度の初期分布相に続いて対数線形減少を含む (図 7)。表 3 から分かる通り、薬物動態パラメータは、全ての試験した化合物について類似している。観察された半減期は、約 1.5 日である。

40

## 【0195】

## 【表 7】

表 3: 測定された薬物動態パラメータ

| 脂質粒子を生成<br>するために使用<br>されるリン脂質<br>のモル比 | $C_L$<br>[ml/時間/kg] | $V_{ss}$<br>[ml/kg] | $T_{1/2}$<br>[時間] | $C_{max}$<br>[mg/ml] |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|----------------------|
| POPC                                  | $0.89 \pm 0.22$     | $45.0 \pm 2.5$      | $36.9 \pm 8.2$    | $2.40 \pm 0.19$      |
| POPC:DPPC 3:1                         | $0.82 \pm 0.06$     | $37.8 \pm 5.6$      | $34.2 \pm 4.5$    | $2.65 \pm 0.28$      |
| POPC:DPPC 1:1                         | $0.85 \pm 0.14$     | $43.1 \pm 5.9$      | $38.6 \pm 10.6$   | $2.34 \pm 0.31$      |
| DPPC                                  | $0.96 \pm 0.10$     | $37.8 \pm 4.9$      | $30.2 \pm 7.7$    | $2.29 \pm 0.19$      |
| DPPC:SM 9:1                           | $1.28 \pm 0.62$     | $50.7 \pm 8.7$      | $31.3 \pm 8.2$    | $1.91 \pm 0.33$      |

10

## 【0196】

図 8 から分かる通り、血漿中においてコレステロールは動員され、そして、エステル化される。テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の濃度が減少し始めた後でさえも、血漿コレステロールエステルレベルは上昇し続ける。血漿テトラネクチン - アポリポタン

20

## 【0197】

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を含む脂質粒子は、図 1 及び 9 から分かる通り、ウサギに加えてマウスでも肝酵素を誘導しない。また、静脈適用の 2 時間後に得られた血漿サンプルにおいて、溶血を測定することはできない (図 10)。

## 【0198】

したがって、本明細書に報告される態様は、本明細書に報告される脂質粒子又は本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を含む医薬組成物及び診断用組成物である。

30

## 【0199】

本明細書に報告される脂質粒子は、以下の表 4 に示す通り、脂質付加されていないアポリポタンパク質及び他の脂質粒子に比べて、インビボにおける特性が改善された。

## 【0200】



【表 8】

表 4: 様々なアポリポタンパク質及び脂質粒子のインビボにおける特性

| タンパク質                      | 脂質粒子に含まれる成分 | 適用する動物 | 最高投与量                | 急性肝臓毒性作用  | 参照文献  |
|----------------------------|-------------|--------|----------------------|---|---|
| アポリポタンパク質 A-I 変異体          | 粒子無し        | ラット    | 経口,<br>1 g/kg        | 500 mg/kg 以下では毒性作用無し                                  | US 2005/0287636                                       |
| A-I, テトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I | DMPC        | マウス    | i.v. 1 to 1.2 mg/マウス | 記載無し  | WO 2002/38609;<br>Graversen, (2008)                   |
| プロアポリポタンパク質 A-I            | SM          | 報告無し   | 報告無し                 | 注射、200 mg/kg の投与量で毒性                                  | WO 2003/096983  |
| アポリポタンパク質 A-I              | PG/SM       | ウサギ    | i.v. 15 mg/kg        | 記載無し  | WO 2006/100567  |
| アポリポタンパク質 A-I              | PC (大豆)     | ヒト     | 80 mg/kg             | 処理群は、肝機能試験の異常(アラニンアミノトランスフェラーゼが 10 倍増加)により早い段階で中止     | WO 2007/137400  |
| プロアポリポタンパク質 A-I 変異体        | POPC        | ヒト     | 45 mg/kg             | 1 人の患者は、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼレベルの上昇(正常の上限の 3 倍)が生じたため中止 | Nissen, S.E., et al.,<br>JAMA 290 (2003)<br>2292-2300 |
| テトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I      | DMPC        | ウサギ    | 100 mg/kg            | 試験した全ての動物において 3~4 時間後致死                               |   |
| テトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I      | POPC/DPPC   | ウサギ    | 100 mg/kg            | 増加は観察されず  |   |

10

20

30

40

| タンパク質                 | 脂質粒子に含まれる成分 | 適用する動物 | 最高投与量          | 急性肝臓毒性作用 | 参照文献 |
|-----------------------|-------------|--------|----------------|----------|------|
| テトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I | POPC/DPPC   | ラット    | i.v. 500 mg/kg | 増加は観察されず |      |
| テトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I | POPC/DPPC   | カニクイザル | i.v. 200 mg/kg | 増加は観察されず |      |

10

## 【0201】

## 脂質粒子の形成

本明細書に報告される脂質粒子の形成については、凍結乾燥、凍結融解、界面活性剤可溶化に続いて透析、顕微溶液化、超音波処理、及びホモジナイズ等の様々な方法が公知である。

## 【0202】

例えば、リン脂質と界面活性剤との水性混合物を、精製されたアポリポタンパク質と共にインキュベートしてよい。アポリポタンパク質は、ネイティブな形態で添加してよい。界面活性剤は、透析又はダイアフィルトレーションによって後に除去される。テトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I を含む脂質粒子の形成は、それぞれの転移温度において、単量体又は多量体の形態のテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I を界面活性剤可溶化脂質と共にインキュベートすることにより行うことができる。透析により界面活性剤を除去することにより、脂質粒子が形成される。アポリポタンパク質を含有する脂質粒子を形成するための一般的な方法は、例えば、Jonas, A., *Methods Enzymol.* 128 (1986) 553-582又は *Experimental Lung Res.* 6 (1984) 255-270に記載されているようなコール酸法に基づく方法である。透析により界面活性剤を除去することにより、脂質粒子が形成される。

20

## 【0203】

脂質粒子を形成するために考慮しなければならない要点は、i) 生物活性についての要件、及び ii) 脂質粒子の製造可能性に対する技術的要件である。アポリポタンパク質を含む脂質粒子の形成については、これら要件は相反する。

30

## 【0204】

技術的な視点からは、炭素原子16個以下の鎖を有するカルボン酸部分を含有する飽和リン脂質（例えば、ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、DPPC；ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、DMPC等）が選択される。これとは対照的に、生物学的データからは、炭素原子が少なくとも16個のカルボン酸部分を含有する非飽和リン脂質（例えば、パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、POPC；ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、SOPC）がより有効であり、そして、肝臓毒性を有しないと推測することができる。

40

## 【0205】

アポリポタンパク質を含有する脂質粒子を形成するために、ホスファチジルコリン DPPC 及び POPC、ならびにこれらの混合物を使用することができる。これら例示的なホスファチジルコリンは、1つのカルボン酸部分が異なり、そして、ホスホグリセロール骨格にエステル化される1つの同一のカルボン酸部分を有する。DPPCを使用したとき、脂質粒子の製造がより容易であった。対照的に、POPCは、特に、動員されたコレステロールをコレステロールエステルに変換するために必要なレシチンコレステロールアセチルトランスフェラーゼ（LCAT）酵素を活性化するための基質として、インビトロ機能アッセイにおいてより有効であった。例えば POPC 及び DPPC 等の2種のホスファチ

50

ジルコリンの混合物を様々なモル比で含む脂質粒子は、ホスファチジルコリンを1種しか含まない脂質粒子に比べて特性が改善されることが見出されている（図4を参照されたい）。

【0206】

ヒトHDL粒子に由来する組換え型アポリポタンパク質又は脱脂型アポリポタンパク質から脂質粒子を再構成する様々な方法が報告されている（HDL = 高密度リポタンパク質）。例えば、リン脂質と界面活性剤との水性混合物を、精製されたアポリポタンパク質と共にインキュベートする。アポリポタンパク質は、ネイティブな形態で添加される。界面活性剤は、透析又はダイアフィルトレーションによって後に除去される。テトラネクチン - アポリポタンパク質A - Iを含む脂質粒子の形成は、それぞれの転移温度において、テ  
10

【0207】

脂質粒子は、沈澱及び/又はクロマトグラフィー工程の組合せによって精製することができる。例えば、過剰な界面活性剤、すなわち、脂質粒子の一部ではない界面活性剤は、疎水性吸着クロマトグラフィー工程で除去することができる。脂質粒子は、界面活性剤を  
20

【0208】

本発明についての理解を助けるために以下の実施例、配列表及び図面を提供し、その真の範囲を添付の特許請求の範囲に記載する。本発明の趣旨から逸脱することなく、記載さ  
20

【0209】

配列表の説明

配列番号01 テトラネクチン - アポリポタンパク質A - I (1)。

配列番号02 テトラネクチン - アポリポタンパク質A - I (2)。

配列番号03 切断されたペプチド。

配列番号04 アポリポタンパク質A - I 模倣体(1)。

配列番号05 アポリポタンパク質A - I 模倣体(2)。

配列番号06 ヒトのアポリポタンパク質A - I。

配列番号07 ヒトのアポリポタンパク質A - II。

配列番号08 ヒトのアポリポタンパク質A - IV。

配列番号09 ヒトのアポリポタンパク質A - V。

配列番号10 ヒトのアポリポタンパク質C - I。

配列番号11 ヒトのアポリポタンパク質C - II。

配列番号12 ヒトのアポリポタンパク質C - III。

配列番号13 ヒトのアポリポタンパク質C - IV。

配列番号14 ヒトのアポリポタンパク質D。

配列番号15 ヒトのアポリポタンパク質E。

配列番号16 ヒトのアポリポタンパク質F。

配列番号17 ヒトのアポリポタンパク質H。

配列番号18 ヒトのアポリポタンパク質L - I。

配列番号19 ヒトのアポリポタンパク質L - II。

配列番号20 ヒトのアポリポタンパク質L - III。

配列番号21 ヒトのアポリポタンパク質L - IV。

配列番号22 ヒトのアポリポタンパク質L - V。

配列番号23 ヒトのアポリポタンパク質L - VI。

配列番号24 ヒトのアポリポタンパク質M。

配列番号25 ヒトのアポリポタンパク質O。

配列番号26 ヒトのアポリポタンパク質OL。

10

20

30

40

50

配列番号 27 ヒトのアポリポタンパク質 c l u s。

配列番号 28 ~ 52 アポリポタンパク質。

配列番号 53 ヒトのテトラネクチン三量体化ドメイン。

配列番号 54 短縮型のヒトのテトラネクチン三量体化ドメイン。

配列番号 55 ヒトのインターフェロン断片。

配列番号 56 ヘキサヒスチジンタグ。

配列番号 57 融合タンパク質。

配列番号 58 プライマー N 1。

配列番号 59 プライマー N 2。

配列番号 60 ~ 65 I g A プロテアーゼ切断部位。

配列番号 66 テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I。

配列番号 67 h i s - タグを有するテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I。

配列番号 68 ~ 105 リンカー。

【図面の簡単な説明】

【0210】

【図1】脂質組成の異なる5つの脂質粒子を用いて実施したウサギのインビボ研究の結果。上：調製した全てのバッチについて、コレステロール動員、ひいては有効性を示すことができた。下：単一のリン脂質としてDPPCを使用することによって作製された脂質粒子について、肝酵素の増加が認められた。

【図2】本発明に係るPOPC及びアポリポタンパク質（モル比1：20～1：160）の脂質粒子のSEC-MALLS分析。

【図3】LCAT活性に対するDPPC及びPOPCの影響。

【図4】POPC及び/又はDPPCを含有する脂質粒子におけるコレステロールのエステル化の初速度。

【図5】RXR-LXRアゴニストで刺激していない細胞における、THP-1に由来する泡沫細胞へのコレステロール排出。

【図6】RXR-LXRアゴニストを使用してABCA-I経路を活性化した後の、THP-1に由来する泡沫細胞へのコレステロール排出。

【図7】様々なアポリポタンパク質組成物の時間依存性血漿中濃度。

【図8】血漿における、コレステロール動員及びエステル化の時間及び濃度経過。

【図9】100mg/kgの単回i.v注射後の、マウスにおける本発明に係るアポリポタンパク質を含む様々な組成物による肝酵素放出の比較。

【図10】インビボにおけるウサギの研究 - 血漿における自発的溶血。

【図11】250mMのTris-HCl、140mMのNaCl、pH7.5を使用する脂質粒子の分析SEC。

【図12】pH7.5の50mMのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、250mMの塩酸アルギニン、7.5%のトレハロースを使用する脂質粒子の分析SEC。

【図13】POPC及びテトラネクチン - アポリポタンパク質A - I（モル比1：20～1：320）の脂質粒子のネイティブPAGE、（レーン1：ネイティブマーカー；レーン2：モル比1：320；レーン3：モル比1：160；レーン4：モル比1：80；レーン5：モル比1：80（f/t）；レーン6：モル比1：40；レーン7：モル比1：20；レーン8：アポリポタンパク質（六量体を形成））。

【図14】POPC及びテトラネクチン - アポリポタンパク質A - I（モル比1：20～1：160）の脂質粒子のSEC-MALLS分析。

【図15】POPC及びテトラネクチン - アポリポタンパク質A - Iの脂質粒子のSECクロマトグラム（UV280シグナル）の重ね合わせ。

【図16】モル比1：40で得られたPOPC及びテトラネクチン - アポリポタンパク質A - Iの脂質粒子のSEC-MALLS分析。

【図17】モル比1：20～1：100で得られたDPPC及びテトラネクチン - アポリポタンパク質A - Iの脂質粒子のネイティブPAGE（1：分子量マーカー；2：脂質を

10

20

30

40

50

含まないテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I ; 3 : 1 : 2 0 ; 4 : 1 : 4 0 ; 5 : 1 : 6 0 ; 6 : 1 : 8 0 ; 7 : 1 : 1 0 0 ) 。

【図 1 8】モル比 1 : 6 0 (一番上の曲線) ~ 1 : 1 0 0 (一番下の曲線) で得られた、P O P C : D P P C = 3 : 1 の混合物及びテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の脂質粒子の S E C - M A L L S 分析 ( U V 2 8 0 シグナル ) 。

【図 1 9】コール酸、Zwittergent 3-8、3-10及び3-12を使用したテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の脂質粒子のネイティブPAGE SDS。各ゲル上のレーン 1 : 純粋なアポリポタンパク質 ; 各ゲル上のレーン 2 : レファレンスとしての 0 . 1 × C M C コール酸脂質付加サンプル。

【図 2 0】3 × CMC Zwittergent 3-8及び P O P C (モル比 アポリポタンパク質 : リン脂質 = 1 : 6 0 ) を使用したテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の脂質粒子の S E C - M A L L S タンパクコンジュゲート分析。

10

【図 2 1】2 × CMC Zwittergent 3-10及び P O P C (モル比 アポリポタンパク質 : リン脂質 = 1 : 6 0 ) を使用したテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の脂質粒子の S E C - M A L L S タンパクコンジュゲート分析。

【図 2 2】P O P C を使用するテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の脂質粒子の S E C - M A L L S タンパクコンジュゲート分析。上 : ネイティブなテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I から形成された脂質粒子 ; 下 : 変性テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I から形成された脂質粒子。

【図 2 3 a】D M P C ( 1 : 1 0 0 ) (ジミリストイルホスファチジルコリン) で脂質付加されたテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I ( a ) 及び PBS 中で脂質付加されなかったテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I ( b ) を用いて実施した、ウサギのインビボにおける研究の結果。

20

【図 2 3 b】D M P C ( 1 : 1 0 0 ) (ジミリストイルホスファチジルコリン) で脂質付加されたテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I ( a ) 及び P B S 中で脂質付加されなかったテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I ( b ) を用いて実施した、ウサギのインビボにおける研究の結果。

【図 2 4 A】5 及び 4 0 で保存した、野生型のアポリポタンパク質 A - I ( A ) 及び本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I ( B ) を含有する脂質粒子の S E - H P L C クロマトグラム。

30

【図 2 4 B】5 及び 4 0 で保存した、野生型のアポリポタンパク質 A - I ( A ) 及び本明細書に報告されるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I ( B ) を含有する脂質粒子の S E - H P L C クロマトグラム。

#### 【 0 2 1 1 】

材料及び方法

サイズ排除 H P L C :

クロマトグラフィーは、ASI-100 HPLCシステム (Dionex, Idstein, Germany) において Tosoh Haas TSK 3000 SWXLカラムを用いて実施した。溶出ピークは、UVダイオードアレイ検出器 (Dionex) によって 2 8 0 nm でモニタした。濃縮サンプルを 1 mg/mL になるように溶解させた後、安定したベースラインが得られるまで、2 0 0 mM のリン酸二水素カリウム及び 2 5 0 mM の塩化カリウム、pH 7 . 0 からなるバッファでカラムを洗浄した。分析は、均一濃度条件下において 0 . 5 mL / 分の流速を使用して 3 0 分間室温にて実行した。クロマトグラムは、Chromleon (Dionex, Idstein, Germany) を用いて手動で積分した。凝集率 (%) は、高分子量形態の曲線下面積 (AUC) を単量体ピークの AUC と比較することにより求めた。

40

#### 【 0 2 1 2 】

動的光散乱 ( D L S ) :

D L S は、典型的にはサブミクロンサイズ範囲で粒径を測定するための非侵襲性技術である。本発明では、温度制御された石英キュベット ( 2 5 ) を備える Zetasizer Nano S 装置 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) を、1 nm ~ 6 μm の粒径範囲をモニタ

50

するために使用した。後方散乱レーザー光線の強度は、 $173^\circ$ の角度で検出した。強度は、粒子拡散速度に依存する割合で変動し、前記粒子拡散速度は、粒径によって調節される。したがって、粒径データは、散乱光強度の変動を分析することにより得られる (Dahnke, B.E. (ed.), Measurement of Suspended Particles by Quasielectric Light Scattering, Wiley Inc. (1983); Pecora, R., Dynamic Light Scattering: Application of Photon Correlation Spectroscopy, Plenum Press (1985))。強度による粒度分布は、DTSソフトウェア (Malvern) の複数ナローモードを使用して計算した。実験は、未希釈のサンプルを用いて行った。

#### 【0213】

##### SEC - MALLS :

SEC - MALLS は、以下の3つの検出器システムを用いるサイズ排除クロマトグラフィーの組合せである：i) UV検出、ii) 屈折率検出、及びiii) 光散乱検出。サイズによる分離については、GE Healthcare製のSuperose 6カラム10/300 GLカラムを使用する。方法は、 $0.4 \text{ mL/分}$ の流速を適用し、PBSバッファpH7.4を用いて均一濃度で実行する。3つの検出器システムは、直列に接続する。完全な脂質粒子 (タンパク質 - 脂質粒子) のシグナルは屈折率検出器によってモニタされ、一方、 $280 \text{ nm}$ で測定されるUV吸光度は、タンパク質部分によって誘導されるシグナルを測定する。脂質画分の比率は、完全なシグナルからタンパク質のUVシグナルを単に減じることによって得られる。光散乱の適用により、それぞれの種の分子量の検出し、ひいては脂質粒子を完全且つ詳細に説明することが可能になる。

#### 【0214】

##### 界面活性剤の測定：

残留界面活性剤の測定は、蒸発光散乱検出器に連結された逆相クロマトグラフィー (RP-ELSD) によって実施した。カラムとして、Phenomenex (Aschaffenburg, Germany) 製のLuna C18  $4.6 \times 150 \text{ mm}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 、 $100$  を使用した。 $10 \text{ kDa}$ の膜による遠心分離を行った後、 $90 \mu\text{L}$ のフロースルーをHPLC分離に使用した。溶出は、 $0.1 \%$  (v/v) のトリフルオロ酢酸を含有する $74 \%$  (v/v) のメタノール溶液を用いて均一濃度条件下で実施した。カラムの温度は、 $30$  に設定した。検出は、 $30$  の噴霧化温度、 $80$  の蒸発温度、及び $1.0 \text{ L/分}$ のガス流を適用して、蒸発光散乱検出器によって実施した。残留界面活性剤の定量は、 $0.22 \mu\text{g} \sim 7.5 \mu\text{g}$  コール酸の範囲のコール酸の場合、検量線の確立によって実施した。

#### 【0215】

##### タンパク質の定量：

タンパク質濃度は、アミノ酸配列に基づいて計算されたモル吸光係数を使用して、 $280 \text{ nm}$ における光学密度 (OD) を測定することにより測定した。

#### 【0216】

##### 組換えDNA技術：

Sambrook, J., et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載の通り、標準分析法を用いてDNAを操作した。分子生物学的試薬は、製造業者の指示書に従って使用した。

#### 【0217】

##### 実施例1

##### 大腸菌の発現プラスミドの作製及び説明

テトラネクチン - アポリポタンパク質A - I融合ポリペプチドを組換え型手段によって調製した。N末端からC末端方向における発現した融合ポリペプチドのアミノ酸配列は、以下の通りである：

- アミノ酸メチオニン (M)、
- CDLPQTHSL (配列番号55) のアミノ酸配列を有するインターフェロン配列の断片、
- GSリンカー、

10

20

30

40

50

- HHHHHH (配列番号 56) のアミノ酸配列を有するヘキサ - ヒスチジンタグ、
- GS リンカー、
- VVAPPAP (配列番号 60) のアミノ酸配列を有する IgA プロテアーゼ切断部位、及び
- 配列番号 02 のアミノ酸配列を有するテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I

## 【0218】

上記のようなテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 融合ポリペプチドは、前駆体ポリペプチドであり、IgA プロテアーゼを使用して酵素的に切断することにより、前記前駆体ポリペプチドからテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 融合ポリペプチドが放出された。

10

## 【0219】

前駆体ポリペプチドをコードする融合遺伝子は、適切な核酸セグメントを連結することによって、公知の組み換え法及び技術を用いて構築した。化学合成によって作製した核酸配列は、DNA シーケエンシングによって確認した。配列番号 31 の融合タンパク質をコードする配列番号 01 のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を生成するための発現プラスミドは、以下の通り調製した。

## 【0220】

大腸菌の発現プラスミドの作製

プラスミド 4980 (4980-pBRori-URA3-LACI-SAC) は、大腸菌においてコア - ストレプトアビジンを発現させるための発現プラスミドである。プラスミド 4980 は、プラスミド 1966 (1966-pBRori-URA3-LACI-T-反復; EP-B 1 422 237 に報告されている) に由来する 3142 bp 長の EcoRI/CeIII ベクター断片と、コア - ストレプトアビジンをコードする 435 bp 長の EcoRI/CeIII 断片とをライゲーションさせることにより作製した。

20

## 【0221】

コア - ストレプトアビジン大腸菌発現プラスミドは、以下のエレメントを含む：

- 大腸菌における複製用のベクター-pBR322由来の複製開始点 (Sutcliffe, G., et al., Quant. Biol. 43 (1979) 77-90 に係る 2517~3160bp の位置に対応する)、
- 大腸菌の pyrF 突然変異株 (ウラシル栄養要求性) の補完によりプラスミドを選択することができる、オロチジン - 5' - リン酸デカルボキシラーゼ (Rose, M. et al. Gene 29 (1984) 113-124) をコードする出芽酵母の URA3 遺伝子、
- 以下を含むコア - ストレプトアビジン発現カセット
  - Stueber, D. ら (上記を参照されたい) に係る合成リボソーム結合部位を含む T5 ハイブリッドプロモーター (Bujard, H., et al. Methods. Enzymol. 155 (1987) 416-433 及び Stueber, D., et al., Immunol. Methods IV (1990) 121-152 に係る T5-PN25/03/04 ハイブリッドプロモーター)、
  - コア - ストレプトアビジン遺伝子、
  - 2つのバクテリオファージに由来する転写ターミネーター： - T0ターミネーター (Schwarz, E., et al., Nature 272 (1978) 410-414) 及び fd - ターミネーター (Beck E. and Zink, B. Gene 1-3 (1981) 35-58)、
  - 大腸菌に由来する lacI 抑制因子遺伝子 (Farabaugh, P.J., Nature 274 (1978) 765-769)。

30

40

## 【0222】

単一の隣接する EcoRI 及び CeIII 制限酵素切断部位を用いてベクター 4980 からコア - ストレプトアビジン構造遺伝子を切り取り、そして、EcoRI/CeIII 制限部位に隣接している前記前駆体ポリペプチドをコードする核酸を、3142 bp 長の EcoRI/CeIII-4980 ベクター断片に挿入することにより、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 前駆体ポリペプチドを発現させるための最終的な発現プラスミドを調製した。

## 【0223】

実施例 2

50

## テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の調製

実施例 1 に記載した融合タンパク質を発現させるために、大腸菌の栄養要求性 (PyrF) の補完により抗生物質を用いずにプラスミドを選択することができる大腸菌ホスト/ベクター系を使用した (EP 0 972 838 及び US6,291,245)。

## 【0224】

発現プラスミド p (IFN - His6 - I g A - テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I) のエレクトロポレーションによって、大腸菌の K12 株 CSPZ-2 (leuB、proC、trpE、th-1、pyrF) を形質転換した。形質転換された大腸菌細胞を、まず、寒天平板上で 37 にて増殖させた。

## 【0225】

発酵プロトコール 1 :

予発酵については、約 1 g/L の L - ロイシン、約 1 g/L の L - プロリン及び約 1 mg/L のチアミン - HCl を添加した Sambrook et al (Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2nd edition (December 1989) に係る M9 培地を使用した。

## 【0226】

予発酵については、バッフルを備える 1000 mL のエルレンマイヤーフラスコ中の 300 mL の M9 培地に、初代種子バンクアンプルのうちの 2 mL を接種した。1 ~ 3 の光学密度 (578 nm) が得られるまで、37 で 13 時間回転振盪機において培養を実施した。

## 【0227】

発酵については、Riesenberg (Riesenberg, D., et al., J. Biotechnol. 20 (1991) 17-27) に係るバッチ培地を使用した: 27.6 g/L のグルコース \* H<sub>2</sub>O、13.3 g/L の K H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>、4.0 g/L の (N H<sub>4</sub>)<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub>、1.7 g/L のクエン酸塩、1.2 g/L の M g S O<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O、60 mg/L のクエン酸鉄 (III)、2.5 mg/L の C o C l<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O、15 mg/L の M n C l<sub>2</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O、1.5 mg/L の C u C l<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O、3 mg/L の H<sub>3</sub> B O<sub>3</sub>、2.5 mg/L の N a<sub>2</sub> M o O<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O、8 mg/L の Z n (C H<sub>3</sub> C O O)<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O、8.4 mg/L の Titriplex III、1.3 mL/L の Synperonic 10% 消泡剤。前記バッチ培地に、5.4 mg/L のチアミン - HCl、ならびにそれぞれ 1.2 g/L の L - ロイシン及び L - プロリンを添加した。フィード 1 溶液は、700 g/L のグルコースを含有しており、19.7 g/L の M g S O<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O が添加されていた。pH 調節用のアルカリ溶液は、それぞれ 50 g/L の L - ロイシン及び 50 g/L の L - プロリンを添加した 12.5% (w/v) の N H<sub>3</sub> 水溶液であった。構成要素は全て、脱イオン水に溶解させた。

## 【0228】

発酵は、10 L の Biostat C DCU3 発酵槽 (Sartorius, Melsungen, Germany) において実施した。予発酵から得られた 300 mL の接種材料を添加した 6.4 L の無菌発酵バッチ培地から始めて、37、pH 6.9 ± 0.2、500 mbar、及び通気速度 10 L/分 でバッチ発酵を実施した。最初に添加したグルコースが枯渇した後、温度を 28 に変化させ、そして、発酵は流加モードに入った。ここでは、一定に増加する攪拌機速度 (10 時間以内は 550 rpm ~ 1000 rpm、16 時間以内は 1000 rpm ~ 1400 rpm) 及び通気速度 (10 時間は 10 L/分 ~ 16 L/分、5 時間は 16 L/分 ~ 20 L/分) と組み合わせてフィード 1 を添加することにより、溶存酸素の相対値 (pO<sub>2</sub>) を 50% で維持した (DO-stat、例えば、Shay, L.K., et al., J. Indus. Microbiol. Biotechnol. 2 (1987) 79-85 を参照されたい)。約 8 時間培養した後 pH が調節下限 (6.70) に達したとき、アルカリ溶液を添加することにより更なるアミノ酸を供給した。光学密度 70 で 1 mM の IPTG を添加することによって、組換え型治療用タンパク質の発現を誘導した。

## 【0229】

発酵の最後に、細胞質で可溶性発現したテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を、不溶性タンパク質凝集体、いわゆる封入体に導入する。これは、収集前に 1 又は 2 時間、発酵槽中の全培養培地を 50 に加熱する加熱工程を用いて行う (例えば EP-B 1 486 571 を参照されたい)。その後、発酵槽の内容物を流水式の遠心分離機 (13,000 rpm

10

20

30

40

50



、13L/h)で遠心分離し、そして、更に処理するまで、収集したバイオマスを-20で保存した。合成したテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I前駆体タンパク質は、不溶性タンパク質凝集体、いわゆる封入体(IB)の形態で、不溶性の細胞残屑画分においてのみ見出された。

【0230】

合成した融合タンパク質は、不溶性タンパク質凝集体、いわゆる封入体(IB)の形態で、不溶性の細胞残屑画分においてのみ見出された。

【0231】

一方はタンパク質発現の誘導前、そして、他方は誘導後の所定の時点において発酵槽から取り出したサンプルを、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析する。全てのサンプルから、同量の細胞( $OD_{Target} = 5$ )を5mLのPBSバッファに再懸濁させ、そして、氷上で超音波処理を介して破壊した。次いで、各100 $\mu$ Lの懸濁液を遠心分離し(15,000rpm、5分間)、そして、各上清を回収し、別々のバイアルに移す。これは、可溶性の発現した標的タンパク質と不溶性の発現した標的タンパク質とを識別するためである。各上清(=可溶性)画分300 $\mu$ L、及び各ペレット(=不溶性)画分400 $\mu$ Lに、SDSサンプルバッファ(Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685)を添加する。サンプルを振盪下で95にて15分間加熱して、サンプル中のタンパク質を全て可溶化及び還元する。室温に冷却した後、各サンプル5 $\mu$ Lを4~20%のTGX Criterion Stain Freeポリアクリルアミドゲル(Bio-Rad)にロードする。更に、5 $\mu$ Lの分子量標準(Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad)及び公知の生成物タンパク質濃度(0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L)を有する3つの量(0.3 $\mu$ L、0.6 $\mu$ L及び0.9 $\mu$ L)の定量化標準をゲル上に配置する。

【0232】

200Vで60分間電気泳動し、その後、ゲルをGelDOC EZ Imager(Bio-Rad)に移し、そして、UV放射を用いて5分間処理した。Image Lab解析ソフトウェア(Bio-Rad)を使用してゲル画像を分析した。3つの標準を用いて、係数が $> 0.99$ である直線回帰曲線を計算し、オリジナルサンプル中の標的タンパク質の濃度を計算した。

【0233】

発酵プロトコール2:

予発酵については、約1g/LのL-ロイシン、約1g/LのL-プロリン及び約1mg/Lのチアミン-HClを添加したSambrook et al (Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2nd edition (December 1989))に係るM9培地を使用した。

【0234】

予発酵については、バッフルを備える1000mLのエrlenマイヤーフラスコ中の300mLの改変M9培地に、寒天板から、又は初代種子バンクサンプルのうちの1~2mLを接種した。1~3の光学密度(578nm)が得られるまで、37で13時間回転振盪機において培養を実施した。

【0235】

テトラネクチン-アポリポタンパク質A-Iの発酵及び高収率発現については、以下のバッチ培地及びフィードを使用した:

8.85g/Lのグルコース、63.5g/Lの酵母抽出物、2.2g/LのNH<sub>4</sub>Cl、1.94g/LのL-ロイシン、2.91g/LのL-プロリン、0.74g/LのL-メチオニン、17.3g/LのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O、2.02g/LのMgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O、25.8mg/Lのチアミン-HCl、1.0ml/LのSynperonic 10%消泡剤。フィード1溶液は、1.67g/LのL-メチオニンならびにそれぞれ5g/LのL-ロイシン及びL-プロリンを添加した333g/Lの酵母抽出物及び333g/Lの85%-グリセロールを含有していた。フィード2は600g/LのL-プロリンの溶液であった。pH調節用のアルカリ性溶液は、10%(w/v)のKOH溶液であり、そして、酸として75%グルコース溶液を使用した。構成要素は全て、脱イオン水に溶解させた。

10

20

30

40

50

## 【0236】

発酵は、10LのBiostat C DCU3発酵槽 (Sartorius, Melsungen, Germany) において実施した。予発酵から得られた300mLの接種材料を添加した5.15Lの無菌発酵バッチ培地から始めて、25℃、pH6.7±0.2、300mbar、及び通気速度10L/分で流加発酵を実施した。最初に添加したグルコースが枯渇する前に、培養物は、光学密度15 (578nm) に達し、そして、フィード1を70g/hで始めたとき、発酵は流加モードに入った。培養物中のグルコース濃度をモニタすることにより、グルコース蓄積を回避し、そして、6.9の調節上限付近にpHを維持しながら、フィード1を最高150g/hに増加させた。光学密度50 (578nm) において、10mL/hの一定の流加速度でフィード2を始めた。平行して攪拌機速度 (500rpm~1500rpm)、通気速度 (10L/分~20L/分) 及び圧力 (300mbar~500mbar) を増加させることにより、溶存酸素の相対値 (pO<sub>2</sub>) を50%超で維持した。光学密度90で1mMのIPTGを添加することによって、組換え型治療用タンパク質の発現を誘導した。

10

## 【0237】

一方はタンパク質発現の誘導前、そして、他方は誘導後の所定の時点において発酵槽から取り出した7つのサンプルを、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析する。全てのサンプルから、同量の細胞 (OD<sub>Target</sub> = 5) を5mLのPBSバッファに再懸濁させ、そして、氷上で超音波処理を介して破壊した。次いで、各100µLの懸濁液を遠心分離し (15,000rpm、5分間)、そして、各上清を回収し、別々のバイアルに移す。これは可溶性の発現した標的タンパク質と不溶性の発現した標的タンパク質とを識別するためである。各上清 (= 可溶性) 画分300µL、及び各ペレット (= 不溶性) 画分200µLに、SDSサンプルバッファ (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685) を添加する。サンプルを振盪下で95℃にて15分間加熱して、サンプル中のタンパク質を全て可溶化及び還元する。室温に冷却した後、各サンプル5µLを10%のBis-Trisポリアクリルアミドゲル (Novagen) にロードする。更に、5µLの分子量標準 (Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad) 及び公知の生成物タンパク質濃度 (0.1µg/µL) を有する3つの量 (0.3µL、0.6µL及び0.9µL) の定量化標準をゲル上に配置する。

20

## 【0238】

200Vで35分間電気泳動を実施し、次いで、ゲルをクーマシーブリリアントブルー (登録商標) 染料で染色し、熱水で脱色し、そして、デジタル化のために光学式濃度計に移した (GS710、Bio-Rad)。Quantity One 1-D解析ソフトウェア (Bio-Rad) を使用してゲル画像を分析した。3つの標準を用いて、係数が>0.98である直線回帰曲線を計算し、オリジナルサンプル中の標的タンパク質の濃度を計算した。

30

## 【0239】

発酵の最後に、細胞質で可溶性発現したテトラネクチン - アポリポタンパク質A - Iを、不溶性タンパク質凝集体、いわゆる封入体 (IB) に導入する。これは、収集前に1又は2時間、発酵槽中の全培養培地を50℃に加熱する加熱工程を用いて行う (例えばEP-B 1486571を参照されたい)。加熱工程の後、合成したテトラネクチン - アポリポタンパク質A - I前駆体タンパク質は、IBの形態で、不溶性の細胞残屑画分においてのみ見出された。

40

## 【0240】

発酵槽の内容物を4~8℃に冷却し、フロースルー遠心分離機 (13,000rpm、13L/h) で遠心分離し、そして、更に処理するまで、収集したバイオマスを-20℃で保存した。収集したバイオマス収量の合計は、発現したコンストラクトに依存して39g/L~90g/L乾物であった。

## 【0241】

実施例3

テトラネクチン - アポリポタンパク質A - Iの調製

実施例2の収集した細菌細胞を、リン酸カリウム緩衝液又はTris緩衝液 (0.1M、1

50

mMのMgSO<sub>4</sub>を添加、pH6.5)に再懸濁させることによって封入体の調製を実施した。DNaseを添加した後、900barの圧力でホモジナイズすることによって細胞を破壊した。1.5MのNaCl及び60mMのEDTAを含む緩衝液を、ホモジナイズされた細胞懸濁液に添加した。25%(w/v)のHClを用いてpH値を5.0に調整した後、更なる遠心分離工程の後に最終的な封入体スラリーが得られた。スラリーは、更に処理するまで、使い捨て滅菌プラスチック袋中で-20にて保存した。

#### 【0242】

封入体スラリー(約15kg)を、グアニジン塩酸塩溶液(150L、6.7M)で可溶化した。深層濾過により可溶化物の清澄化した後、溶液をZn-キレートアフィニティークロマトグラフィー材に適用した。融合ポリペプチドをZn-キレートのクロマトグラフィー材によって精製し、そして、IgAプロテアーゼによって切断した。その後、陰イオン交換クロマトグラフィー工程及び陽イオン交換クロマトグラフィー工程によってポリペプチドを更に精製した。これら工程は、尿素含有溶液(7M)中で、すなわち、変性条件下で実施した。これら工程は、ポリペプチド断片、内毒素及び更なる不純物の除去のために使用した。6.7Mのグアニジン塩酸塩含有溶液に対するダイアフィルトレーションを実施した。得られた最終溶液は、変性テトラネクチン-アポリポタンパク質A-Iを含有する。

10

#### 【0243】

##### 実施例4

テトラネクチン-アポリポタンパク質A-Iのリフォールディング及び脂質付加

20

以下、前述の実施例1~3において生成された配列番号01のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-Iを使用した。

#### 【0244】

##### a) 一般法

純粋な結晶質のPOPC又はDPPC(Lipoid, Switzerland)を、リン脂質:コール酸のモル比が1:1.35になるように、コール酸を含有する水性緩衝液(脂質付加バッファ)に溶解させた。混合物を窒素雰囲気下でインキュベートし、透明な溶液が得られるまで、室温(POPC)又は55(DPPC)で光から保護した。透明な脂質-コール酸溶液を4に冷却するか(POPC)、又は41で保存する(DPPC)。精製されたテトラネクチン-アポリポタンパク質A-Iを、規定のアポリポタンパク質:リン脂質比で4(POPC)又は41(DPPC)にて添加した。脂質粒子を形成するために、反応混合物を窒素雰囲気下で4(POPC)又は41(DPPC)にて一晚インキュベートし、そして、光から保護した。最後に、脂質付加バッファに対する大規模な透析(4/41)によりコール酸を除去した。最後に、サンプルを遠心分離して、沈殿した物質を除去した。

30

#### 【0245】

純粋なPOPC又は純粋なDPPCを含有するコール酸可溶化脂質溶液を、上記の通り調製した。望ましい比率で脂質溶液を合わせ、次いで、それぞれのT<sub>m</sub>(T<sub>m</sub>=相転移温度)で保存することにより、脂質混合物を調製した。テトラネクチン-アポリポタンパク質A-Iの脂質粒子形成は、選択された脂質混合物のそれぞれのT<sub>m</sub>を除いて、純粋な脂質溶液について記載した通り実施した。

40

#### 【0246】

以下の脂質付加バッファについて試験した:

1. pH7.5の250mMの塩酸アルギニン、7.5%のスクロースを添加した50mMのリン酸カリウムバッファ、

2. pH7.5の250mMの塩酸アルギニン、7.5%のスクロース、10mMのメチオニンを添加した50mMのリン酸水素二カリウムバッファ、

3. pH7.5の140mMのNaCl、10mMのメチオニンを添加した、250mMのトリス-ヒドロキシルアミノメタン(TRIS)

4. pH7.5の250mMの塩酸アルギニン、7%のトレハロース、10mMのメチオニ

50

ンを添加した 50 mM のリン酸水素二カリウムバッファ。

【0247】

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I サンプルから形成された脂質粒子の均質性を、分析 SEC によって評価した (図 11 及び 12)。全体として、脂質付加バッファの選択は、リン脂質の選択と比べてわずかな効果しか有しない。DPPC - 脂質粒子は、1 つのメインピークとして溶出し、一方、POPC - 脂質粒子は、2 つのピークパターンを示す。脂質付加バッファの選択は、アポリポタンパク質の精製工程及び安定化した脂質を含まないアポリポタンパク質の供給によって影響を受けた。脂質粒子形成は、脂質付加バッファに関係なく実現可能であることが示された。試験した様々なバッファの中でも、最も適切な脂質付加バッファは、250 mM の Tris、140 mM の NaCl、10 mM のメチオニン、pH 7.5 であると同定された。

10

【0248】

脂質付加混合物は、それぞれ規定の量のアポリポタンパク質を含有しており、そして、リン脂質、例えば POPC の量は、それに応じて計算された。脂質のモル量の計算は全て、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 単量体に基いて行った。

【0249】

b) POPC 及びコール酸

【0250】

【表 9】

表 5: 例として純粋な POPC を使用するテトラネクチン - アポリポタンパク質 A-I を含む脂質粒子の形成。アポリポタンパク質 : リン脂質のモル比は、タンパク質単量体について計算する。対照 : 脂質を付加することなくインキュベートされたアポリポタンパク質 (純粋な Apo) 及びアポリポタンパク質を含まない脂質 (Apo 無し)

20

| アポリポタンパク質 : リン脂質のモル比 | 一晚インキュベートした後の観察結果 | 透析前のタンパク質濃度 [mg/ml] | 透析後のタンパク質濃度 [mg/ml] | 透析後の観察結果 |
|----------------------|-------------------|---------------------|---------------------|----------|
| 1:320                | 透明                | 0.67                | n.d.                | 混濁       |
| 1:160                | 透明                | 1.34                | 1.47                | 透明       |
| 1:80                 | 透明                | 2.68                | 2.6                 | 透明       |
| 1:40                 | 透明                | 5.36                | 4.87                | 透明       |
| 1:20                 | 混濁                | 10.73               | 5.02                | 混濁*      |
| Apo のみ               | 混濁                | 2.68                | 0.51                | 混濁*      |
| Apo 無し               | 透明                | -                   | -                   | 透明       |

30

\*遠心分離後、透明

【0251】

モル比 1 : 40 ~ 1 : 160 では、全工程にわたって透明なままである。過剰なリン脂質による混濁もタンパク質の沈殿による混濁も観察されなかった。

【0252】

脂質粒子のサンプルをネイティブ PAGE によって分析した (図 13 を参照されたい)。最も均質なバンドパターンは、サンプル 1 : 80 (レーン 4) でみられた。更に、1 x 凍結融解 (-80) によってサンプルの外観は変化しなかった (レーン 5)。サンプル 1 : 320 及び 1 : 160 のバンドパターンは、不均質な生成物を示し、複数のバンドが

40

50

生じた（レーン 2 及び 3）。サンプル 1 : 40 及び 1 : 20 は、主生成物のバンドの下に更なるバンドを有する（レーン 6 及び 7）。純粋なテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の移動パターンを、図 13 のレーン 8 に示す。

【 0 2 5 3 】

SEC - MALLS 分析を用いて、脂質粒子の均質性及びそのアポリポタンパク質 - リン脂質組成に関するより詳細な情報が得られた（タンパクコンジュゲート分析）。図 14 は、SEC で分割されたサンプルのクロマトグラム（UV280 検出）を示す。ここで、1 : 160 サンプルは、3 つの分離ピークに分割される。1 : 80 サンプルは、2 つのピークとして示される通り、異なるサイズの少なくとも 2 つの種を含有すると思われる。サンプル 1 : 20 から得られるピークは、最も均質な生産物を示す。

10

【 0 2 5 4 】

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I（3.84 mg/mL；サンプル 1 個当たり 10 mg）を用いて実験を行い、そして、アポリポタンパク質：リン脂質のモル比を 5 ずつ 1 : 40 から 1 : 80 に上昇させた。1 : 40 未満のモル比では、脂質粒子形成は不完全である。1 : 80 を超えるモル比は実験的に除外される：透析によりコール酸を除去した後、サンプルが混濁した。更に、脂質粒子は、より高い脂質比率においてより不均質になった。

【 0 2 5 5 】

【表 10】

表 6: 純粋な POPC を使用するテトラネクチン - アポリポタンパク質 A-I の脂質粒子形成。アポリポタンパク質：リン脂質のモル比は、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A-I 単量体に基いて計算した

20

| アポリポタンパク質：リン脂質のモル比 | 透析前のタンパク質濃度 [mg/ml]* | 透析後のタンパク質濃度 [mg/ml]* | 収率 [%] | 透析後の観察結果 |
|--------------------|----------------------|----------------------|--------|----------|
| 1:40               | 3.5                  | 2.67                 | 76     | 沈殿       |
| 1:45               | 3.5                  | 2.74                 | 78     | 沈殿       |
| 1:50               | 3.5                  | 2.94                 | 84     | 沈殿       |
| 1:55               | 3.5                  | 3.05                 | 87     | 沈殿       |
| 1:60               | 3.5                  | 3.19                 | 91     | 沈殿       |
| 1:65               | 3.5                  | 3.34                 | 95     | 沈殿       |
| 1:70               | 3.5                  | 3.52                 | 100**  |          |
| 1:75               | 3.5                  | 3.56                 | 100**  |          |
| 1:80               | 3.5                  | 3.57                 | 100**  |          |

30

\* 透析前後の体積 2.6 ml

\*\*方法の SD 内

40

【 0 2 5 6 】

- 3 の転移温度でインキュベートしている間、サンプルは全て光学的に透明なままであった。透析によりコール酸を除去した後、サンプル 1 : 40 ~ 1 : 65 で濁度上昇が観察された。遠心分離によって沈殿物を除去することができ、そして、その後サンプルは透明なままであった。

【 0 2 5 7 】

SEC - MALLS 分析を用いて、形成される脂質粒子の均質性及びそのアポリポタンパク質 - リン脂質組成に関するより詳細な情報が得られた（タンパクコンジュゲート分析）。脂質粒子は全て、分析サイズ排除クロマトグラフィー（SEC；図 15）において同等に均質であり、低モル比でより明白な小さなポストピークを示した。更に、より高いモ

50

ル比では、より高い分子量にピークパターンが顕著にシフトする。それぞれの保持時間を表 7 に記載する。

【 0 2 5 8 】

【表 1 1】

表 7: サイズ排除クロマトグラフィー結果の概要；割合は、曲線下面積 (AUC) の積分によって計算した

| UV280     | メインピークの<br>保持時間<br>[分] | メイン<br>ピーク<br>[%] | ポスト<br>ピーク<br>[%] | 総面積<br>[mAU*分] |
|-----------|------------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| POPC 1:40 | 56.2                   | 89.3              | 10.7              | 322.3          |
| POPC 1:45 | 55.9                   | 89.7              | 10.4              | 331.3          |
| POPC 1:50 | 55.8                   | 90.0              | 10.0              | 333.2          |
| POPC 1:55 | 55.7                   | 91.0              | 9.1               | 342.5          |
| POPC 1:60 | 55.6                   | 90.8              | 9.2               | 331.7          |
| POPC 1:65 | 55.3                   | 90.9              | 9.2               | 337.2          |
| POPC 1:70 | 55.2                   | 91.1              | 8.9               | 326.5          |
| POPC 1:75 | 55.1                   | 91.3              | 8.7               | 347.1          |
| POPC 1:80 | 54.8                   | 92.0              | 8.0               | 347.8          |

10

20

【 0 2 5 9 】

タンパク質コンジュゲート分析 (表 8 に要約) により、SEC カラムから溶出した各脂質粒子について、タンパク質の合計分子量 (MW タンパク質) 及び脂質成分の合計分子量 (MW 脂質) を計算することができる。テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 単量体 (32.7 kDa) 及び POPC (760 Da) の分子量に基づいて、脂質粒子の組成を計算することができる ( $n$  タンパク質及び  $n$  POPC)。全てのモル比において脂質粒子メインピークで見られるアポリポタンパク質構成要素の分子量は約 100 kDa であり、これは、脂質粒子 1 個当たりテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 三量体に相当する。比率  $n(\text{POPC})/n(\text{タンパク質単量体})$  から、脂質粒子におけるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 単量体 1 個当たりの POPC 分子の数が得られる。テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 単量体 1 個当たりの POPC 分子の数は、1:40 ~ 1:80 までのモル比が適用されにもかかわらず、54 ~ 75 で変動する。タンパク質 (%) の値は、脂質付加の程度のパラメータである。脂質粒子中のタンパク質の割合が低いほど、脂質付加の程度が高い。

30

【 0 2 6 0 】

## 【表 1 2】

表 8: 図 16 に示す通り、POPC 及びテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I の脂質粒子のタンパク質コンジュゲート分析の概要

|      |        | MW 合計<br>[kDa] | MW タンパク質<br>[kDa] | n (単量体) | MW 脂質<br>[kDa] | n<br>(POPC) | n(POPC)/<br>n(単量体) | %タンパク質 |
|------|--------|----------------|-------------------|---------|----------------|-------------|--------------------|--------|
| 1:40 | メインピーク | 238            | 104               | 3.3     | 135            | 178         | 54                 | 44     |
|      | ポストピーク | 230            | 148               | 4.6     | 81             | 107         | 23                 | 65     |
| 1:45 | メインピーク | 238            | 101               | 3.2     | 138            | 182         | 57                 | 42     |
|      | ポストピーク | 184            | 118               | 3.7     | 66             | 87          | 24                 | 64     |
| 1:50 | メインピーク | 244            | 100               | 3.1     | 143            | 188         | 61                 | 41     |
|      | ポストピーク | 187            | 118               | 3.7     | 70             | 92          | 25                 | 63     |
| 1:55 | メインピーク | 247            | 99                | 3.1     | 148            | 195         | 63                 | 40     |
|      | ポストピーク | 182            | 107               | 3.3     | 75             | 99          | 30                 | 59     |
| 1:60 | メインピーク | 248            | 98                | 3.1     | 150            | 197         | 64                 | 40     |
|      | ポストピーク | 183            | 106               | 3.3     | 76             | 100         | 30                 | 58     |
| 1:65 | メインピーク | 255            | 97                | 3.0     | 158            | 208         | 69                 | 38     |
|      | ポストピーク | 191            | 103               | 3.2     | 88             | 116         | 36                 | 54     |
| 1:70 | メインピーク | 260            | 97                | 3.0     | 163            | 214         | 71                 | 37     |
|      | ポストピーク | 196            | 100               | 3.1     | 95             | 125         | 40                 | 51     |
| 1:75 | メインピーク | 266            | 99                | 3.1     | 168            | 221         | 71                 | 37     |
|      | ポストピーク | 208            | 118               | 3.7     | 91             | 120         | 32                 | 56     |
| 1:80 | メインピーク | 275            | 99                | 3.1     | 176            | 232         | 75                 | 36     |
|      | ポストピーク | 215            | 112               | 3.5     | 103            | 136         | 39                 | 52     |

## 【 0 2 6 1】

## c) DPPC 及びコール酸

脂質付加の前に、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を、pH 7.5 の 50 mM の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、250 mM の塩酸アルギニン、7% のトレハロース、10 mM のメチオニンに対して透析した。5 ずつ脂質濃度を上昇させた 1:60 ~ 1:100 のモル比を用いて、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I (3.84 mg/mL、1 サンプル当たり 3 mg) に脂質付加した。脂質付加バッファは、250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、10 mM のメチオニン、pH 7.5 であった。

## 【 0 2 6 2】

10

20

30

40

## 【表 13】

表 9: DPPC とアポリポタンパク質との脂質粒子のサンプルの概要

| アポリポタンパク質：リン脂質のモル比* | 一晚インキュベートした後の観察結果 | タンパク質に基づく収率 [%] |
|---------------------|-------------------|-----------------|
| 1:20                | 透明                | 85              |
| 1:40                | 透明                | 88              |
| 1:60                | 透明                | 89              |
| 1:80                | 透明                | 91              |
| 1:100               | 透明                | 94              |
| Apoのみ               | 透明                | 86              |
| Apo無し               | 透明                | DPPC 沈殿         |

\* タンパク質単量体について計算

## 【0263】

脂質粒子形成中に、タンパク質の沈澱も過剰の脂質による混濁も観察されなかった。最終生産物におけるテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の収率が高いほど、より多くの DPPC が脂質付加に使用された。

## 【0264】

残留脂質を含まないアポリポタンパク質は、ネイティブ PAGE における 1 : 20 サンプル (レーン 3、図 17) でみられた。1 : 40 及び 1 : 60 のサンプルが、ネイティブ PAGE において最も均質に見えるが (レーン 4 及び 5)、一方、1 : 80 及び 1 : 100 のサンプルは、主要な脂質粒子バンドの上方に更なるより高分子のバンドを含有する (レーン 6 及び 7)。

## 【0265】

SEC - SMALLS タンパクコンジュゲート分析を用いて、DPPC 脂質粒子形成後に得られた脂質粒子の組成の特性評価を行った (MW DPPC : 734 Da)。均質な SEC のピークは、1 : 80 以下のモル比で得られた。より高い脂質比率では、プレピークが出現した (例えば、表 10 における 1 : 90 サンプルを参照されたい)。

## 【0266】

10

20

30



## 【表 1 4】

表 10: DPPC 及びテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I の脂質粒子の SEC-MALLS タンパクコンジュゲート分析の概要

| アポリポタンパク質：リン脂質のモル比 | ピーク | MW 合計 [kDa] | MW タンパク質 [kDa] | n (タンパク質) | MW 脂質 [kDa] | n (DPPC)/n (タンパク質) | %タンパク質 |
|--------------------|-----|-------------|----------------|-----------|-------------|--------------------|--------|
| 1:60               | 1   | 724         | 298            | 9.0       | 425         | 193                | 41.2   |
| 1:65               | 1   | 281         | 109            | 3.3       | 171         | 77                 | 38.9   |
| 1:70               | 1   | 273         | 103            | 3.1       | 169         | 76                 | 37.9   |
| 1:75               | 1   | 286         | 103            | 3.1       | 183         | 83                 | 36.0   |
| 1:80               | 1   | 295         | 100            | 3.0       | 194         | 88                 | 34.1   |
| 1:85               | 1   | 307         | 99             | 3.0       | 207         | 94                 | 32.6   |
| 1:90               | 1   | 361         | 117            | 3.5       | 244         | 110                | 32.6   |
|                    | 2   | 319         | 101            | 3.0       | 217         | 98                 | 31.8   |
| 1:95               | 1   | 397         | 134            | 4.0       | 262         | 118                | 33.8   |
|                    | 2   | 327         | 100            | 3.0       | 226         | 102                | 30.8   |
| 1:100              | 1   | 405         | 132            | 4.0       | 273         | 123                | 32.6   |
|                    | 2   | 344         | 101            | 3.0       | 243         | 110                | 29.3   |

10

20

## 【0 2 6 7】

最も高程度の脂質付加（タンパク質の割合が最低）は、モル比 1 : 80 ~ 1 : 90 でみられる。更に、DLS により、粒径 14 ~ 17 nm にて比率 1 : 80 ~ 1 : 90 (> 98%) で最も均質な粒子が形成されることが明らかになった。

## 【0 2 6 8】

d) 75% DPPC / 25% POPC

以下のパラメータを用いて、この実施例の項目 a) ~ c) において報告した通り、脂質粒子の形成を実施した：

タンパク質：3.84 mg/mL のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I、1 サンプル当たり 3 mg

脂質付加バッファ：250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、10 mM のメチオニン、pH 7.5

脂質付加：34

透析：4

試験したモル比：1 : 60 ~ 1 : 100 (5 ずつ脂質を増加させる)

30

40

## 【0 2 6 9】

脂質粒子形成は、直接的であり、そして、純粋な脂質を使用するプロセスと同程度であった。サンプルは全て、工程及び透析の間、透明なままであった。脂質粒子の収率は、試験した全ての比率について類似していた（約 85%）。SEC-MALLS 分析により、モル比 1 : 80 から最も均質な脂質粒子（90.9% メインピーク、プレピークなし、及び 9.1% ポストピーク）が生じたことが示された。タンパクコンジュゲート分析により、全てのサンプルの主な種において、脂質粒子 1 個当たり 1 個のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 三量体が存在することが明らかになった（図 18、ならびに表 11 及び 12 を参照されたい）。

## 【0 2 7 0】

50

## 【表 15】

表 11: SEC 結果の概要 ; 割合は、AUC の積分によって計算した

| UV280                 | メインピーク<br>の保持時間 | プレ<br>ピーク<br>[%] | メイン<br>ピーク<br>[%] | ポスト<br>ピーク<br>[%] | 合計<br>[mAU*<br>分] |
|-----------------------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 75/25 DPPC/POPC 1:60  | 58.3            | -                | 89.7              | 10.3              | 360.5             |
| 75/25 DPPC/POPC 1:65  | 58.3            | -                | 89.2              | 10.8              | 383.7             |
| 75/25 DPPC/POPC 1:70  | 58.3            | -                | 89.5              | 10.5              | 376.8             |
| 75/25 DPPC/POPC 1:75  | 58.4            | -                | 90.3              | 9.7               | 367.0             |
| 75/25 DPPC/POPC 1:80  | 58.3            | -                | 90.9              | 9.1               | 383.5             |
| 75/25 DPPC/POPC 1:85  | 58.2            | 10.4             | 79.5              | 10.1              | 356.4             |
| 75/25 DPPC/POPC 1:90  | 58.3            | 10.2             | 81.5              | 8.3               | 344.6             |
| 75/25 DPPC/POPC 1:95  | 58.0            | 16.9             | 74.9              | 8.2               | 377.4             |
| 75/25 DPPC/POPC 1:100 | 58.0            | 21.0             | 70.4              | 7.7               | 365.0             |

## 【 0 2 7 1 】

## 【表 16】

表 12: 75 % DPPC/25 % POPC 及びテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I  
脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析の概要

|       |        | MW 合計 | MW タンパク質<br>[kDa] | n (タンパク質単量体) | MW 脂質<br>[kDa] | n (脂質) | n(脂質)/<br>n(単量体) | %タンパク質 |
|-------|--------|-------|-------------------|--------------|----------------|--------|------------------|--------|
| 1:60  | メインピーク | 257   | 96                | 3.0          | 161            | 217    | 72               | 37     |
|       | ポストピーク | 92    | 75                | 2.3          | 17             | 23     | 10               | 82     |
| 1:65  | メインピーク | 263   | 95                | 3.0          | 167            | 226    | 76               | 36     |
|       | ポストピーク | 116   | 102               | 3.2          | 14             | 19     | 6                | 88     |
| 1:70  | メインピーク | 268   | 95                | 3.0          | 173            | 234    | 79               | 35     |
|       | ポストピーク | 93    | 83                | 2.6          | 10             | 14     | 5                | 89     |
| 1:75  | メインピーク | 275   | 95                | 3.0          | 180            | 243    | 82               | 34     |
|       | ポストピーク | 98    | 82                | 2.6          | 16             | 22     | 8                | 84     |
| 1:80  | メインピーク | 279   | 95                | 3.0          | 184            | 248    | 84               | 34     |
|       | ポストピーク | 97    | 86                | 2.7          | 11             | 15     | 6                | 89     |
| 1:85  | プレピーク  | 329   | 104               | 3.3          | 224            | 302    | 93               | 32     |
|       | メインピーク | 291   | 96                | 3.0          | 195            | 263    | 88               | 33     |
|       | ポストピーク | 129   | 107               | 3.3          | 22             | 30     | 9                | 83     |
| 1:90  | プレピーク  | 443   | 107               | 3.3          | 237            | 320    | 96               | 31     |
|       | メインピーク | 293   | 95                | 3.0          | 197            | 266    | 90               | 33     |
|       | ポストピーク | 126   | 102               | 3.2          | 25             | 34     | 11               | 81     |
| 1:95  | プレピーク  | 384   | 110               | 3.4          | 274            | 370    | 108              | 29     |
|       | メインピーク | 303   | 96                | 3.0          | 207            | 280    | 93               | 32     |
|       | ポストピーク | 130   | 103               | 3.2          | 27             | 36     | 11               | 79     |
| 1:100 | プレピーク  | 398   | 111               | 3.5          | 287            | 388    | 112              | 28     |
|       | メインピーク | 310   | 96                | 3.0          | 213            | 288    | 96               | 31     |
|       | ポストピーク | 122   | 86                | 2.7          | 36             | 49     | 18               | 71     |

## 【 0 2 7 2 】

e) 50 % DPPC / 50 % POPC

以下のパラメータを用いて、この実施例の項目 a) ~ c) において報告した通り、脂質粒子の形成を実施した：

タンパク質：3.84 mg/mL のテトラネクチン - リポタンパク質 A - I、1 サンプル当たり 3 mg

脂質付加バッファ：250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、10 mM のメチオニン、pH 7.5

脂質付加：2.7

透析：室温

試験したモル比：1:60 ~ 1:100 (5 ずつで脂質を増加させる)

## 【 0 2 7 3 】

サンプルは全て、工程及び透析の間、透明なままであった。脂質粒子の収率は、試験した全ての比率について類似していた。

【 0 2 7 4 】

【 表 1 7 】

表 13: SEC 結果の概要；割合は、AUC の積分によって計算した

| UV280                 | メインピークの<br>保持時間 [分] | プレピーク<br>[%] | メインピーク<br>[%] | ポストピーク<br>[%] | 合計<br>[mAU*分] |
|-----------------------|---------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| 50/50 DPPC/POPC 1:60  | 58.2                | -            | 88.9          | 11.1          | 341.3         |
| 50/50 DPPC/POPC 1:65  | 58.3                | -            | 89.3          | 10.7          | 349.6         |
| 50/50 DPPC/POPC 1:70  | 58.3                | -            | 89.9          | 10.1          | 336.9         |
| 50/50 DPPC/POPC 1:75  | 58.2                | 6.1          | 84.3          | 9.6           | 347.4         |
| 50/50 DPPC/POPC 1:80  | 58.1                | 8.5          | 82.2          | 9.3           | 356.9         |
| 50/50 DPPC/POPC 1:85  | 58.0                | 11.3         | 79.8          | 8.9           | 352.7         |
| 50/50 DPPC/POPC 1:90  | 58.0                | 14.4         | 77.1          | 8.5           | 356.5         |
| 50/50 DPPC/POPC 1:95  | 58.0                | 19.3         | 72.6          | 8.1           | 367.0         |
| 50/50 DPPC/POPC 1:100 | 57.9                | 36.6         | 65.8          | 7.6           | 365.3         |

10

20

【 0 2 7 5 】

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の脂質粒子を形成するために 50% DPPC 及び 50% POPC の脂質混合物を使用した場合、最も均質な生成物は、モル比 1 : 70 で得られた (表 14 を参照されたい)。生成物は、メインピークに関して 89.9% 純粋であり、そして、1つの単一テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 三量体を含有していた (表 14 を参照されたい)。

【 0 2 7 6 】

## 【表 18】

表 14: 50 % DPPC/50 % POPC 及びテトラネクチン-アポリボタンパク質 A-I を含む脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析

|       |        | MW 合計 | MW タンパク質 | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 | n(脂質) | n(脂質)/<br>n(単量体) | %タンパク質 |
|-------|--------|-------|----------|--------------|-------|-------|------------------|--------|
| 1:60  | メインピーク | 331   | 124      | 3.9          | 207   | 277   | 71               | 38     |
|       | ポストピーク | 131   | 106      | 3.3          | 24    | 32    | 10               | 81     |
| 1:65  | メインピーク | 264   | 95       | 2.9          | 169   | 226   | 78               | 36     |
|       | ポストピーク | 127   | 112      | 3.5          | 16    | 21    | 6                | 88     |
| 1:70  | メインピーク | 273   | 96       | 3.0          | 178   | 238   | 79               | 35     |
|       | ポストピーク | 258   | 213      | 6.7          | 45    | 60    | 9                | 82     |
| 1:75  | プレピーク  | 319   | 108      | 3.4          | 211   | 282   | 83               | 34     |
|       | メインピーク | 271   | 93       | 2.9          | 178   | 238   | 82               | 34     |
|       | ポストピーク | 126   | 106      | 3.3          | 20    | 27    | 8                | 84     |
| 1:80  | プレピーク  | 333   | 108      | 3.4          | 225   | 301   | 89               | 32     |
|       | メインピーク | 278   | 95       | 2.9          | 184   | 246   | 85               | 34     |
|       | ポストピーク | 122   | 100      | 3.1          | 21    | 28    | 9                | 83     |
| 1:85  | プレピーク  | 359   | 109      | 3.4          | 250   | 335   | 98               | 30     |
|       | メインピーク | 284   | 94       | 2.9          | 189   | 253   | 87               | 33     |
|       | ポストピーク | 132   | 118      | 3.7          | 14    | 19    | 5                | 89     |
| 1:90  | プレピーク  | 373   | 109      | 3.4          | 264   | 353   | 104              | 29     |
|       | メインピーク | 286   | 94       | 2.9          | 192   | 257   | 89               | 33     |
|       | ポストピーク | 133   | 110      | 3.4          | 23    | 31    | 9                | 83     |
| 1:95  | プレピーク  | 390   | 111      | 3.5          | 278   | 372   | 106              | 29     |
|       | メインピーク | 290   | 94       | 2.9          | 195   | 261   | 90               | 33     |
|       | ポストピーク | 162   | 136      | 4.3          | 26    | 35    | 8                | 84     |
| 1:100 | プレピーク  | 404   | 113      | 3.5          | 291   | 390   | 111              | 28     |
|       | メインピーク | 293   | 94       | 2.9          | 199   | 266   | 92               | 32     |
|       | ポストピーク | 142   | 107      | 3.3          | 35    | 47    | 14               | 75     |

10

20

30

## 【0277】

f) 25% DPPC / 75% POPC

40

以下のパラメータを用いて、この実施例の項目 a) ~ c) において報告した通り、脂質粒子の形成を実施した：

タンパク質：3.84 mg/mL のテトラネクチン - アポリボタンパク質 A - I、1 サンプル当たり 3 mg

脂質付加バッファ：250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、10 mM のメチオニン、pH 7.5

脂質付加：18

透析：室温

試験したモル比：1:60 ~ 1:100 (5 ずつで脂質を増加させる)

## 【0278】

50

脂質粒子形成は、直接的であり、純粋な脂質を使用するプロセスと同程度であった。サンプルは全て、工程及び透析の間、透明なままであった。

【表 19】

表 15: SEC 結果の概要；割合は AUC の積分によって計算した

| UV280                 | メインピークの<br>保持時間 [分] | プレピーク<br>% | メインピーク<br>% | ポストピーク<br>% | 合計<br>[mAU*分] |
|-----------------------|---------------------|------------|-------------|-------------|---------------|
| 25/75 DPPC/POPC 1:60  | 58.2                | -          | 90.2        | 9.8         | 342.6         |
| 25/75 DPPC/POPC 1:65  | 58.2                | 4.6        | 85.9        | 9.4         | 345.6         |
| 25/75 DPPC/POPC 1:70  | 58.1                | 8.8        | 82.3        | 8.9         | 353.2         |
| 25/75 DPPC/POPC 1:75  | 58.0                | 9.0        | 82.4        | 8.6         | 357.5         |
| 25/75 DPPC/POPC 1:80  | 57.9                | 10.8       | 81.2        | 8.0         | 356.7         |
| 25/75 DPPC/POPC 1:85  | 57.9                | 21.2       | 71.0        | 7.8         | 366.3         |
| 25/75 DPPC/POPC 1:90  | 57.8                | 26.1       | 66.4        | 7.5         | 357.8         |
| 25/75 DPPC/POPC 1:95  | 57.7                | 32.7       | 60.5        | 6.8         | 365.9         |
| 25/75 DPPC/POPC 1:100 | 57.6                | 36.1       | 57.5        | 6.4         | 373.4         |

10

20

【0279】

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I の脂質粒子を形成するために 25% DPPC 及び 75% POPC の脂質混合物を使用した場合、最も均質な生成物は、モル比 1 : 60 で得られた (表 16 を参照されたい)。生成物は、メインピークに関して 90.2% 純粋であり、そして、1 つの単一テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 三量体を含有していた (表 15 を参照されたい)。

【0280】

## 【表 20】

表 16: 25 % DPPC/75 % POPC 及びテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I の脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析の概要

|       |        | MW 合計 | MW タンパク質 | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 | n (脂質) | n(脂質)/n (単量体) | %タンパク質 |
|-------|--------|-------|----------|--------------|-------|--------|---------------|--------|
| 1:60  | メインピーク | 254   | 100      | 3.1          | 153   | 203    | 66            | 40     |
|       | ポストピーク | 127   | 110      | 3.4          | 17    | 23     | 7             | 86     |
| 1:65  | プレピーク  | 272   | 132      | 4.1          | 141   | 187    | 46            | 48     |
|       | メインピーク | 259   | 100      | 3.1          | 159   | 211    | 68            | 39     |
| 1:70  | ポストピーク | 183   | 131      | 4.1          | 7     | 9      | 2             | 95     |
|       | プレピーク  | 280   | 121      | 3.8          | 159   | 211    | 56            | 43     |
| 1:75  | メインピーク | 264   | 99       | 3.1          | 165   | 219    | 71            | 38     |
|       | ポストピーク | 119   | 105      | 3.3          | 14    | 19     | 6             | 88     |
| 1:80  | プレピーク  | 291   | 109      | 3.4          | 183   | 243    | 71            | 37     |
|       | メインピーク | 268   | 98       | 3.1          | 170   | 226    | 73            | 37     |
| 1:85  | ポストピーク | 120   | 101      | 3.2          | 19    | 25     | 8             | 84     |
|       | プレピーク  | 311   | 114      | 3.6          | 197   | 261    | 73            | 37     |
| 1:90  | メインピーク | 276   | 96       | 3.0          | 176   | 234    | 78            | 36     |
|       | ポストピーク | 137   | 127      | 4.0          | 10    | 13     | 3             | 93     |
| 1:95  | プレピーク  | 331   | 115      | 3.6          | 216   | 287    | 80            | 35     |
|       | メインピーク | 278   | 98       | 3.1          | 180   | 239    | 77            | 35     |
| 1:100 | ポストピーク | 139   | 117      | 3.7          | 22    | 29     | 8             | 85     |
|       | プレピーク  | 345   | 113      | 3.5          | 232   | 308    | 88            | 33     |
| 1:90  | メインピーク | 285   | 98       | 3.1          | 187   | 248    | 80            | 34     |
|       | ポストピーク | 143   | 110      | 3.4          | 33    | 44     | 13            | 77     |
| 1:95  | プレピーク  | 363   | 115      | 3.6          | 248   | 329    | 91            | 32     |
|       | メインピーク | 292   | 97       | 3.0          | 194   | 257    | 86            | 33     |
| 1:100 | ポストピーク | 155   | 122      | 3.8          | 33    | 44     | 12            | 79     |
|       | プレピーク  | 377   | 117      | 3.7          | 260   | 345    | 93            | 31     |
| 1:100 | メインピーク | 298   | 98       | 3.1          | 200   | 265    | 86            | 33     |
|       | ポストピーク | 160   | 114      | 3.6          | 46    | 61     | 17            | 71     |

## 【 0 2 8 1 】

## g) Zwittergentを用いる脂質粒子形成

コール酸を合成界面活性剤Zwittergentに置換したことを除いて、以下のパラメータを用いて、この実施例の項目 a) ~ c) において報告した通り、脂質粒子の形成を実施した：

タンパク質：23.5 mg/mLのテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I

バッファ：50 mMのTris - HCl、7.2 Mのグアニジン塩酸塩、140 mMのメチオニン、pH 8

脂質付加バッファ：250 mMのTris - HCl、140 mMのNaCl、pH 7.5

100%のPOPC、アポリポタンパク質：リン脂質のモル比 = 1 : 60

10

20

30

40

50

【 0 2 8 2 】

【表 2 1】

表 17: 様々なアプローチのサンプル概要、及び脂質粒子形成についての観察結果/パラメータ

| サンプル             | 界面活性剤 [%] | 混濁         |      |     | 透析後の体積 [ml] | 透析後の c<br>[µg/ml] | [mg] TN-Apo A-I | 収率 [%] |
|------------------|-----------|------------|------|-----|-------------|-------------------|-----------------|--------|
|                  |           | 溶解した<br>脂質 | 脂質付加 | 透析後 |             |                   |                 |        |
| Zwittergent 3-8  |           |            |      |     |             |                   |                 |        |
| 0.1 x CMC        | 0.8       | +++        | +++  | +++ | 2.1         | 2230.18           | 4.68            | 99.6   |
| 0.5 x CMC        | 4.2       | ++         | ++   | +   | 2.9         | 1536.81           | 4.46            | 94.8   |
| 1 x CMC          | 8.4       | +          | +    | +   | 3           | 1475.07           | 4.43            | 94.2   |
| 2 x CMC          | 16.7      | -          | -    | -   | 4.3         | 1081.27           | 4.65            | 98.9   |
| 3 x CMC          | 25.1      | -          | -    | -   | 5.5         | 839.85            | 4.62            | 98.3   |
| Zwittergent 3-10 |           |            |      |     |             |                   |                 |        |
| 0.1 x CMC        | 0.1       | +++        | +++  | +++ | 2           | 2361.56           | 4.72            | 100.5  |
| 0.5 x CMC        | 0.6       | +++        | ++   | ++  | 2           | 2221.38           | 4.44            | 94.5   |
| 1 x CMC          | 1.2       | ++         | +    | +   | 2.1         | 2267.16           | 4.76            | 101.3  |
| 2 x CMC          | 2.5       | +          | +    | (+) | 2.3         | 2082.18           | 4.79            | 101.9  |
| 5 x CMC          | 6.2       | -          | -    | -   | 2.5         | 1941.61           | 4.85            | 103.3  |
| 10 x CMC         | 12.3      | -          | -    | -   | 4           | 1073.92           | 4.30            | 91.4   |
| Zwittergent 3-12 |           |            |      |     |             |                   |                 |        |
| 0.1 x CMC        | 0.01      | +++        | +++  | +++ | 2           | 2722.85           | 5.45            | 115.9  |
| 1 x CMC          | 0.1       | +++        | +++  | +++ | 2           | 2158.81           | 4.32            | 91.9   |
| 2 x CMC          | 0.2       | +++        | +++  | ++  | 2           | 2636              | 5.27            | 112.2  |
| 20 x CMC         | 1.9       | +          | +    | +   | 2.1         | 2525.69           | 5.30            | 112.8  |
| 100 x CMC        | 9.4       | -          | -    | -   | 3.5         | 1567.85           | 5.49            | 116.8  |
| 300 x CMC        | 28.1      | -          | -    | -   | 5.6         | 1069.04           | 5.99            | 127.4  |

10

20

30

40



| サンプル         | 界面活性剤 [%] | 混濁         |      |     | 透析後の体積 [ml] | 透析後のc<br>[μg/ml] | [mg] TN-Apo A-I | 収率 [%] |
|--------------|-----------|------------|------|-----|-------------|------------------|-----------------|--------|
|              |           | 溶解した<br>脂質 | 脂質付加 | 透析後 |             |                  |                 |        |
| コール酸         |           |            |      |     |             |                  |                 |        |
| 0.1 x<br>CMC | 0.06      | +++        | +++  | +++ | 2           | 2323.09          | 4.65            | 98.9   |
| 0.5 x<br>CMC | 0.3       | +          | -    | -   | 2           | 2301.15          | 4.60            | 97.9   |
| 1 x CMC      | 0.6       | -          | -    | -   | 2           | 2316.86          | 4.63            | 98.6   |
| 2 x CMC      | 1.2       | -          | -    | -   | 2.5         | 1178.72          | 2.95            | 62.7   |
| 5 x CMC      | 3         | -          | -    | -   | 2.5         | 2435.34          | 6.09            | 129.5  |
| 10 x<br>CMC  | 6         | -          | -    | -   | 3.5         | 1814.69          | 6.35            | 135.1  |
|              |           |            |      |     |             |                  |                 |        |

10

20

## 【0283】

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を含む脂質粒子を、ネイティブPAGEで分析した。脂質を含まないテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は、140 kDaで移動し（図19中のレーン1）、一方、脂質粒子は、232 kDa ~ 440 kDaのより高い分子量に対する特徴的なシフトを示す。

## 【0284】

それぞれの界面活性剤をわずか0.1 x CMCだけ用いて調製された全てのサンプルにおいて、脂質を含まないテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I は検出されたが、脂質粒子は検出されなかった（図19、レーン2、8、13及び19）。しかし、0.5 x CMCの界面活性剤濃度は、Zwittergent 3-8及び3-10について、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を用いて脂質粒子を形成させるのに十分であった（レーン3、9及び14）。Zwittergent 3-12では、2.0 x CMCの濃度に到達するまで、脂質粒子は生じなかった（レーン21）。

30

## 【0285】

図20は、3 x CMCのZwittergent 3-8及びPOPC（モル比 アポリポタンパク質：リン脂質 = 1：60）を使用したテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を含む脂質粒子のSEC-MALLSクロマトグラムを示す。タンパクコンジュゲート分析の結果を表18に要約する。脂質粒子画分は、SECのクロマトグラムにおける2つの重なりピークに示される通り、2つの異なる種からなる。しかし、これら2つの種は非常に類似しており、主に粒子1個当たりのテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 分子の数で識別される（ピーク1については4.2、そして、ピーク2については3.2）。

40

## 【0286】

## 【表 2 2】

表 18: Zwittergent 3-8 の存在下で形成された脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析の概要

| x CMC |        | MW 合計 | MW タンパク質 | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 | n(脂質) | n(脂質)/<br>n(単量体) | %タンパク質 | Rh (w) (QELS)<br>[nm] |
|-------|--------|-------|----------|--------------|-------|-------|------------------|--------|-----------------------|
| 2     | プレピーク  | 345   | 147      | 4.6          | 198   | 261.5 | 57               | 42.5   | 7.7                   |
|       | メインピーク | 268   | 113      | 3.6          | 154   | 203.2 | 56               | 42.4   | 6.5                   |
| 3     | プレピーク  | 323   | 134      | 4.2          | 188   | 249.9 | 60               | 41.6   | 7.4                   |
|       | メインピーク | 257   | 110      | 3.5          | 146   | 192.9 | 55               | 43.0   | 6.5                   |

10

## 【 0 2 8 7】

図 2 1 は、SEC-MALLS 分析のクロマトグラムを示し、そして、図 1 9 は、2 x CMC の Zwittergent 3-10 及び P O P C (モル比 アポリポタンパク質 : リン脂質 = 1 : 6 0) を使用したテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を含む脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析の概要を示す。両方のピークは、それぞれ、3 . 5 個及び 5 個のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 分子を含む脂質粒子を含有する。

20

## 【 0 2 8 8】

## 【表 2 3】

表 19: Zwittergent 3-10 の存在下で形成された脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析の概要

| x CMC |        | MW 合計 | MW タンパク質 | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 | n(脂質) | n(脂質)/<br>n(単量体) | %タンパク質 | Rh (w) (QELS)<br>[nm] |
|-------|--------|-------|----------|--------------|-------|-------|------------------|--------|-----------------------|
| 2     | プレピーク  | 373   | 161      | 5.0          | 211   | 278.7 | 56               | 43.2   | 7.8                   |
|       | メインピーク | 272   | 112      | 3.5          | 159   | 210.3 | 60               | 41.4   | 6.6                   |
| 5     | プレピーク  | 345   | 150      | 4.7          | 195   | 256.6 | 55               | 43.6   | 7.5                   |
|       | メインピーク | 263   | 112      | 3.5          | 151   | 199.1 | 57               | 42.6   | 6.6                   |
| 10    | プレピーク  | 405   | 151      | 4.7          | 253   | 334.1 | 71               | 37.4   | 7.9                   |
|       | メインピーク | 265   | 110      | 3.3          | 154   | 203.2 | 58               | 41.8   | 6.5                   |

30

40

## 【 0 2 8 9】

Zwittergent 3-12 及び P O P C (モル比 アポリポタンパク質 : リン脂質 = 1 : 6 0)

50

を使用したテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を含む脂質粒子形成の結果を、表 20 に要約する。脂質粒子画分は、SEC のクロマトグラムにおける 2 つの重なりピークに示される通り、2 つの異なる種からなる。しかし、これら 2 つの種は非常に類似しており、主に粒子 1 個当たりのテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 分子の数で識別される。

【 0 2 9 0 】

【表 2 4】

表 20: Zwittergent 3-12 の存在下で形成された脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析の概要

| x CMC |        | MW 合計 | MW タンパク質 | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 | n (脂質) | n(脂質)/<br>n (単量体) | %タンパク質 | Rh (w) (QELS)<br>[nm] |
|-------|--------|-------|----------|--------------|-------|--------|-------------------|--------|-----------------------|
| 100   | メインピーク | 487   | 342      | 10.7         | 145   | 191.3  | 18                | 70.2   | 11.9                  |
| 300   | メインピーク | 241   | 208      | 6.5          | 32    | 43.3   | 7                 | 86.4   | 8.5                   |

【 0 2 9 1 】

コール酸及び P O P C (モル比 アポリポタンパク質 : リン脂質 = 1 : 6 0 ) を使用したテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を含む脂質粒子形成の結果を、表 2 1 に要約する。脂質粒子画分は、SEC のクロマトグラムにおける 2 つの重なりピークに示される通り、2 つの異なる種からなる。しかし、これら 2 つの種は非常に類似しており、主に

【 0 2 9 2 】

10

20

30

## 【表 25】

表 21: コール酸の存在下で形成された脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析の概要

| CMC |        | MW 合計 | MW タンパク質 | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 | n (脂質) | n(脂質)/<br>n (単量体) | %タンパク質 | Rh (w)<br>(QELS) [nm] |
|-----|--------|-------|----------|--------------|-------|--------|-------------------|--------|-----------------------|
| 0.5 | プレピーク  | 1295  | 461      | 14.5         | 829   | 1091   | 75                | 35.9   | 12.7                  |
|     | メインピーク | 361   | 153      | 4.8          | 207   | 273    | 57                | 42.5   | 7.7                   |
|     | ポストピーク | 283   | 115      | 3.6          | 168   | 221    | 62                | 40.6   | 6.8                   |
| 1   | プレピーク  | 1050  | 414      | 12.9         | 623   | 836    | 65                | 39.5   | 11.8                  |
|     | メインピーク | 337   | 154      | 4.8          | 182   | 240    | 50                | 45.9   | 7.6                   |
|     | ポストピーク | 284   | 121      | 3.8          | 162   | 214    | 56                | 42.7   | 6.9                   |
| 2   | プレピーク  | 332   | 143      | 4.5          | 188   | 248    | 55                | 43.2   | 7.3                   |
|     | メインピーク | 269   | 111      | 3.5          | 158   | 209    | 60                | 41.2   | 6.5                   |
| 5   | プレピーク  | 314   | 143      | 4.5          | 171   | 225    | 50                | 45.6   | 7.5                   |
|     | メインピーク | 278   | 118      | 3.7          | 158   | 208    | 56                | 42.7   | 6.8                   |
| 10  | プレピーク  | 292   | 135      | 4.2          | 156   | 206    | 50                | 46.3   | 7.3                   |
|     | メインピーク | 271   | 115      | 3.6          | 155   | 204    | 57                | 42.6   | 6.6                   |

## 【0293】

## 実施例 5

リフォールディング及び脂質粒子形成のための迅速希釈法

以下、前述の実施例 1 ~ 3 において生成された配列番号 01 のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を使用した。

## 【0294】

## a) POPC 及びナトリウムコール酸

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を大腸菌で発現させ、そして、実施例 1 ~ 3 (プロトコール 1) に従って精製した。精製後、250 mM の Tris、140 mM の NaCl、6.7 M のグアニジン塩酸塩、pH 7.4 を含有する溶液に対するダイアフィルトレーションによってバッファを交換した。タンパク濃度を 2.8 mg/mL に調整した。

## 【0295】

室温で 250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、135 mM のナトリウムコール酸、pH 7.4 を含有するバッファに 100 mol/L の POPC を溶解させることにより、脂質原液を調製した。脂質原液を室温で 2 時間インキュベートした。250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、pH 7.4 147.8 mL で脂質原液混合物 7.7 mL を希釈することにより、リフォールディングバッファを調製した。このバッファを室温で更に 7 時間撹拌した。

## 【0296】

250 mM の Tris、140 mM の NaCl、6.7 M のグアニジン塩酸塩、pH 7.4 中のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 16.2 mL をリフォールディングバッファに添加することにより、リフォールディング及び脂質粒子形成を開始させた。これにより、グ

10

20

30

40

50

アニジン塩酸塩は1：10に希釈される。常に攪拌しながら16時間室温で溶液をインキュベートした。ダイアフィルトレーションによって、界面活性剤の除去を実施した。

【0297】

【表26】

表 22: POPC を用いる迅速希釈によって得られる脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析の概要

| ピーク    | MW 合計 [kDa] | MW タンパク質 [kDa] | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 [kDa] | n (脂質) | n (脂質) / n (タンパク質) | %タンパク質 |
|--------|-------------|----------------|--------------|-------------|--------|--------------------|--------|
| プレピーク  | 347         | 141            | 4.4          | 207         | 272    | 62                 | 41     |
| メインピーク | 269         | 111            | 3.5          | 159         | 209    | 60                 | 41     |

10

20

【0298】

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を大腸菌で発現させ、そして、実施例 1 ~ 3 (プロトコール 2) に従って精製した。精製後、50 mM の Tris、10 mM の L - メチオニン、6.7 M のグアニジン塩酸塩、pH 7.4 を含有する溶液に対するダイアフィルトレーションによってバッファを交換した。タンパク濃度を 20.4 mg/mL に調整した。

【0299】

室温で 250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、10 mM の L - メチオニン、135 mM のナトリウムコール酸、pH 7.4 を含有するバッファに 100 モル/L のリン脂質 (比率 3 : 1 の POPC : DPPC) を溶解させることにより脂質原液を調製した。250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、pH 7.4 35.6 mL で脂質原液 3.7 mL を希

30

積することによりリフォールディングバッファを調製した。このバッファを室温で更に 2 時間攪拌した。

【0300】

50 mM の Tris、10 mM の L - メチオニン、6.7 M のグアニジン塩酸塩、pH 8.0 中のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 9.8 mL をリフォールディングバッファに添加することにより、リフォールディング及び脂質粒子形成を開始させた。これにより、グアニジン塩酸塩は 1 : 5 に希釈される。常に攪拌しながら一晩室温で溶液をインキュベートした。ダイアフィルトレーションによって、界面活性剤の除去を実施した。

【0301】

## 【表 27】

表 23: POPC/DPPC/コール酸混合物を用いる迅速希釈によって得られる脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析の概要

| ピーク        | MW<br>合計 [kDa] | MW<br>タンパク質 [kDa] | n<br>タンパク質<br>(APO-単量体) | MW<br>脂質 [kDa] | n<br>脂質 | n<br>脂質<br>/ n<br>タンパク質 | %<br>タンパク質 |
|------------|----------------|-------------------|-------------------------|----------------|---------|-------------------------|------------|
| プレ<br>ピーク  | 419            | 167               | 5.2                     | 251            | 333     | 64                      | 41         |
| メイン<br>ピーク | 252            | 101               | 3.2                     | 151            | 200     | 63                      | 41         |

10

## 【0302】

## b) POPC及びDPPC及びナトリウムコール酸

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を大腸菌で発現させ、そして、実施例 1 ~ 3 に従って精製した。精製後、250 mM の Tris、140 mM の NaCl、6.7 M のグアニジン塩酸塩、pH 7.4 を含有する溶液に対するダイアフィルトレーションによってバッファを交換した。タンパク濃度を 30 mg/mL に調整した。

20

## 【0303】

2 つの別々の脂質原液を調製した。室温で 250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、135 mM のナトリウムコール酸、pH 7.4 を含有するバッファに 100 モル/L の POPC を溶解させることにより、溶液 A を調製した。41 で 250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、135 mM のナトリウムコール酸、pH 7.4 を含有するバッファに 100 モル/L の DPPC を溶解させることにより、溶液 B を調製した。脂質原液 A 及び B を 3 : 1 の比率で混合し、そして、室温で 2 時間インキュベートした。250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、pH 7.4 6365 mL で脂質原液混合物 384 mL を希釈することによりリフォールディングバッファを調製した。このバッファを室温で更に 24 時間攪拌した。

30

## 【0304】

250 mM の Tris、140 mM の NaCl、6.7 M のグアニジン塩酸塩、pH 7.4 中のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 溶液 750 mL をリフォールディングバッファに添加することにより、リフォールディング及び脂質粒子形成を開始させた。これにより、グアニジン塩酸塩は 1 : 10 に希釈される。常に攪拌しながら少なくとも 12 時間室温で溶液をインキュベートした。ダイアフィルトレーションによって界面活性剤除去を実施した。

## 【0305】

40

## 【表 28】

表 24: POPC:DPPC = 1:1 を用いる迅速希釈によって得られる脂質粒子のタンパクコンジュゲート分析の概要

| ピーク    | MW 合計 [kDa] | MW タンパク質 [kDa] | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 [kDa] | n (脂質) | n (脂質) / n (タンパク質) | %タンパク質 |
|--------|-------------|----------------|--------------|-------------|--------|--------------------|--------|
| メインピーク | 263         | 102            | 3.2          | 161         | 214    | 67                 | 39     |
| ポストピーク | 182         | 85             | 2.7          | 97          | 129    | 48                 | 47     |

10

## 【0306】

## c) 様々なグアニジン塩酸塩濃度

20

本発明に係るテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を大腸菌において発現させ、そして、封入体から金属キレート親和性クロマトグラフィ法で精製した（実施例 1 ~ 3 を参照されたい）。精製後、250 mM の Tris、140 mM の NaCl、6.7 M のグアニジン塩酸塩、pH 7.4 を含有する溶液に対するダイアフィルトレーションによってバッファを交換した。タンパク濃度を 28 mg/mL に調整した。

## 【0307】

室温で 250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、135 mM のナトリウムコール酸、pH 7.4 を含有するバッファに 100 モル/L の POPC を溶解させることにより、脂質原液を調製した。脂質原液を室温で 2 時間インキュベートした。250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、pH 7.4 で脂質原液を希釈することにより、リフォールディングバッファを調製した。このバッファを室温で更に 12 時間攪拌した。様々な量のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I をリフォールディングバッファで希釈した： 1 : 5、1 : 7.5、1 : 10、1 : 12.5。これにより、リフォールディングバッファ中様々な残留濃度のグアニジン塩酸塩が得られる。その溶液を、一晚室温で攪拌して、リフォールディング及び脂質粒子形成を開始させた。透析によって界面活性剤除去を実施した。

30

## 【0308】

## 【表 29】

表 25: 様々な希釈比を用いる迅速希釈によって得られる脂質粒子のタンパク  
コンジュゲート分析の概要

| 希釈     | ピーク | MW 合計 [kDa] | MW タンパク質 [kDa] | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 [kDa] | n (脂質) | n (脂質) / n (タンパク質) | %タンパク質 |
|--------|-----|-------------|----------------|--------------|-------------|--------|--------------------|--------|
| 1:5    | メイン | 273         | 103            | 3,2          | 170         | 226    | 70                 | 38     |
| 1:7.5  | メイン | 272         | 100            | 3,1          | 173         | 230    | 73                 | 37     |
| 1:10   | メイン | 266         | 106            | 3,3          | 160         | 212    | 64                 | 40     |
| 1:12.5 | メイン | 281         | 101            | 3,2          | 180         | 239    | 76                 | 36     |

10

## 【0309】

d) 尿素の存在下における P O P C 及びナトリウムコール酸

テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を大腸菌で発現させ、そして、実施例 1 ~ 3 に従って精製した。精製後、250 mM の Tris、140 mM の NaCl、6.7 M の尿素、pH 7.4 を含有する溶液に対するダイアフィルトレーションによってバッファを交換する。タンパク濃度を 28 mg/mL に調整する。

20

## 【0310】

室温で 250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、135 mM のナトリウムコール酸、pH 7.4 を含有するバッファに 100 モル/L の P O P C を溶解させることにより、脂質原液を調製する。脂質原液を室温で 2 時間インキュベートする。250 mM の Tris - HCl、140 mM の NaCl、pH 7.4 147.8 mL で脂質原液混合物 7.7 mL を希釈することによりリフォールディングバッファを調製する。このバッファを室温で更に 7 時間攪拌する。

30

## 【0311】

250 mM の Tris、140 mM の NaCl、6.7 M の尿素、pH 7.4 中のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 溶液 16.2 mL をリフォールディングバッファに添加することにより、リフォールディング及び脂質粒子形成を開始させる。これにより、尿素は 1 : 10 に希釈される。常に攪拌しながら 16 時間室温で溶液をインキュベートする。ダイアフィルトレーションによって、界面活性剤の除去を実施する。

## 【0312】

e) P O P C 及びナトリウムコール酸及び野生型のアポリポタンパク質 A - I

別の例示的な第 2 の方法では、6.7 M のグアニジン塩酸塩、50 mM の Tris、10 mM のメチオニン、pH 8.0 中のヒトのアポリポタンパク質 A - I (野生型のアポリポタンパク質 A - I) を、脂質付加バッファで 1 : 5 (v/v) に希釈して、タンパク濃度を 0.6 mg/mL にする。脂質付加バッファは、7 mM のコール酸、4 mM の P O P C 及び 1.3 mM の D P P C からなっており、これは、脂質のタンパク質に対する比 240 : 1 に相当する。SEC - MALLS を使用して複合体形成を分析した。約 200 の脂質分子からなる複合体において、およそ 2 個のアポリポタンパク質分子が見出された。

40

## 【0313】



## 【表 3 0】

表 26: タンパクコンジュゲート分析の概要

| 出発物質 |        | MW 合計 | MW タンパク質 | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 | 脂質の数 | 脂質：タンパク質の比 |
|------|--------|-------|----------|--------------|-------|------|------------|
| 変性   | メインピーク | 235   | 71       | 2.2          | 163   | 216  | 1:97       |

10

## 【 0 3 1 4】

## 実施例 6

変性タンパク質又はネイティブなタンパク質から出発する脂質粒子形成

以下、前述の実施例 1 ~ 3 において生成された配列番号 0 1 のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を使用した。

## 【 0 3 1 5】

実施例 4 に報告した方法（第 1 の方法）は、脂質粒子を形成するためにネイティブなアポリポタンパク質を必要とするが、実施例 5 に報告する方法（第 2 の方法）は、脂質粒子を形成するために完全に変性されたアポリポタンパク質で出発する。

20

## 【 0 3 1 6】

例示的な第 1 の方法では、6.7 M のグアニジン塩酸塩、50 mM の Tris、10 mM のメチオニン（pH 8.0）中の変性テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を、3.46 mg/mL のタンパク濃度の 250 mM の Tris、140 mM の NaCl、10 mM のメチオニンからなるバッファ（pH 7.5）に対して大規模に透析した。次いで、POPC 及びコール酸の混合物を添加して、溶液中の最終濃度を POPC 6 mM 及びコール酸 8 mM にした。これは、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 単量体 1 分子当たり POPC 60 分子の比率に相当する（60 : 1）。次いで、ダイアフィルトレーションによって界面活性剤を除去した。形成されたタンパク - 脂質複合体を SEC - MALLS により分析した。この方法を使用したところ、形成された種のうちの約 60 % が 3 超のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 単量体を含む不均一な生成物が形成された。

30

## 【 0 3 1 7】

例示的な第 2 の方法では、6.7 M のグアニジン塩酸塩、50 mM のトリリス、10 mM のメチオニン（pH 8.0）中の変性テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I を、脂質付加バッファで 1 : 10 (v/v) に直接希釈して、タンパク質濃度を 2.5 mg/mL にする。脂質付加バッファは、6 mM のコール酸及び 4.5 mM の POPC からなっており、これは、脂質のタンパク質に対する比 60 : 1 に相当する。この方法を使用したところ、テトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 1 分子当たり脂質 60 分子が結合している、90 % 超の単一形成種を含む均一な生成物が形成された（図 2 2 を参照されたい）。

40

## 【 0 3 1 8】

## 【表 3 1】

表 27: タンパクコンジュゲート分析の概要

| 出発物質  |               | MW 合計 | MW タンパク質 | n (タンパク質単量体) | MW 脂質 | 脂質の数 | 脂質：タンパク質の比 |
|-------|---------------|-------|----------|--------------|-------|------|------------|
| ネイティブ | メインピーク (60%)  | 321   | 131      | 4.1          | 190   | 250  | 61         |
|       | メインピーク (40%)  | 269   | 107      | 3.3          | 162   | 213  | 65         |
| 変性    | メインピーク (>90%) | 269   | 111      | 3.5          | 159   | 209  | 60         |

10

## 【 0 3 1 9 】

## 実施例 7

コール酸可溶化及びZwittergent可溶化 P O P C / D P P C を用いるインスリン - F の脂質付加

脂質粒子形成のために選択したタンパク質は、市販のインスリン (Humalog (登録商標), Insulin Lispro, Lilly) である。このタンパク質の分子量は、5 8 0 8 Da である。脂質粒子におけるインスリンの検出限界を上昇させるために、タンパク質を NHS - フルオレセイン (6 - [フルオレセイン - 5 (6) - カルボキサミド]ヘキサン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、Sigma Aldrich# 46940-5MG-F) で標識した。

## 【 0 3 2 0 】

P O P C 及び D P P C の 1 : 1 混合物を使用して、実施例 4 に報告した通り、NHS - フルオレセイン - 標識インスリン (インスリン - F) の Zwittergent - 及びコール酸 - 媒介脂質付加を実施した。P B S (pH 7 . 4) 中 1 x C M C のコール酸、2 x C M C の Zwittergent 3-8 又は 5 x C M C の Zwittergent 3-10 のいずれかに 0 . 5 mM の脂質混合物を溶解させた。超音波浴中で 1 時間 4 5 にて脂質の可溶化を行った。タンパク質：脂質モル比 1 : 2 (Zwittergent 3-8) 又は 1 : 1 . 2 (Zwittergent 3-10 及びコール酸) でインスリン - F を可溶化脂質に添加した。脂質付加混合物を、室温で 1 時間インキュベートし、次いで、PBS (pH 7 . 4) に対して大規模に透析して、界面活性剤を除去した。

20

30

## 【 0 3 2 1 】

形成された脂質粒子及び対照サンプルを、蛍光検出 (4 9 4 nm ext., 5 2 1 nm em.) を使用する SE-HPLC 及び UV280 吸光度で分析した。脂質付加アプローチ 1 つ当たり 3 つの異なるサンプルについて SE-HPLC で分析した：P B S に溶解したインスリン - F、P B S 中のインスリン - F を含まないリポソーム、及びインスリン - F を含む脂質粒子。脂質付加されていないインスリン - F は、約 4 0 分の溶出時間でカラムから溶出し、そして、ピークは、蛍光及び UV280 検出によって検出される。脂質付加されたインスリン - F サンプルは、2 つの別々のピークとしてカラムから溶出し、蛍光及び UV280 によって検出される。遅いピーク (およそ 4 0 分でピーク最大値) は、インスリン - F 対照サンプルと共に移動する。1 5 分の溶出時間における早いピークは、より高分子量、次いで、インスリン - F を有し、そして、脂質付加されたインスリン - F からなっていた。タンパク質を含まない脂質粒子は、1 5 分の溶出時間で溶出する。

40

## 【 0 3 2 2 】

50

## 実施例 8

## アポリポタンパク質の応用

## a) LCAT 活性に対する DPPC 及び POPC の影響

パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC) 又はジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) のいずれかと、組換え型野性型アポリポタンパク質 A - I 又はテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I のいずれかを含む脂質粒子を、LCAT によるコレステロールのエステル化を支持する能力について試験した。

## 【0323】

コレステロールのエタノール溶液を添加することによって、トリチウムを含むコレステロール (4% ; モルベースでホスファチジルコリン含量に対して) を脂質粒子に組み込んだ。LCAT によって触媒されるコレステロールのエステル化を支持する生じるタンパク - 脂質複合体の能力を、37 で 1 時間、125  $\mu$ L (10mM の Tris、150mM の NaCl、1mM の EDTA、1mM の  $\text{NaN}_3$  ; pH7.4 ; 2mg/mL の HUF AF アルブミン ; 4mM のベータメルカプトエタノール) 中 0.2  $\mu$ g/mL の組換え型 LCAT 酵素 (ROAR biochemical) の存在下で試験した。クロロホルム : メタノール (2 : 1) を添加することによって反応を停止させ、脂質を抽出した。エステル化の「パーセント」は、TLC 及びシンチレーション計数により、コレステロール - コレステリルエステル分離後に計算した。形成されたエステルにトレーサの 20% 未満しか組み込まれていなかったとき、反応速度が実験条件下で一定であるとみなすことができた。データは、XLfit ソフトウェア (IDBS) を使用して、Michaelis Menten の等式に適合させた。結果を視覚化するために、図 3 を参照されたい。

10

20

## 【0324】

## b) LCAT 活性に対する DPPC / POPC の影響

組換え型野性型アポリポタンパク質 A - I と  $^3\text{H}$  コレステロール、DPPC / POPC 混合物及びコール酸とをモル比 1 : 4 : 80 : 113 で混合することにより、界面活性剤としてコール酸を使用して脂質粒子を調製した。DPPC / POPC 混合物は、100% の POPC ; 75% の POPC ; 50% の POPC ; 25% の POPC のいずれかを含有していた。

## 【0325】

透析によりコール酸を除去した後、LCAT によって触媒されるコレステロールのエステル化を支持する生じるタンパク - 脂質複合体の能力について試験した。コレステロールのエタノール溶液を添加することによって、 $^3\text{H}$  コレステロール (4% ; モルベースでホスファチジルコリン含量に対して) を脂質粒子に組み込んだ。LCAT によって触媒されるコレステロールのエステル化を支持する、生じるタンパク - 脂質複合体の能力を、37 で 1 時間、125  $\mu$ L (10mM の Tris、150mM の NaCl、1mM の EDTA、1mM の  $\text{NaN}_3$  ; pH7.4 ; 2mg/mL の HUF AF アルブミン ; 4mM のベータメルカプトエタノール) 中 0.2  $\mu$ g/mL の組換え型 LCAT 酵素 (ROAR biochemical) の存在下で試験した。クロロホルム : メタノール (2 : 1) を添加することによって反応を停止させ、脂質を抽出した。エステル化の「パーセント」は、TLC 及びシンチレーション計数により、コレステロール - コレステリルエステル分離後に計算した。エステルにトレーサの 20% 未満しか組み込まれていなかったとき、反応速度が実験条件下で一定であるとみなすことができた。データは、XLfit ソフトウェア (IDBS) を使用して、Michaelis Menten の等式に適合させ、それを図 4 に示す。

30

40

## 【0326】

## 【表 3 2】

表 2a: 見かけの速度パラメータ

| 基質<br>[% POPC] | $K_m$<br>[nM] | $V_{max}$<br>[n モルのエステル/時間/U LCAT] |
|----------------|---------------|------------------------------------|
| 100            | 4.6           | 1.6                                |
| 75             | 0.4           | 1.9                                |
| 50             | 0.5           | 1.8                                |
| 25             | 1.0           | 1.7                                |
| 0              | 6.9           | 1.8                                |

10

## 【0327】

c) THP-1 に由来する泡沫細胞へのコレステロール排出

ホルボールミリスチン酸アセテートに THP-1 単球性白血病細胞を曝露することにより、マクロファージ（例えば、ヒト THP-1 細胞）を得た。次いで、<sup>3</sup>H コレステロールトレーサを含有するアセチル化 LDL の存在下で、細胞に更なる培養物をロードした。次いで、これらモデル泡沫細胞を 4 時間 ~ 8 時間コレステロールアクセプター試験化合物に曝露した（以下を参照されたい）。

## 【0328】

細胞培養上清を採取し、そして、細胞を 5% の NP40 に溶解させた。流出分率は、上清と細胞とにおける放射活性の合計に対する上清におけるコレステロール放射活性の比率として計算した。アクセプターを含有していない媒体に曝露された細胞からの流出を減じ、そして、線形適合によって流出速度を計算した。流出速度は、レファレンスとして細胞から 10 μg/mL の野性型アポリポタンパク質 A-I への流出を使用して標準化した（相対的な流出速度）。コレステロールアクセプター濃度の関数として、2 つの別々の実験において得られた相対的な流出速度をプロットし、そして、データを Michaelis Menten の等式に適合させた。

20

## 【0329】

ABCA-1 輸送体をアップレギュレートし、そして、コレステロール輸送を ABCA-1 媒介流出に偏らせることが知られている RXR-LXR アゴニストに曝露された細胞を使用して、並行実験を実施した。

30

## 【0330】

一連の試験において、脂質混合の影響はわずかしかみられなかった（図 5 及び表 2 7）。

## 【0331】

## 【表 3 3】

表 28: 様々なサンプル

| テトラネクチン-ア<br>ポリポタンパク質 A-<br>I と混合されるリン<br>脂質 | アポリポタンパク質：<br>リン脂質のモル比 | 調製方法 |
|--|------------------------|------|
| 100 % POPC/<br>0 % DPPC                      | 1:60                   | コール酸 |
| 75 % POPC/<br>25 % DPPC                      | 1:60                   | コール酸 |
| 50 % POPC/<br>50 % DPPC                      | 1:70                   | コール酸 |
| 0 % POPC/<br>100 % DPPC                      | 1:80                   | コール酸 |
| -  | 無し                     |      |

10

## 【 0 3 3 2】

泡沫細胞を R X R - L X R で前処理すると、脂質付加されていない物質に対する流出が大きく増加し、未処理細胞に対して最大速度が 6 倍増加した。脂質粒子に対する影響ははるかに小さく、2 倍増加したのみであり、これは、コレステロール排出に対する A B C A - 1 輸送体の寄与が小さいことを反映している（図 6）。

20

## 【 0 3 3 3】

## d) インビボ研究

5 つの脂質粒子変異体について試験した：

i) P O P C のみ

ii) D P P C のみ

iii) P O P C : D P P C 3 : 1

iv) P O P C : D P P C 1 : 1

v) D P P C : S M 9 : 1。

30

## 【 0 3 3 4】

80 mg/kg で 0.5 時間かけてウサギに静脈内注入を行い（n = 3 匹ウサギ / 試験化合物）、次いで、注入後 96 時間連続して血液をサンプリングした。

## 【 0 3 3 5】

E L I S A 用いるアポリポタンパク質レベルの分析：

- 薬物濃度

- 肝酵素、コレステロール、コレステロールエステルの血漿値に対するデータ。

## 【 0 3 3 6】

血漿中濃度は、試験した組成物全てについて非常に類似しており、それほど顕著ではない初期「分布」相に続いて、濃度の対数線形下降を示す（図 7、表 3）。

40

## 【 0 3 3 7】

## 【表 3 4】

表 3: 薬物動態学的データ

| テトラネクチン-<br>アポリポタンパク質<br>A-I と混合される<br>リン脂質 | $C_L$<br>[ml/時間/kg] | $V_{ss}$<br>[ml/kg] | $T_{1/2}$<br>[時間] | $C_{max}$<br>[mg/m] |
|---|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| 100 % POPC/<br>0 % DPPC                     | 0.897 ±<br>0.216    | 45.0 ± 2.5          | 36.9 ± 8.2        | 2.40 ± 0.19         |
| 0 % POPC/<br>100 % DPPC                     | 0.922 ±<br>0.098    | 37.8 ± 4.9          | 30.2 ± 7.7        | 2.29 ± 0.19         |
| 75 % POPC/<br>25 % DPPC                     | 0.815 ±<br>0.064    | 37.8 ± 5.6          | 34.2 ± 4.5        | 2.65 ± 0.28         |
| 50 % POPC/<br>50 % DPPC                     | 0.850 ±<br>0.135    | 43.1 ± 5.9          | 38.6 ± 10.6       | 2.34 ± 0.31         |
| 90 % DPPC/<br>10 % SM                       | 1.28 ± 0.62         | 50.7 ± 8.7          | 31.3 ± 8.2        | 1.91 ± 0.33         |

10

## 【 0 3 3 8 】

20

測定した薬物動態学的 (PK) パラメータは、試験した化合物全てについて類似していた。また、個体間差は低いことが見出された。測定された半減期は約 1.5 日であり、すなわち、野生型のアポリポタンパク質 A-I に比べて長かった。分布容積は、血漿容積 (ウサギでは約 40 mL/kg) に類似している。

## 【 0 3 3 9 】

## f) コレステロール動員

血漿中においてコレステロールは動員され、そして、エステル化される。テトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I が減少し始めた後でさえも、血漿コレステロールエステルレベルは上昇し続ける。血漿テトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I レベルが約 0.5 mg/mL (正常な野生型アポリポタンパク質 A-I の約 50%) まで減少しても、依然としてコレステロールエステルレベルの増加を検出することができる (図 8)。

30

## 【 0 3 4 0 】

## g) 肝酵素放出

POPC を含有するテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I を含む脂質粒子は肝酵素の放出を誘導しない (図 1)。ウサギと同様に、POPC 又は POPC/DPPC 混合物を含有する本発明に係るテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I の単回 i.v. 注入は、マウスにおいて安全である。1:3 のモル比で DPPC:POPC を含有するアポリポタンパク質組成物は、POPC 単独と同等であった (図 9)。

## 【 0 3 4 1 】

5 つの調製物のいずれにおいても、注入の 2 時間後まで著しい溶血は観察されなかった。テトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I を i.v. 適用した 2 時間後に得られた血漿サンプルにおいて、溶血は測光法で赤色として測定された。全血 (0.44% の Triton X-100 - 最終濃度によって作製) の 100% の溶血を、キャリブレーションに使用した (図 10)。

40

## 【 0 3 4 2 】

h) ヒト臍帯静脈内皮細胞に対するテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I の抗炎症作用

5 ~ 10 代継代した HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) を、16 時間それぞれのテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I 調製物中でインキュベートし、そして、最後の 4 時間 TNF で刺激した。VCAM1 表面発現は、FACS によって特異的抗体で検出され

50

た。

【0343】

実施例9

脂質粒子の安定性

N末端ヒスチジntag及びIgAプロテアーゼ切断部位を含有する野生型のアポリポタンパク質A-Iを大腸菌において発現させ、そして、上記の実施例において報告した通りカラムクロマトグラフィーによって精製した。ヒスチジntagは、IgAプロテアーゼによって切断して除去した。タンパク質のLipoid S100大豆リン脂質混合物に対する比1:150を使用して、脂質粒子(HDL粒子)を構築した。粒子は、pH値7.3の5mMのリン酸ナトリウム及び1%のスクロースを含有するバッファ中で保存した。SE-HPLCにより、10日間脂質付加及びインキュベートした後、インキュベート時に3つの別個のピークが明らかになった。40でインキュベートした後、保持時間10.8分において主なピークを検出することができ(総タンパク量の47%)、これは、5で保存したサンプルでは存在しない。10.8分のピークは、タンパク質の不安定化により可溶性の高分子量アセンブリが形成されたことを示す。

10

【0344】

POPC:DPPC混合物(POPCのDPPCに対する比3:1)から出発して得られた本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-Iを含有するHDL粒子も、5及び40でインキュベートした。高温におけるインキュベートでは、わずかな程度のプレピーク形成が導かれるが、10.8分の高分子量アセンブリにはそれほどシフトしない(11分で<2%の増加)。これは、野生型のアポリポタンパク質A-Iを含有する粒子に比べてHDL粒子の安定性が改善されたことを示す。

20

【0345】

実施例10

コレステロール動員

コレステロールが血液へ動員される効率は、アポリポタンパク質をインビボで投与した後に、総コレステロール濃度とアポリポタンパク質濃度とのそれぞれの可動域を比較することにより測定することができる。定量的評価については、基準線補正された総コレステロールの濃度-時間曲線下面積(AUC)及びアポリポタンパク質の濃度-時間曲線下面積の指数を計算した。

30

【0346】

この実験では、以下の物質を分析した：

- 大腸菌において発現させ、そして、上記の実施例において報告した通りカラムクロマトグラフィーによって精製したN末端ヒスチジntag及びIgAプロテアーゼ切断部位を含有する野生型のアポリポタンパク質A-I；ヒスチジntagは、IgAプロテアーゼによって切断して除去した；タンパク質のLipoid S100大豆リン脂質混合物に対する比1:150を使用して、脂質粒子(HDL粒子)を構築した、

- アポリポタンパク質A-IMilano変異体；タンパク質のPOPCに対する比1:40を使用して、脂質粒子(HDL粒子)を構築した、

- 本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I；タンパク質のPOPC及びDPPCに対する比1:60(POPCとDPPCとの比3:1)を使用して、脂質粒子(HDL粒子)を構築した。

40

【0347】

3つのHDL粒子をラットに適用した。それぞれのAUC比率について得られた値を表29に示す。

【0348】

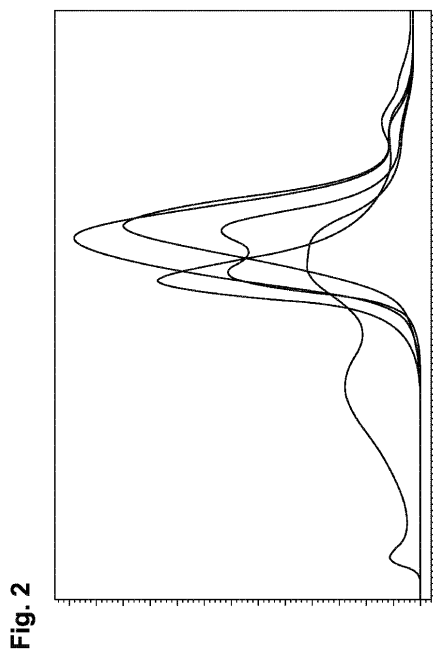
【表 3 5】

表 29: コレステロール動員

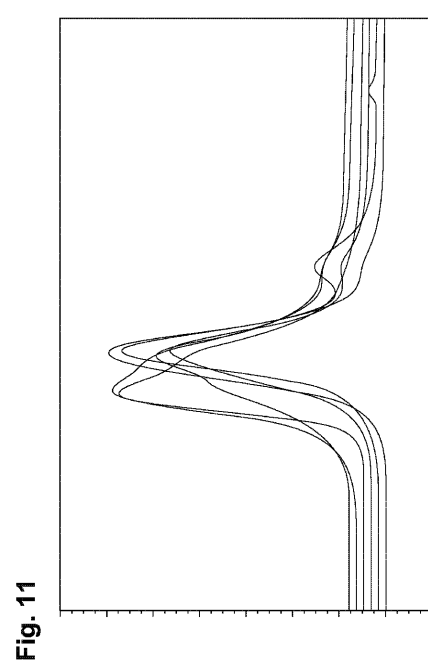
|                                 | 脂質            | AUC (血液中における時間依存性コレステロール濃度)<br>-----<br>AUC (血液中における時間依存性アポリポタンパク質 A-I 濃度) |
|---------------------------------|---------------|--|
| wt-アポリポタンパク質 A-I                | 大豆リン脂質混合物     | 0.0002 (mmol/l)/(μg/ml).   |
| アポリポタンパク質 A-I Milano 変異体        | POPC          | 0.0004 (mmol/l)/(μg/ml).   |
| 本明細書に報告されるテトラネクチン-アポリポタンパク質 A-I | POPC:DPPC 3:1 | 0.0013 (mmol/l)/(μg/ml)  |

10

【図 2】



【図 1 1】





【 1 2 】

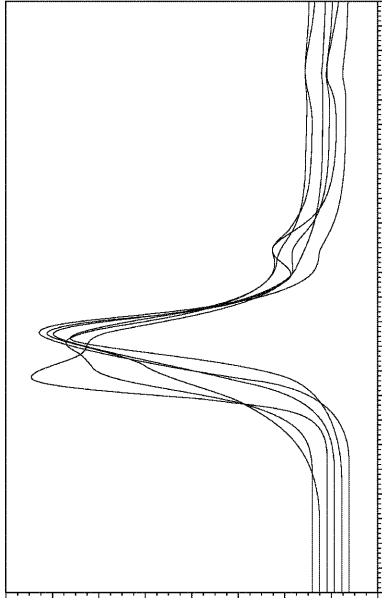
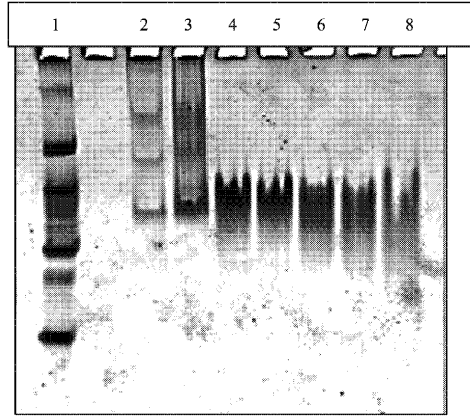


Fig. 12

【 1 3 】

Fig. 13



【 1 4 】

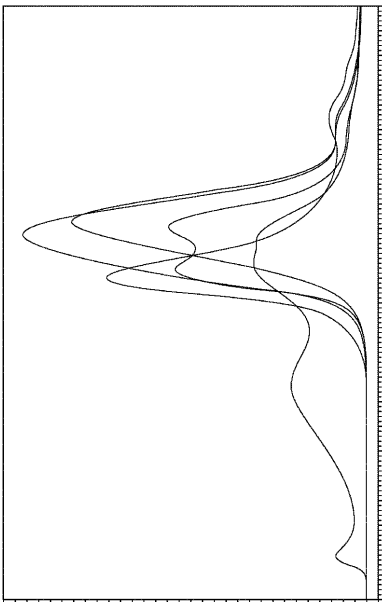


Fig. 14

【 1 5 】

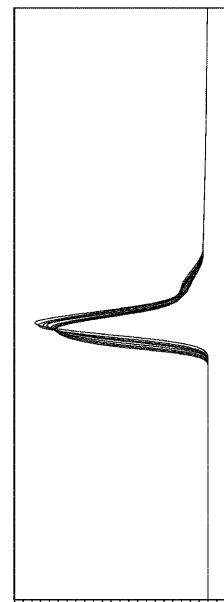
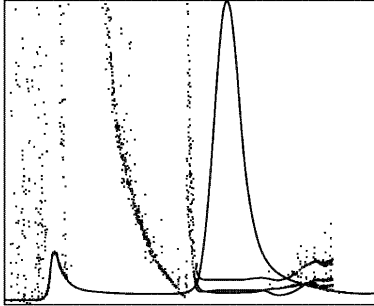


Fig. 15

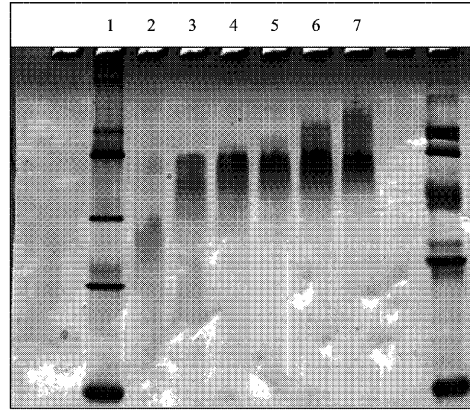
【 16 】

Fig. 16



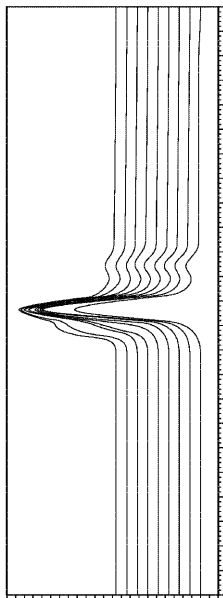
【 17 】

Fig. 17



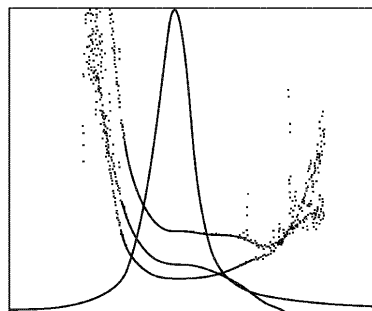
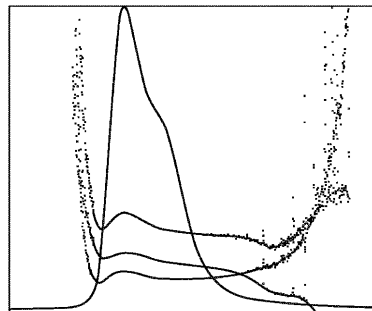
【 18 】

Fig. 18



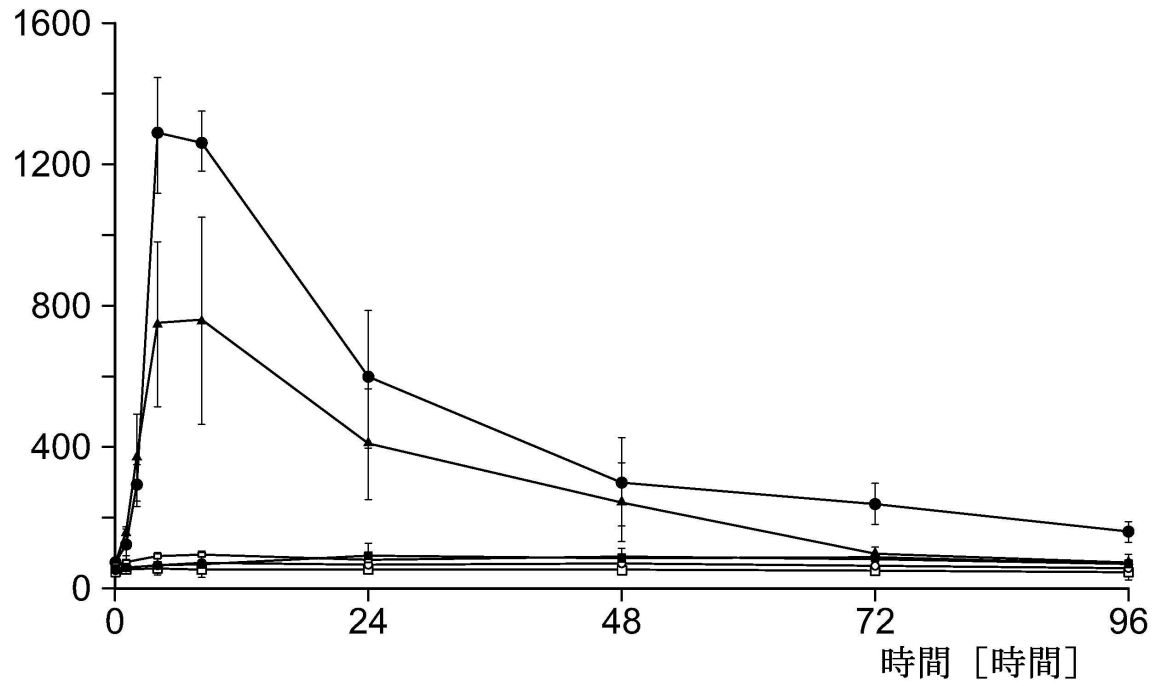
【 22 】

Fig. 22



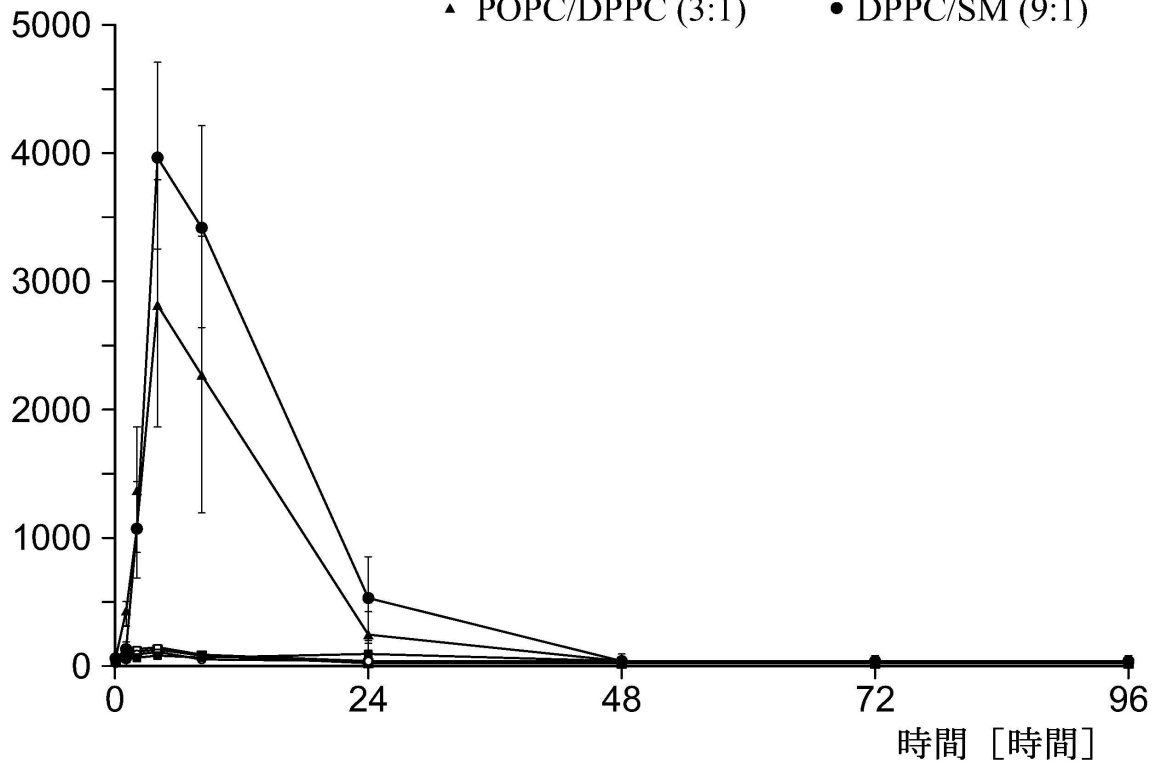
【図1】

ALT [ U/L ]

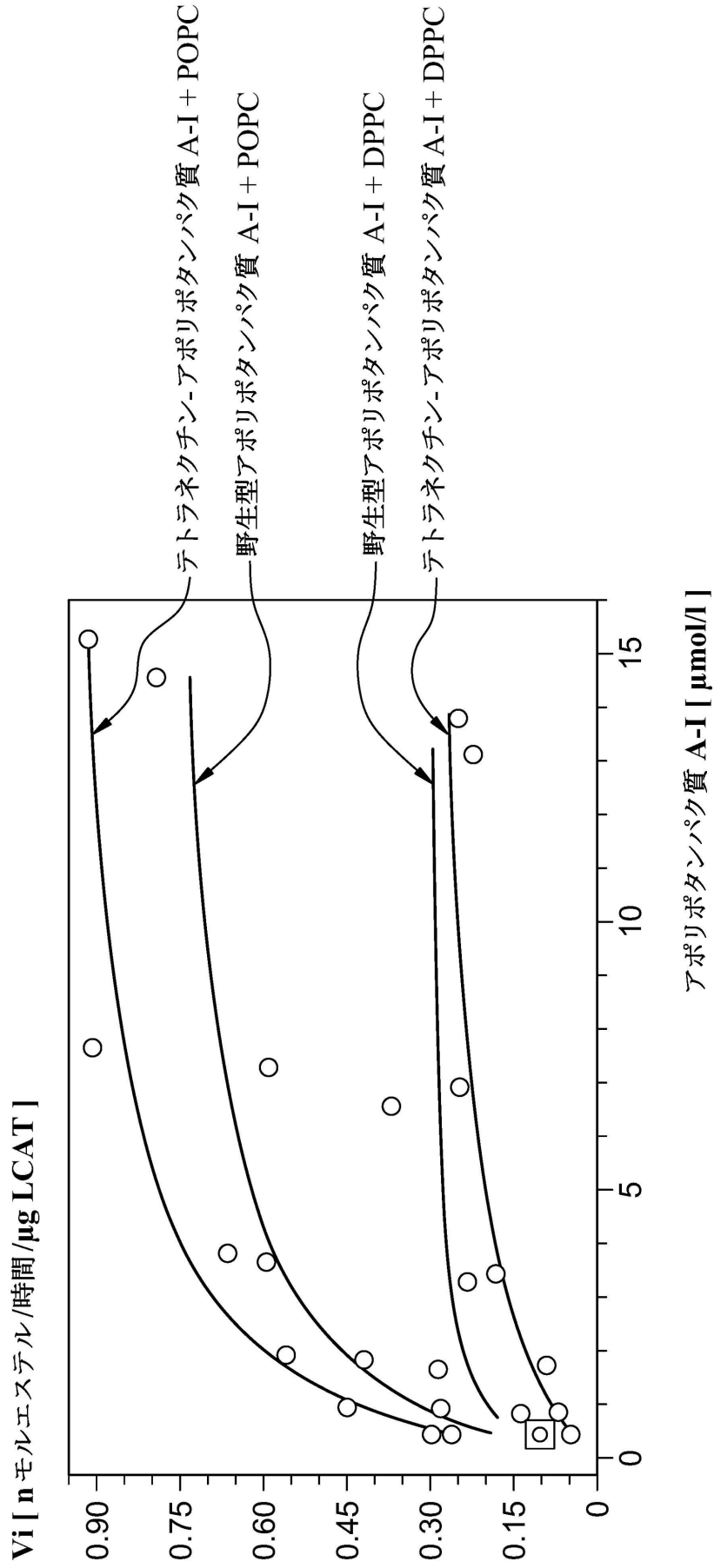


- 空の脂質粒子
- POPC/DPPC (1:1)
- ▣ POPC
- DPPC
- ▲ POPC/DPPC (3:1)
- DPPC/SM (9:1)

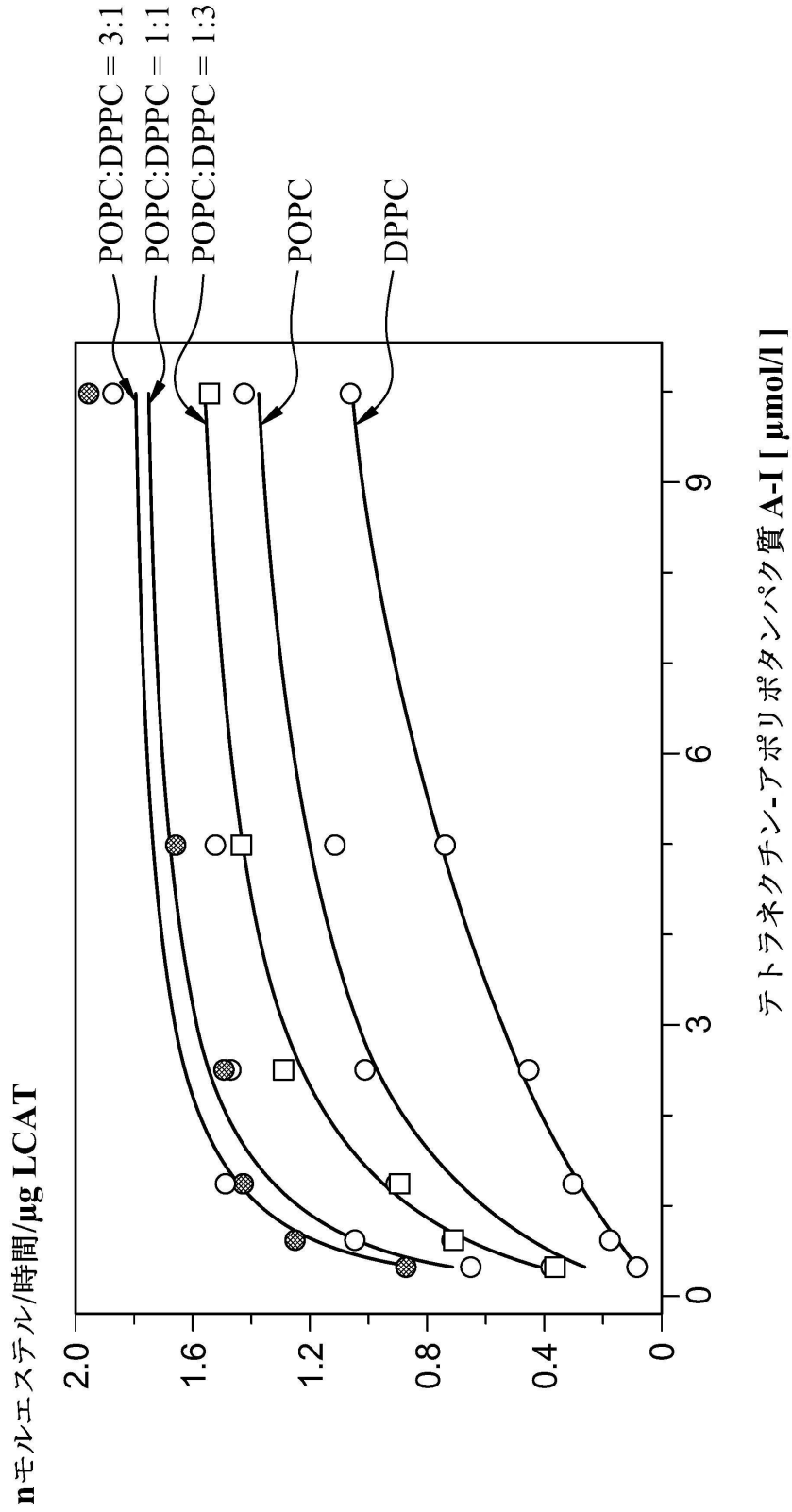
ALT [ U/L ]



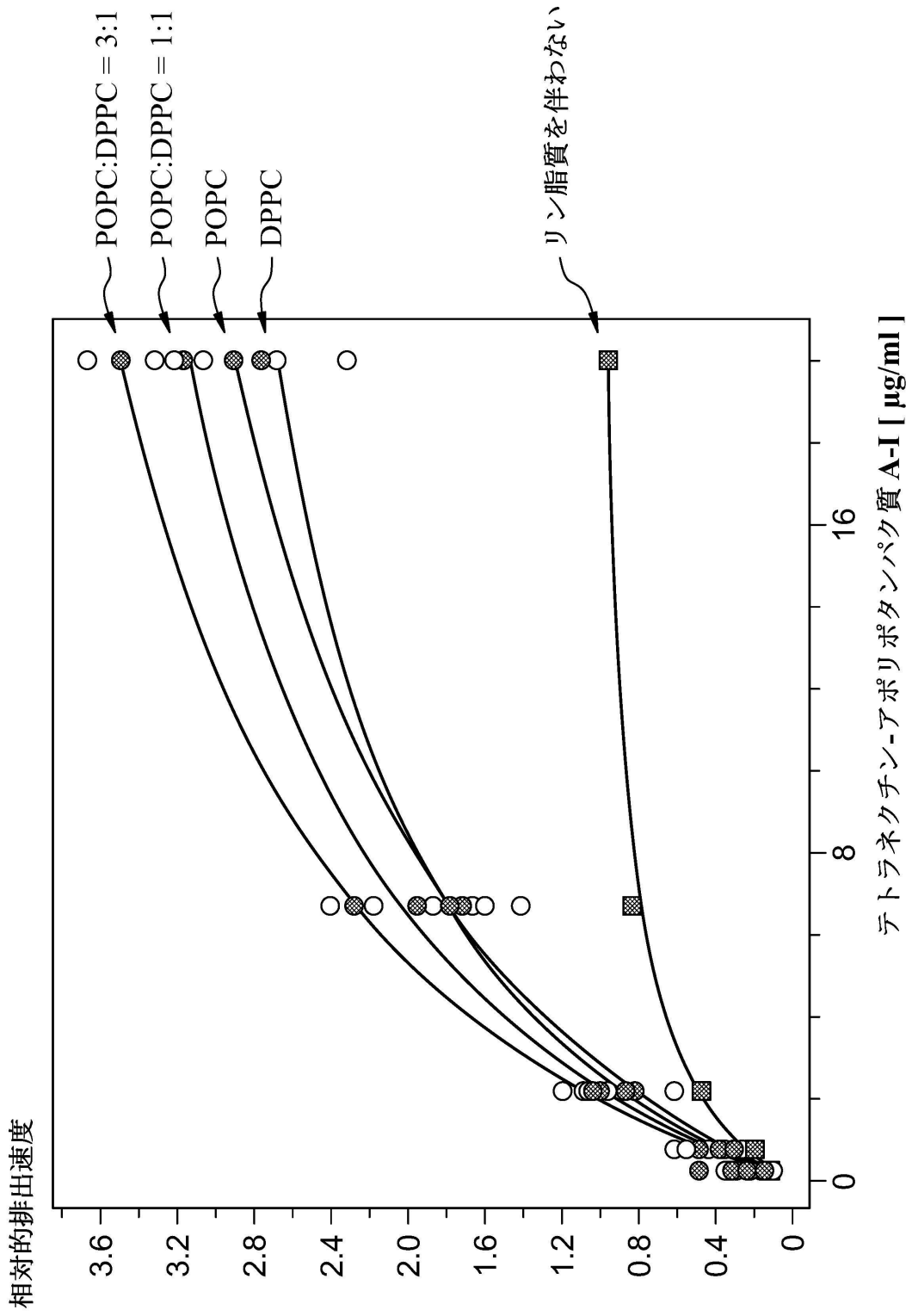
【 図 3 】



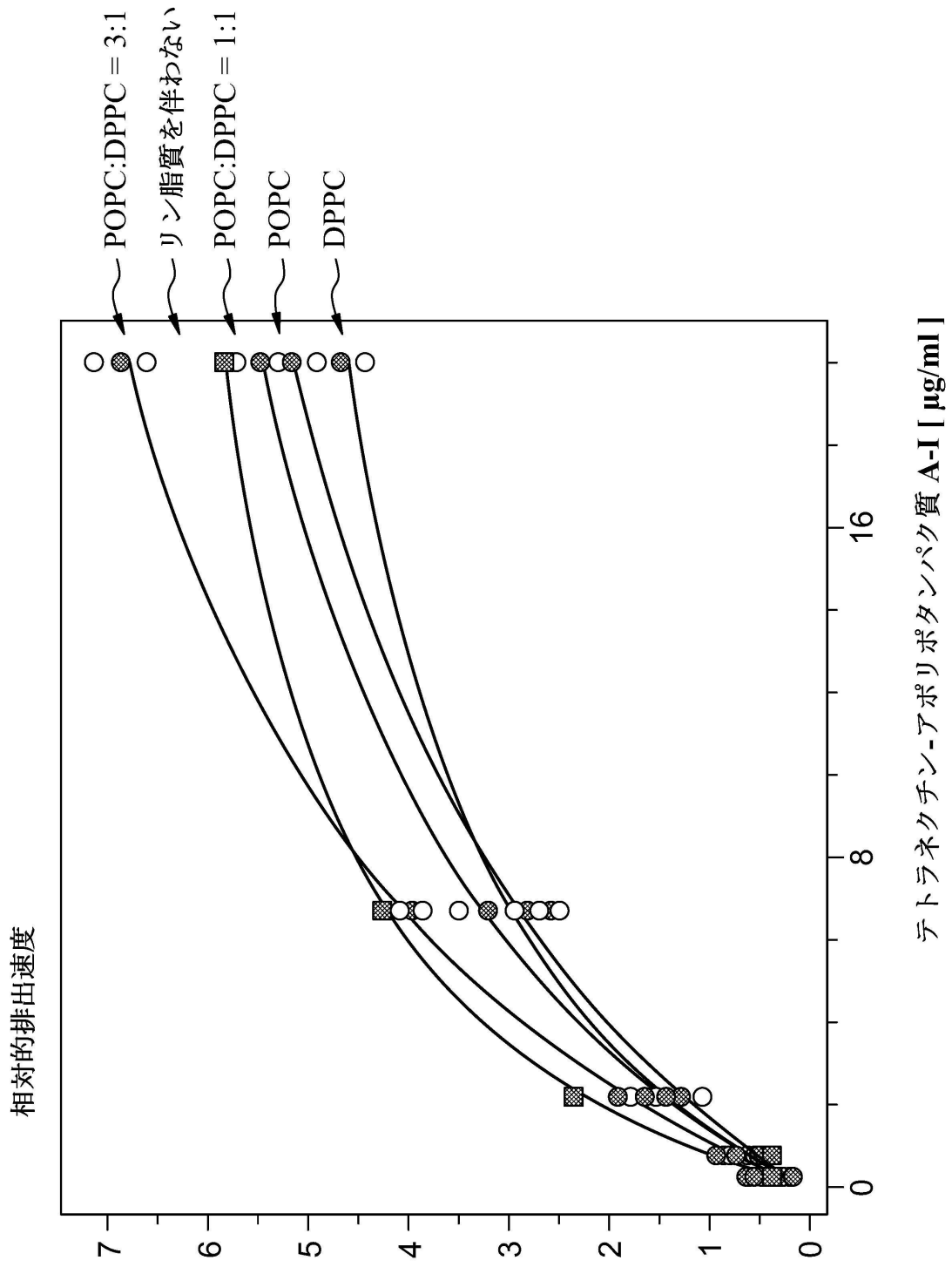
【 図 4 】



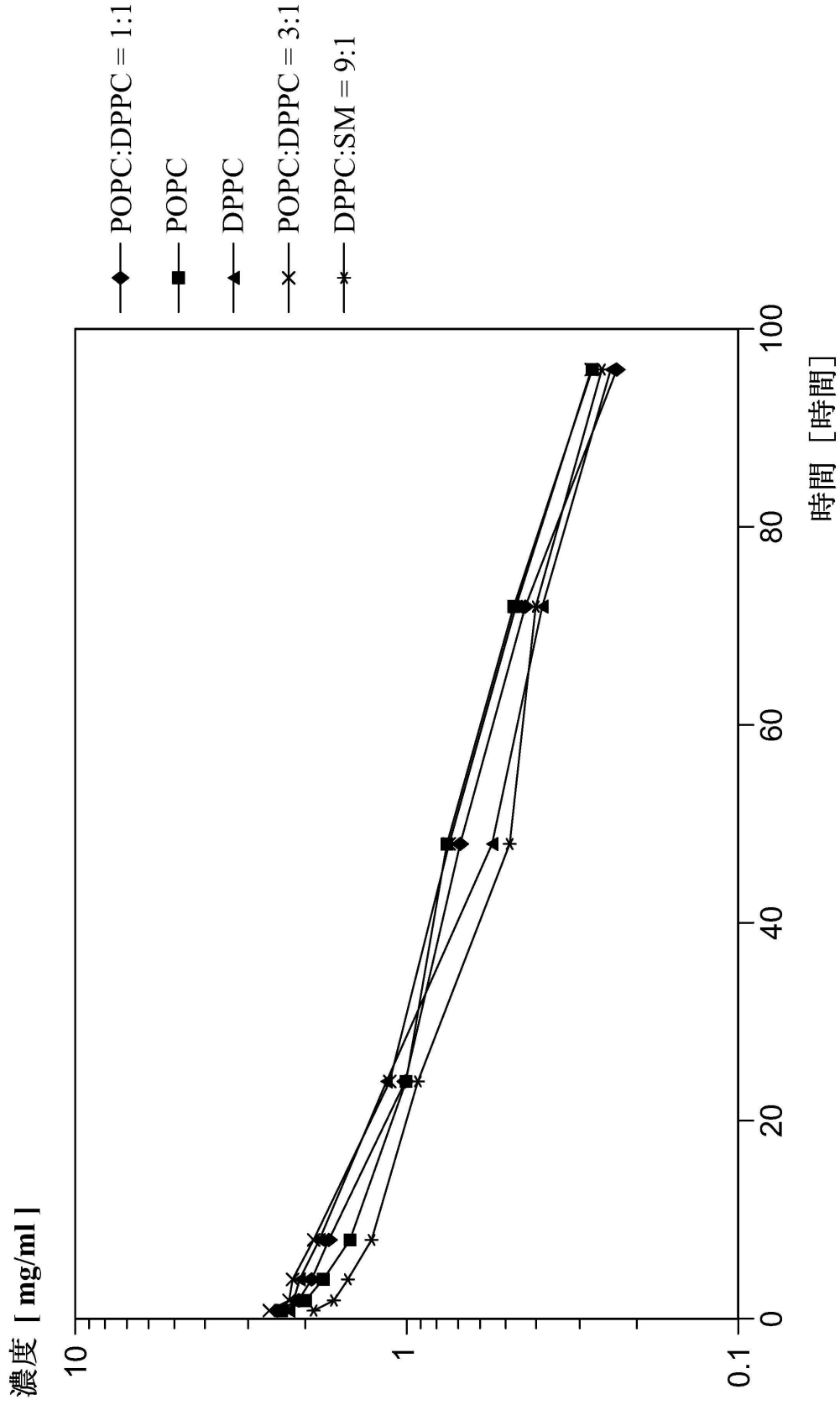
【 図 5 】



【 図 6 】

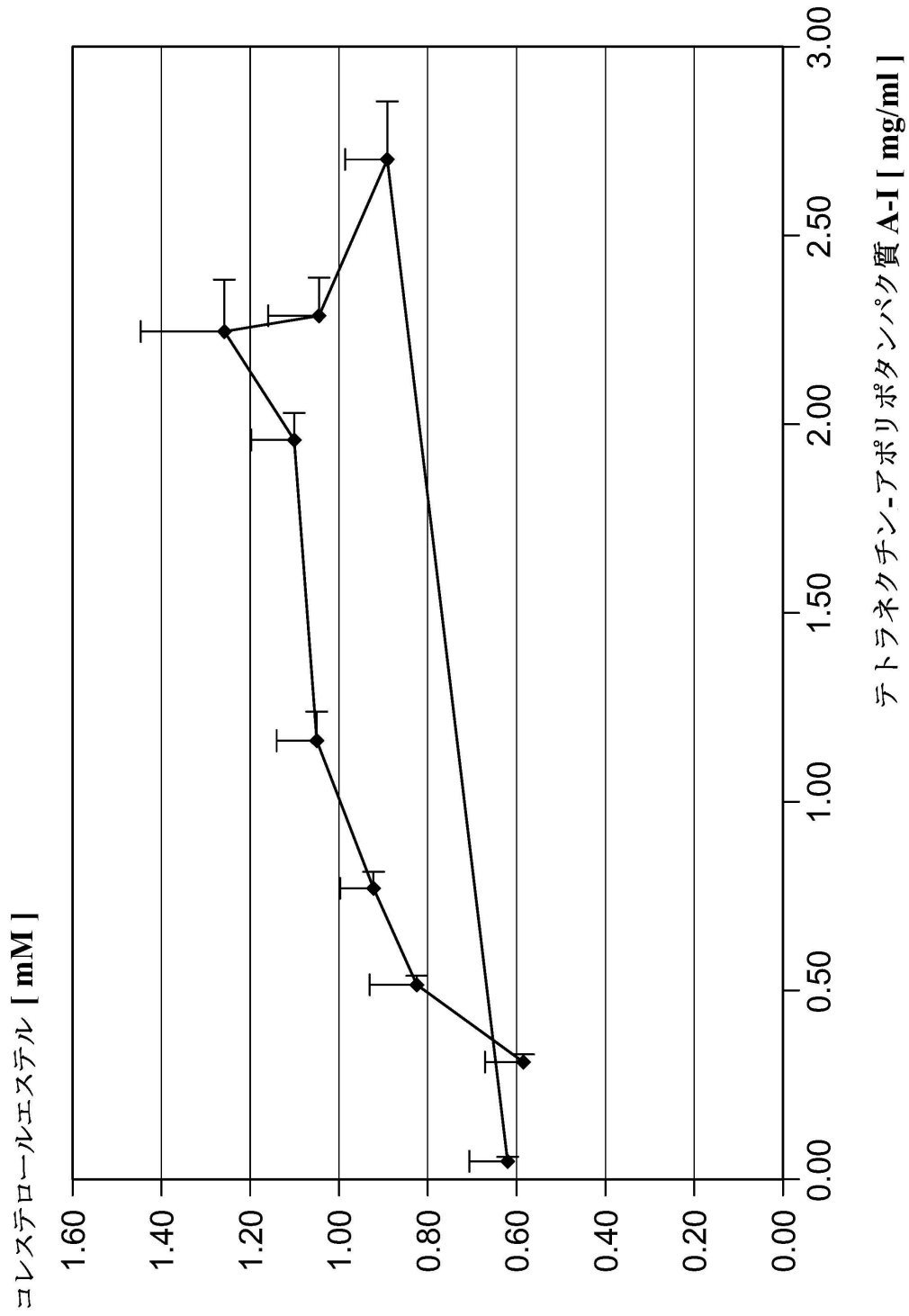


【 図 7 】



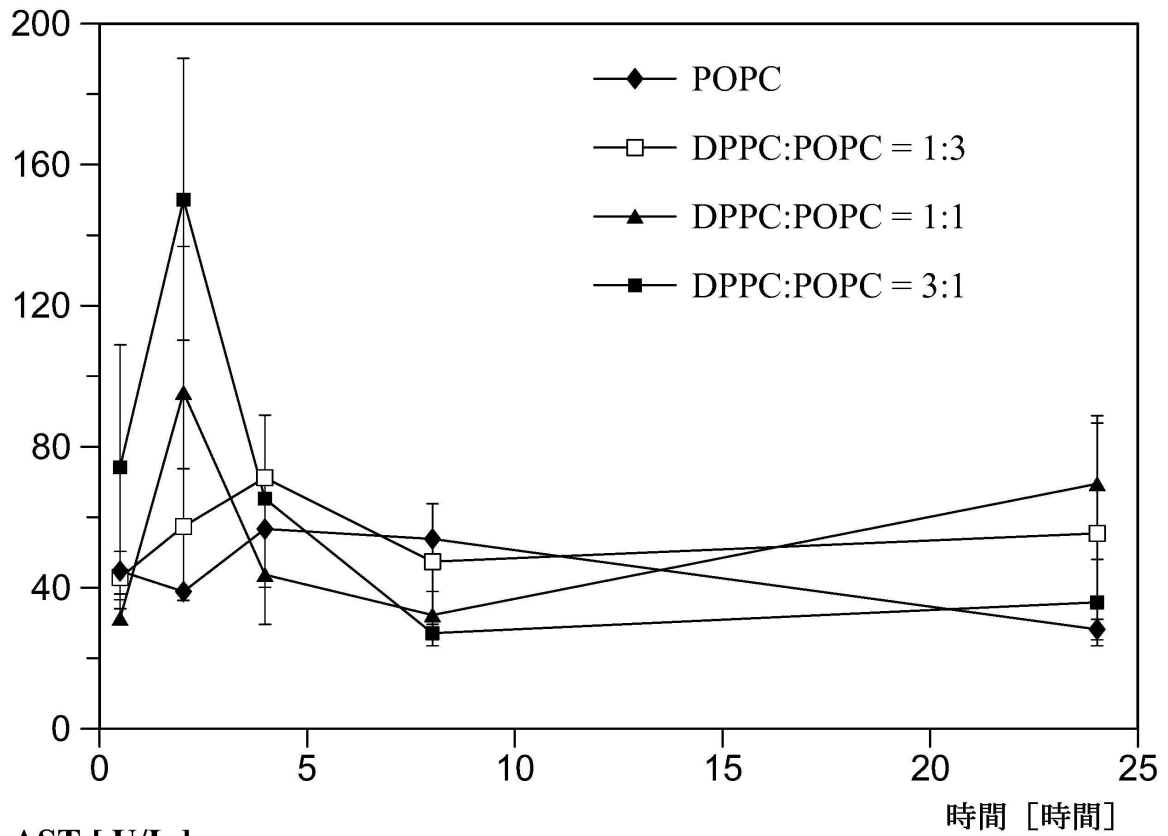


【 図 8 】

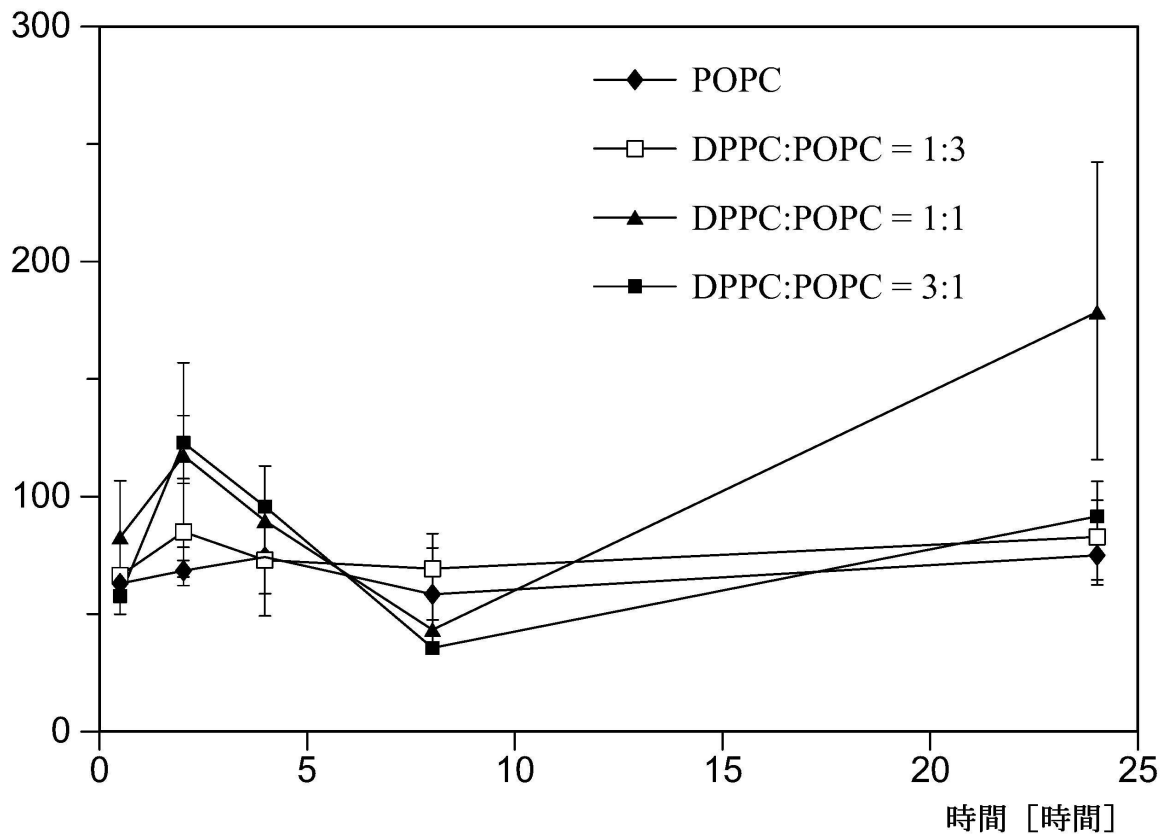


【 図 9 】

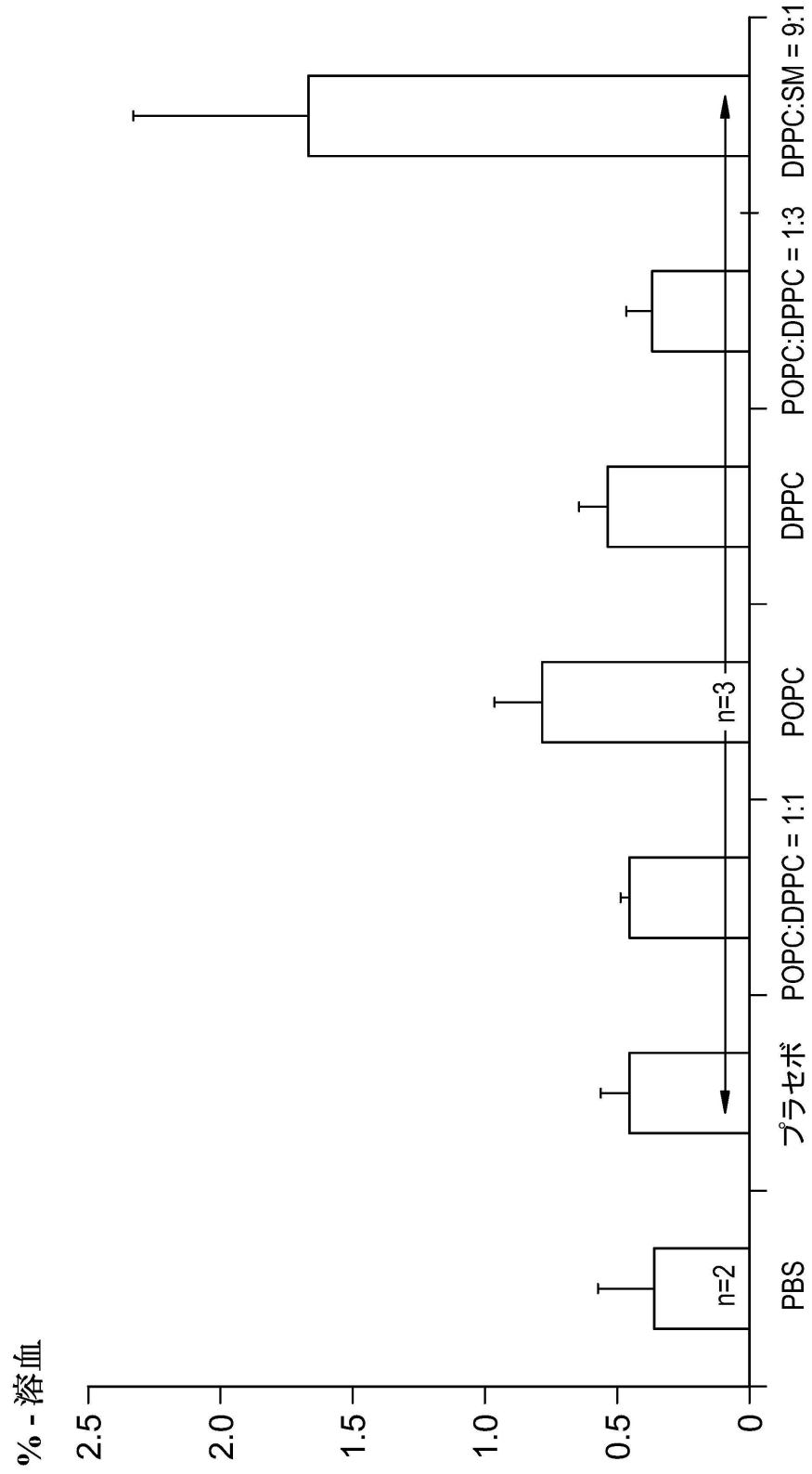
ALT [ U/L ]



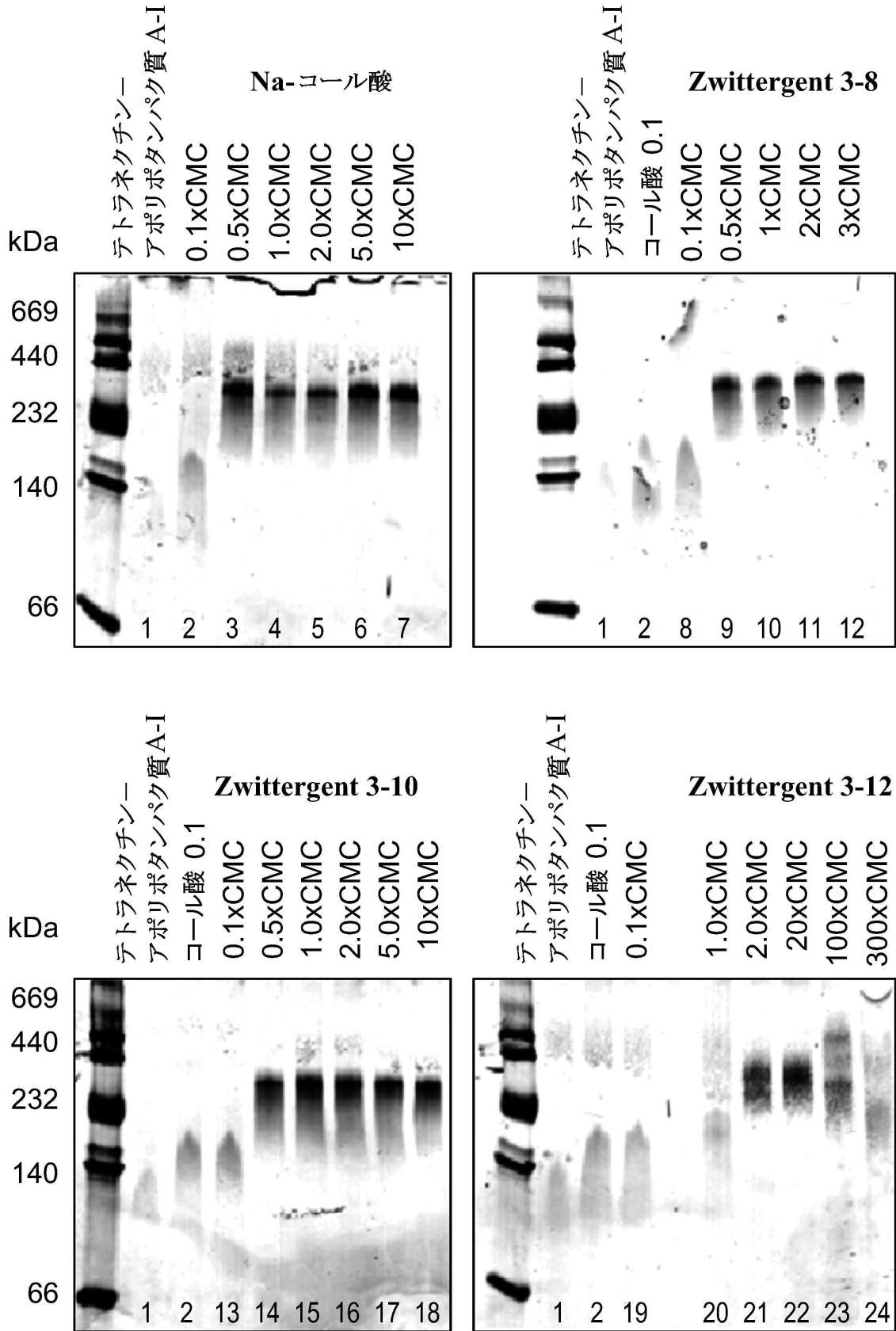
AST [ U/L ]



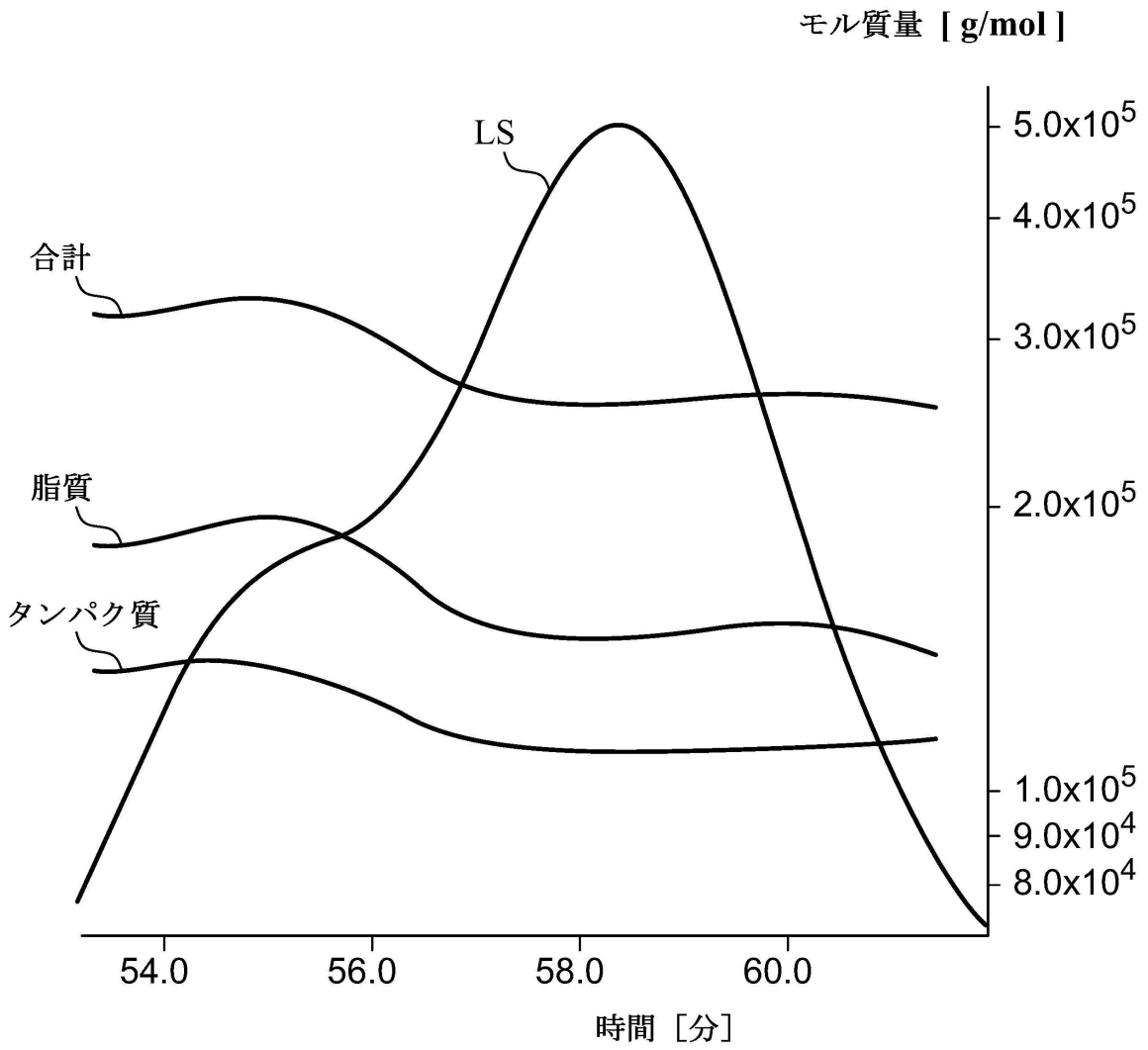
【 図 10 】



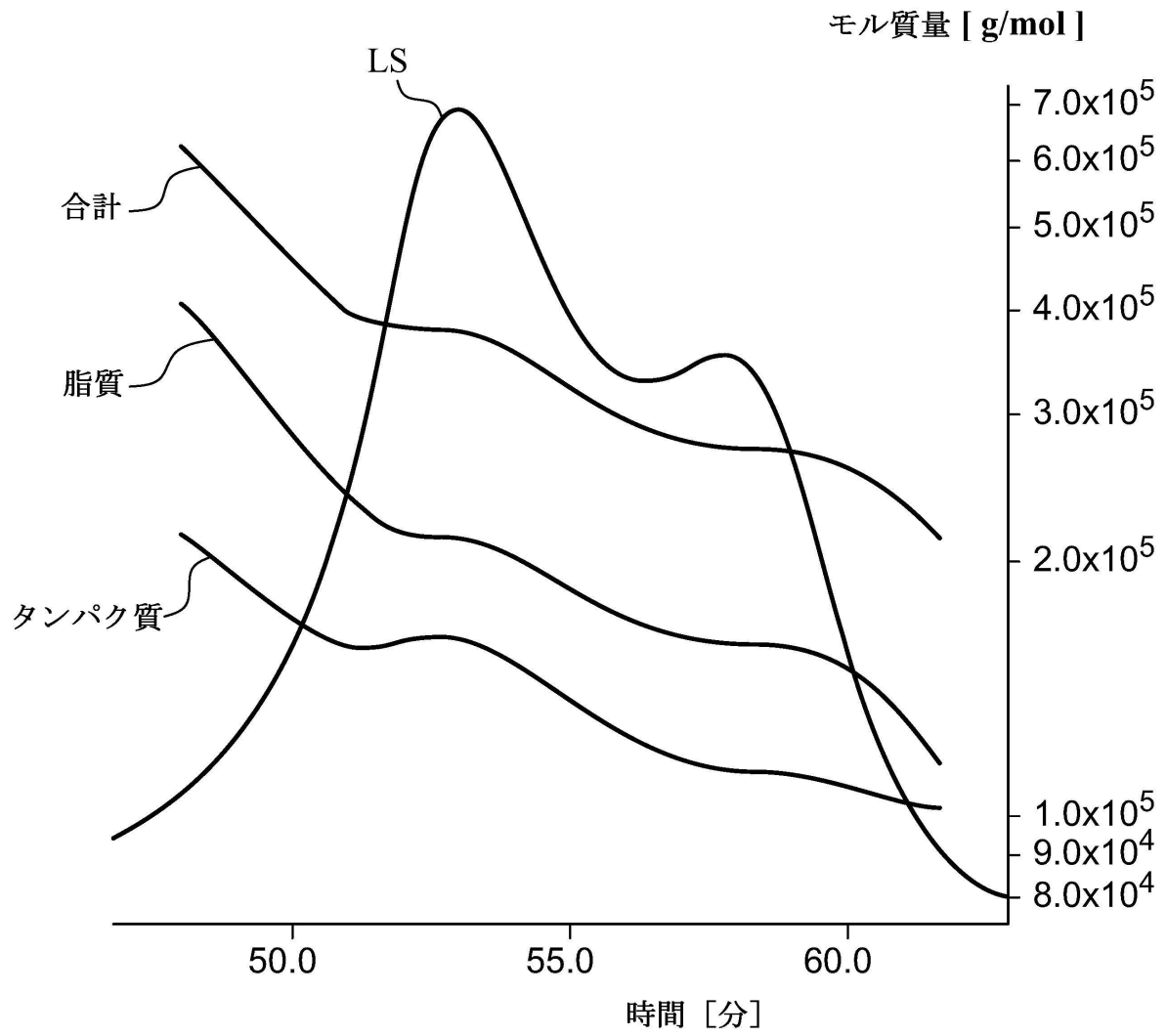
【 図 1 9 】



【図20】

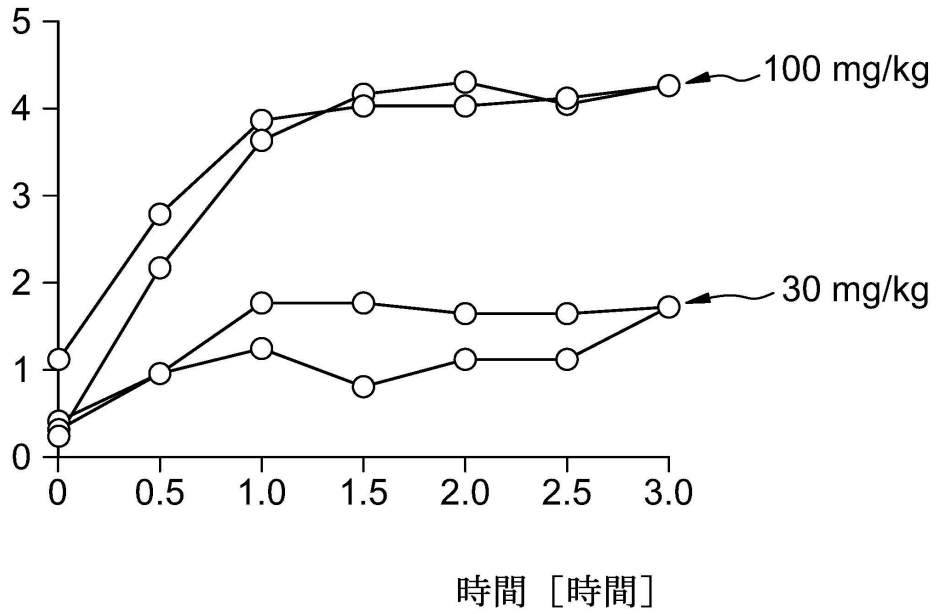


【図 2 1】



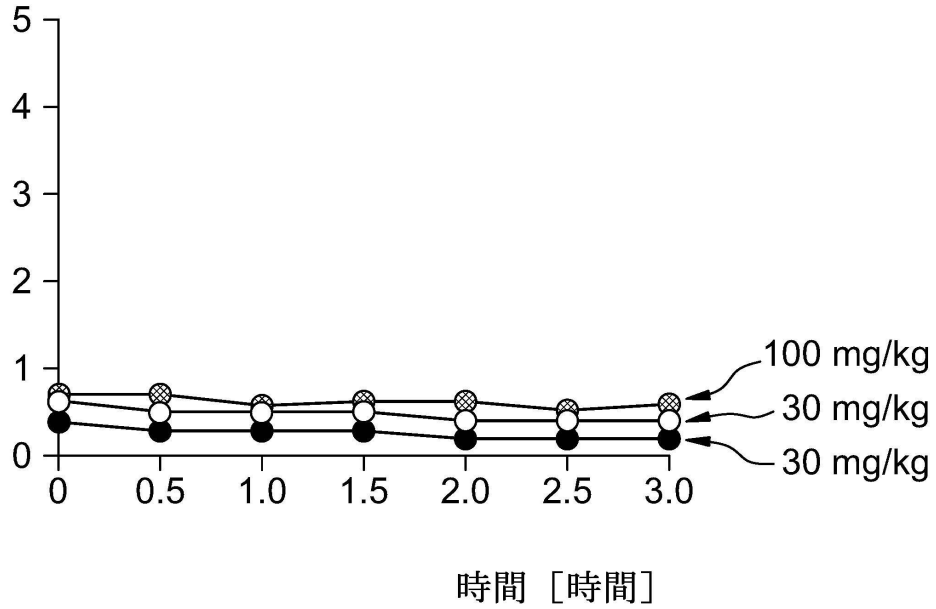
【図23a】

コレステロール排出 [ mmol/l ]

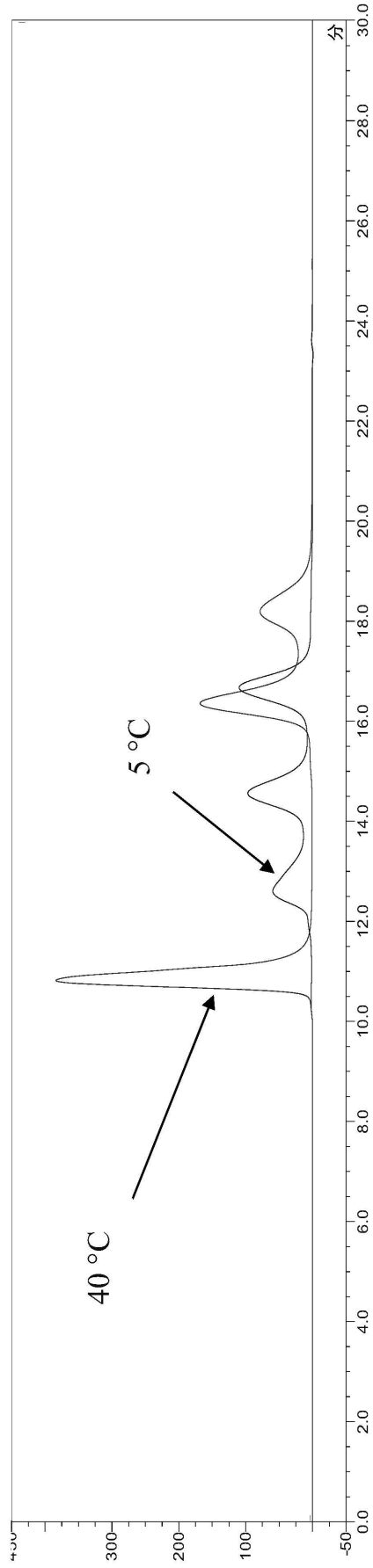


【図23b】

コレステロール排出 [ mmol/l ]

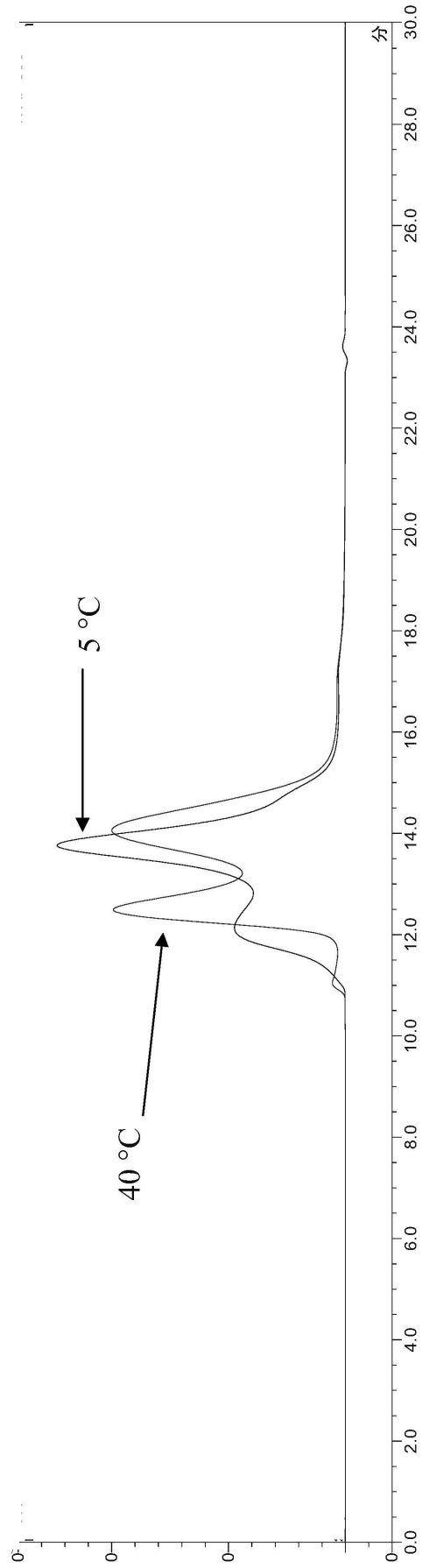


【 2 4 A 】





【 図 2 4 B 】



【 配列表 】

0005860052000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 フィンゲルレ, ユルゲン  
ドイツ国、79400 カンダーン、イム・ヘルプリング 4
- (72)発明者 コーナート, ウルリヒ  
ドイツ国、82392 ハーバツハ、アム・ベルククラベン 7
- (72)発明者 マリー, ジャン-リュク  
フランス国、エフ-68330 ユナング、リュ・ドゥ・ラバトワール 40
- (72)発明者 モール, ジルケ  
スイス国、ツェーハー-4056 バーゼル、ソンマーガッセ 41

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 特表2006-507223(JP,A)  
特表2004-522424(JP,A)  
特開2009-118849(JP,A)  
特表平07-507554(JP,A)  
特表2007-525490(JP,A)  
特表2008-534487(JP,A)  
特表2010-530433(JP,A)  
特開2007-269778(JP,A)  
特表2003-525565(JP,A)  
PROTEIN SCIENCE, 2009年, Vol. 18, pp.921-935  
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1982年, Vol. 257, No. 8, pp.4535-4540

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/775  
A61K 38/00  
A61K 47/24  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)