

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 958**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/127** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06727346 .6**  
96 Fecha de presentación: **23.03.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1871341**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **Complejos de lipoproteínas cargadas y sus usos**

30 Prioridad:  
**24.03.2005 US 665180 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.06.2012**

73 Titular/es:  
**Cerenis Therapeutics Holding SA**  
**265 rue de la Découverte Bât. A**  
**31670 Labege, FR**

72 Inventor/es:  
**DASSEUX, Jean-Louis H.**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 382 958 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Complejos de lipoproteínas cargadas y sus usos.

## 5 2. CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente divulgación proporciona complejos de lipoproteínas cargadas, composiciones farmacéuticas que comprenden los complejos y los procedimientos de uso de los complejos para tratar o evitar una variedad de dolencias y trastornos, entre los que se incluyen dislipidemia y/o las enfermedades y/o dolencias asociadas a la misma.

## 3. ANTECEDENTES

[0002] El colesterol circulante se transporta mediante las lipoproteínas del plasma – partículas complejas compuestas por lípidos y proteínas que transportan lípidos en la sangre. Cuatro tipos principales de partículas de lipoproteínas circulan en plasma y están implicadas en el sistema de transporte de las grasas: quilomicrones, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL). Los quilomicrones constituyen un producto de vida corta de la absorción de las grasas intestinales. VLDL y particularmente, LDL, son responsables de la liberación de colesterol desde el hígado (en donde se sintetiza u obtiene de las fuentes de la dieta), hasta los tejidos extrahepáticos, incluyendo las paredes arteriales. HDL, en contraste, media en el transporte inverso del colesterol (TIC), la eliminación de lípidos del colesterol, en particular desde los tejidos extrahepáticos hasta el hígado, en el que se almacena, cataboliza, elimina o recircula. HDL juega también un papel en la inflamación, transportando lípidos oxidados e interleucina.

[0003] Las partículas de lipoproteínas tienen un núcleo hidrófobo que comprende colesterol (normalmente en la forma de un éster de colesterilo) y triglicéridos. El núcleo está rodeado por un revestimiento superficial que comprende fosfolípidos, colesterol sin esterificar y apolipoproteínas. Las apolipoproteínas median en el transporte de lípidos, y algunas pueden interactuar con las enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos. Se han identificado al menos diez apolipoproteínas, incluyendo: ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V, ApoB, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoE, ApoJ y ApoH. Se encuentran también asociadas con las lipoproteínas otras proteínas tales como LCAT (lecitina: colesterol aciltransferasa), CETP (proteína de transferencia de ésteres de colesterilo), PLTP (proteína de transferencia de fosfolípidos) y PON (paraoxonasa).

[0004] Enfermedades vasculares tales como cardiopatías, enfermedad de las arterias coronarias y aterosclerosis están abrumadoramente relacionadas con elevados niveles de colesterol en suero. Por ejemplo, la aterosclerosis es una enfermedad de progresión lenta caracterizada por la acumulación de colesterol en el interior de la pared arterial. Evidencias convincentes apoyan la teoría de que los lípidos depositados en las lesiones ateroscleróticas se derivan principalmente de las LDL plasmáticas; de esta manera, las LDL se han conocido popularmente como el colesterol “malo”. En contraste, los niveles de HDL en suero están correlacionados inversamente con las cardiopatías. A su vez, altos niveles de HDL séricos se consideran como un factor de riesgo negativo. Se ha teorizado que altos niveles de HDL en plasma no son solo protectores frente a la enfermedad de las arterias coronarias, sino que realmente inducen la regresión de la placa aterosclerótica (véase, por ejemplo, Badimon y col., 1992, *Circulation* 86(Suppl. III): 86 – 94; Dansky y Fisher, 1999, *Circulation* 100: 1762 – 63; Tangirala y col., 1999, *Circulation* 100(17): 1816 – 22; Fan y col., 1999, *Atherosclerosis* 147(1): 139 – 45; Deckert y col., 1999, *Circulation* 100(11): 1230 – 35; Boisvert y col., 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(3): 525 – 30; Benoit y col., 1999, *Circulation* 99 (1): 105 – 10; Holvoet y col., 1998, *J. Clin. Invest.* 102(2): 379 – 85; Duverger y col., 1996, *Circulation* 94(4): 713 – 17; Miyazaki y col., 1995, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15(11): 1882 – 88; Mezdour y col., 1995, *Atherosclerosis* 113(2): 237 – 46; Liu y col., 1994, *J. Lipid Res.* 35(12): 2263 – 67; Plump y col., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91(20): 9607 – 11; Paszty y col., 1994, *J. Clin. Invest.* 94(2): 899 – 903; She y col., 1992, *Chin. Med. J. (Engl.)* 105(5): 369 – 73; Rubin y col., 1991, *Nature* 353(6341): 265 – 67; She y col., 1990, *Ann. NY Acad. Sci.* 598: 339 – 51; Ran, 1989, *Chung Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih* (traducido también como: *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*) 18(4): 257 – 61; Quezado y col., 1995, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272 (2): 604 – 11; Duverger y col., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12): 1424 – 29; Kopfler y col., 1994, *Circulation*; 90 (3): 1319 – 27; Miller y col., 1985, *Nature* 314(6006): 109 – 11; Ha y col., 1992, *Biochim. Biophys. Acta* 1125(2): 223 – 29; Beitz y col., 1992, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 47(2): 149 – 52). Como consecuencia, los HDL se han conocido popularmente como el colesterol “bueno”, (véase, por ejemplo, Zhang, y col., 2003 *Circulation* 108: 661 – 663).

[0005] El papel protector de HDL se ha confirmado en numerosos estudios (por ejemplo, Miller et al., 1977, *Lancet* 1 (8019): 965 – 68; Whyne y col., 1981, *Atherosclerosis* 39: 411 – 19). En estos estudios, niveles elevados de LDL parecen estar asociados con un riesgo cardiovascular creciente, mientras que niveles altos de HDL parecen conferir protección cardiovascular. Los estudios in vivo han demostrado además el papel protector de HDL mostrando que infusiones de HDL en conejos pueden impedir el desarrollo de lesiones arteriales inducidas por el colesterol (Badimon y col., 1989, *Lab. Invest.* 60: 455 – 61) y/o inducen su regresión (Badimon et al., 1990, *J. Clin.*

Invest. 85: 1234 – 41).

### 3.1 Transporte inverso de Colesterol, HDL y Apolipoproteína A-I

5 **[0006]** La ruta del transporte inverso del colesterol (TIC) actúa para eliminar el colesterol de los tejidos más extrahepáticos y es crucial para mantener la estructura y la función de la mayoría de las células en el cuerpo. La TIC consiste principalmente en tres etapas: (a) la salida de colesterol, es decir, la eliminación inicial de colesterol procedente de diversos grupos de células periféricas; (b) la esterificación del colesterol por la acción de la lecitina: colesterol aciltransferasa (LCAT), evitando una reentrada en las células del colesterol que ha salido previamente; y  
10 (c) captación del colesterol HDL y de los ésteres de colesterol en los hepatocitos para la hidrólisis, a continuación la recirculación, el almacenamiento, la excreción en la bilis o el catabolismo en los ácidos biliares.

**[0007]** LCAT, la enzima clave en el TIC, se produce en el hígado y circula en el plasma asociada a la fracción de HDL. LCAT convierte el colesterol procedente de las células en ésteres de colesterol, que están secuestrados en HDL destinados a la eliminación (véase Jonas 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1529(1-3): 245 – 56). La proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) contribuyen a remodelar adicionalmente la población de HDL circulante. CETP mueve los ésteres de colesterol fabricados por LCAT a otras lipoproteínas, particularmente a las lipoproteínas que comprenden ApoB, tales como VLDL y LDL. PLTP suministra lecitina a HDL. Los triglicéridos HDL están catabolizados por la triglicérido lipasa hepática  
15 extracelular, y el colesterol de la lipoproteína se elimina por diversos mecanismos vía hígado.

**[0008]** Las características funcionales de las partículas de HDL vienen determinadas principalmente por sus componentes principales de apolipoproteínas tales como ApoA-I y ApoA-II. Se han observado también cantidades menores de ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoA-IV, ApoE, ApoJ asociadas con HDL. HDL existe en una amplia  
25 variedad de tamaños diferentes y mezclas diferentes de los constituyentes anteriormente mencionados, dependiendo del estado de remodelación durante la cascada o ruta metabólica del TIC.

**[0009]** Cada partícula de HDL comprende normalmente al menos 1 molécula, y usualmente de dos a 4 moléculas, de ApoA-I. Las partículas de HDL pueden comprender también solo ApoE (partículas gamma-LpE), que se sabe que son también responsables de la salida del colesterol, tal como describe el Prof. Gerd Assmann (véase, por ejemplo, von Eckardstein y col., 1994, *Curr Opin Lipidol.* 5(6): 404 – 16). ApoA-I se sintetiza por el hígado y el intestino delgado como preapolipoproteína A-I, que se segrega como preapolipoproteína A-I (proApoA-I) y se escinde rápidamente para generar la forma plasmática de ApoA-I, una única cadena polipeptídica de 243 aminoácidos (Brewer y col., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 623 – 30). PreproApoA-I que se inyecta  
30 directamente de manera experimental en el torrente sanguíneo se escinde también en la forma plasmática de ApoA-I (Klon y col., 2000, *Biophys. J.* 79(3): 1679 – 85; Segrest y col., 2000, *Curr. Opin. Lipidol.* 11(2): 105 – 15; Segrest y col., 1999, *J. Biol. Chem.* 274 (45): 31755 – 58).

**[0010]** ApoA-I comprende de 6 a 8 alfa hélices diferentes de 22 aminoácidos o repeticiones funcionales separadas por un resto enlazador que es frecuentemente prolina. Las unidades de repetición se encuentran en una conformación helicoidal anfifática (Segrest y col., 1974, *FEBS Lett.* 38: 247 – 53) y confieren las principales actividades biológicas de ApoA-I, es decir, la unión lipídica y la activación de la colesterol aciltransferasa (LCAT).  
40

**[0011]** ApoA-I forma tres tipos de complejos estables con lípidos: complejos pequeños pobres en lípidos denominados como pre-beta-1 HDL; partículas discoidales aplanadas que comprenden lípidos polares (fosfolípidos y colesterol) denominados como pre-beta-2 HDL; y partículas esféricas, que comprenden lípidos polares y no polares, denominados como HDL esférico o maduro (HDL<sub>3</sub> y HDL<sub>2</sub>). La mayor parte del HDL en la población circulante comprende ApoA-I y ApoA-II (la fracción "AI/AII-HDL"). Sin embargo, la fracción de HDL que comprende solo ApoA-I (la "fracción AI-HDL" parece ser más eficaz en el TIC. Algunos estudios epidemiológicos apoyan la hipótesis de que la fracción Apo-AI-HDL es antiaterogénica (Parra y col., 1992, *Arterioscler. Thromb.* 12: 701 – 07; Decossin y col., 1997, *Eur. J. Clin. Invest.* 27: 299 – 307).  
45

**[0012]** HDL se prepara a partir de diversas poblaciones de partículas que tienen diferentes tamaños, composición de lípidos y composición de lipoproteínas. Se pueden separar de acuerdo a sus propiedades, que incluyen su densidad hidratada, la composición de apolipoproteínas y las características de carga. Por ejemplo, los pre-beta-HDL se caracterizan por una carga superficial más baja que la de del alfa-HDL maduro. Debido a esta diferencia de carga pre-beta-HDL y alfa-HDL maduro tienen diferentes movilidades electroforéticas en gel de agarosa (David y col., 1994, *J. Biol. Chem.* 269(12): 8959 – 8965).  
55

**[0013]** El metabolismo de pre-beta-HDL y de alfa-HDL maduro también difiere. Pre-beta-HDL tiene dos destinos metabólicos: bien la eliminación del plasma y el catabolismo por el riñón o bien la remodelación a HDL de dimensión media que se degrada preferentemente en el hígado (Lee y col., 2004, *J. Lipid Res.* 45(4): 716 – 728).  
60

**[0014]** Aunque el mecanismo de transferencia del colesterol desde la superficie celular (es decir, la salida del

colesterol) es desconocido, se cree que el complejo pobre en lípidos pre-beta-1 HDL es el aceptor preferido del colesterol transferido desde el tejido periférico implicado en el TIC (véanse Davidson y col., 1994, *J. Biol. Chem.* 269: 22975 – 82; Bielicki y col., 1992, *J. Lipid Res.* 33: 1699 – 1709; Rothblat y col., 1992, *J. Lipid Res.* 33: 1091 – 97; y Kawano y col., 1993, *Biochemistry* 32: 5025 – 28; Kawano y col., 1997, *Biochemistry* 36: 9816 – 25). Durante este procedimiento de reclutamiento del colesterol de la superficie celular, pre-beta-1 HDL se convierte rápidamente a pre-beta-2 HDL. PLTP puede aumentar la velocidad de formación del disco de pre-beta-2 HDL, pero los datos indican un papel de PLTP que está ausente en TIC. LCAT reacciona preferentemente con el HDL discoidal, pequeño (pre-beta) y esférico (es decir, maduro), transfiriendo el grupo 2-acilo de la lecitina u otros fosfolípidos a los tres restos hidroxilo libres del colesterol para generar ésteres de colesterol (retenidos en el HDL) y lisolecitina. La reacción de LCAT requiere ApoA-I como activador; es decir, ApoA-I es el cofactor natural de la LCAT. La conversión del colesterol secuestrado en el HDL a su éster evita la reentrada del colesterol en la célula, siendo el resultado neto que el colesterol se elimina de la célula.

**[0015]** Los ésteres de colesterol que se encuentran en las partículas de HDL maduro en la fracción ApoA-I-HDL (es decir, que comprende ApoA-I y sin ApoA-D) se eliminan en el hígado y se procesan en la bilis más eficazmente que los derivados del HDL que comprende ApoA-I y ApoA-II (la fracción AI/AII-HDL). Esto puede ser debido, en parte, a la unión más eficaz de ApoA-I-HDL con la membrana del hepatocito. Se ha teorizado con la existencia de un receptor de HDL y se ha identificado un receptor secuestrante de clase B, tipo I (SR-BI) como un receptor de HDL (Acton y col., 1996, *Science* 271: 518 – 20; Xu y col., 1997, *Lipid Res.* 38: 1289 – 98). SR-BI se expresa con mayor abundancia en tejidos esteroideogénicos (por ejemplo, los adrenales), y en el hígado (Landschulz y col., 1996, *J. Clin. Invest.* 98: 984 – 95; Rigotti y col., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 33545 – 49). Para una revisión de los receptores de HDL, véase Broutin y col., 1988, *Anal. Biol. Chem.* 46: 16 – 23.

**[0016]** La lipidación inicial por una AI transportadora de un casete de unión a ATP parece ser crítica para la formación del HDL plasmático y para la capacidad de las partículas pre-beta-HDL de salida del colesterol (Lee y Parks, 2005, *Curr. Opin. Lipidol.* 16(1): 19-25). De acuerdo con estos autores, esta lipidación inicial permite al pre-beta-HDL funcionar más eficazmente como aceptor del colesterol y evita que ApoA-I se asocie rápidamente con las partículas de HDL plasmático preexistentes, dando como resultado una mayor disponibilidad de partículas pre-beta-HDL para la salida del colesterol.

**[0017]** La CETP puede jugar también un papel en el TIC. Los cambios en la actividad de la CETP o sus aceptores, VLDL y LDL, juegan un papel en la “remodelación” de la población de HDL. Por ejemplo, en ausencia de CETP, los HDL se convierten en partículas más grandes que no se aclaran. (Para revisiones del TIC y de los HDL, véanse Fielding y Fielding, 1995, *J. Lipid Res.* 36: 211 – 28; Barrans y col., 1996, *Biochem. Biophys. Acta* 1300: 73 – 85; Hirano y col., 1997, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17(6): 1053 – 59).

**[0018]** El HDL juega también un papel en el transporte inverso de otros lípidos y moléculas apolares, y en la detoxificación, es decir, el transporte de lípidos desde células órganos y tejidos al hígado para el catabolismo y la excreción. Dichos lípidos incluyen esfingomielina (SM), lípidos oxidados, y lisofosfatidilcolina. Por ejemplo, Robins y Fasulo (1997, *J. Clin. Invest.* 99: 380 – 84) han demostrado que los HDL estimulan el transporte de esteroides vegetales por el hígado en las secreciones biliares.

**[0019]** El componente principal del HDL, ApoA-I, puede asociarse con la EM in vitro. Cuando ApoA-I se reconstituye in vitro con SM de cerebro bovino (BBSM), se produce una velocidad máxima de reconstitución a 28 °C, aproximándose la temperatura a la temperatura de transición de fase de la BBSM (Swaney, 1983, *J. Biol. Chem.* 258(2), 1254 – 59). A relaciones BBSM: ApoA-I de 7,5: 1 o menos (p/p), se forma una única partícula de HDL homogéneo reconstituido que comprende tres moléculas de ApoA-I por partícula y que tiene una relación molar BBSM: ApoA-I de 360: 1. Esta aparece en el microscopio electrónico como un complejo discoidal similar al obtenido mediante la recombinación de ApoA-I con fosfatidilcolina a relaciones elevadas de fosfolípido/proteína. A relaciones BBSM: ApoA-I de 15: 1 (p/p), sin embargo, se forman complejos discoidales con un diámetro más grande que tienen una mayor relación molar fosfolípido: proteína (535: 1). Estos complejos son significativamente más grandes, más estables, y más resistentes a la desnaturalización que los complejos ApoA-I formados con fosfatidilcolina.

**[0020]** La esfingomielina (SM) es elevada en los aceptores tempranos del colesterol (lipoproteína que comprende pre-beta-HDL y ApoE gamma-migrante), sugiriendo que la SM puede potenciar la capacidad de estas partículas de promover la salida del colesterol (Dass y Jessup, 2000, *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 731 – 61; Huang y col., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1834 – 38; Fielding y Fielding 1995, *J. Lipid Res.* 36: 211 – 28).

#### Mecanismo protector del HDL y ApoA-I

**[0021]** Estudios recientes del(de los) mecanismo(s) protector(es) del HDL se han centrado en la apolipoproteína A-I (ApoA-I), el componente principal del HDL. Los niveles plasmáticos elevados de ApoA-I están asociados con la ausencia o la reducción de lesiones coronarias (Maciejko y col., 1983, *N. Engl. J. Med.* 309: 385 – 89; Sedlis y col., 1986, *Circulation* 73: 978 – 84).

**[0022]** La infusión de ApoA-I o de HDL en animales experimentales ejerce cambios bioquímicos significativos así como reduce la extensión y la gravedad de las lesiones ateroscleróticas. Tras un informe inicial de Maciejko y Mao (1982, *Arteriosclerosis* 2: 407a), Badimon y col., (1989, *Lab. Invest.* 60: 455 – 61; 1989, *J. Clin. Invest.* 85: 1234 – 41) encontraron que podrían reducir significativamente la extensión de las lesiones ateroscleróticas (reducción del 45 %) y su contenido en ésteres de colesterol (reducción del 58,5 %) en conejos alimentados con colesterol, infundiendo HDL, ( $d = 1,063 - 1,325$  g/ml). Estos autores han encontrado también que las infusiones de HDL conducen a una regresión de casi el 50 % de las lesiones establecidas. Esper y col. (1987, *Arteriosclerosis* 7: 523a) han demostrado que las infusiones de HDL pueden cambiar de manera marcada la composición de la lipoproteína plasmática de conejos Watanabe con hipercolesterolemia heredada, que desarrolla lesiones arteriales tempranas. En estos conejos, las infusiones de HDL pueden ser más del doble de la relación entre el HDL protector y el LDL aterogénico.

**[0023]** El potencial del HDL de evitar la enfermedad en modelos animales ha sido además infravalorado por la observación de que ApoA-I puede ejercer una actividad fibrinolítica in vitro (Saku y col., 1985, *Thromb. Res.* 39: 1 – 8). Ronneberger (1987, Xº Int. Congr. Pharmacol., Sydney, 990) demostrando que ApoA-I puede aumentar la fibrinólisis en perros Beagle y macacos. Se puede señalar una actividad similar in vitro en plasma humano. Ronneberger fue capaz de confirmar una reducción de la deposición de lípidos y la formación de placa arterial en animales tratados con ApoA-I.

**[0024]** Los estudios in vitro indican que los complejos de ApoA-I y lecitina pueden promover la salida de colesterol libre de células cultivadas de la musculatura lisa arterial (Stein y col., 1975, *Biochem. Biophys. Acta*, 380: 106 – 18). Mediante este mecanismo, el HDL puede reducir también la proliferación de estas células (Yoshida y col., 1984, *Exp. Mol. Pathol.* 41: 258 – 66).

**[0025]** Se ha demostrado también que el tratamiento mediante infusión con HDL que comprende los péptidos ApoA-I o ApoA-I mimético regula los niveles plasmáticos de HDL mediante el transportador ABC1, lo que conduce a la eficacia en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular (véase, por ejemplo, Brewer y col., 2004, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 1755 – 1760).

**[0026]** Se han aislado dos mutaciones de ApoA-I que se producen naturalmente en las que un resto arginina está mutado a cisteína. En la apolipoproteína A-I<sub>Milano</sub> (ApoA-I<sub>M</sub>), esta sustitución se produce en el resto 173, mientras que en la apolipoproteína A-I<sub>Paris</sub>, (ApoA-I<sub>P</sub>), esta sustitución se produce en el resto 151 (Franceschini y col., 1980, *J. Clin. Invest.* 66: 892 – 900; Weisgraber y col., 1983, *J. Biol. Chem.* 258: 2508 – 13; Bruckert y col., 1997, *Atherosclerosis* 128: 121 – 28; Daum y col., 1999, *J. Mol. Med.* 77: 614 – 22; Klön y col., 2000, *Biophys. J.* 79(3): 1679 – 85). Las partículas de HDL reconstituido que comprenden homodímeros unidos a disulfuro tanto de ApoA-I<sub>M</sub> como de ApoA-I<sub>P</sub> son similares en su capacidad de aclarar emulsiones de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y su capacidad para promover la salida del colesterol (Calabresi y col., 1997b, *Biochemistry* 36: 12428 – 33; Franceschini y col., 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 1257 – 62; Daum y col., 1999, *J. Mol. Med.* 77: 614 – 22). En ambas mutaciones, los individuos heterocigóticos tienen niveles decrecientes de HDL, pero paradójicamente, tienen un reducido riesgo de aterosclerosis (Franceschini y col., 1980, *J. Clin. Invest.* 66: 892 – 900; Weisgraber y col., 1983, *J. Biol. Chem.* 258: 2508 – 13; Bruckert y col., 1997, *Atherosclerosis* 128: 121 – 28). Las partículas de HDL reconstituido que comprenden cualquier variante son capaces de la activación de LCAT, aunque con eficacia decreciente cuando se las compara con las partículas de HDL reconstituido que comprende la ApoA-I natural (Calabresi y col., 1997a, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232: 345 – 49; Daum y col., 1999, *J. Mol. Med.* 77: 614 – 22).

**[0027]** La mutación ApoA-I<sub>M</sub> se transmite como un rasgo dominante autosómico; se han identificado ocho generaciones de portadores en una familia (Gualandri y col., 1984, *Am. J. Hum. Genet.* 37: 1083 – 97). El estado de un portador individual de ApoA-I<sub>M</sub> se caracteriza por una notable reducción en el nivel de colesterol HDL. A pesar de esto, los portadores individuales no muestran aparentemente ningún riesgo creciente de enfermedad arterial. En vez de esto, mediante el examen de los registros genealógicos, parece que estos sujetos pueden estar “protegidos” de la aterosclerosis (Sirtori y col., 2001, *Circulation*, 103: 1949 – 1954; Roma y col., 1993, *J. Clin. Invest.* 91(4): 1445 – 520).

**[0028]** El mecanismo del posible efecto protector de ApoA-I<sub>M</sub> en portadores de la mutación parece estar relacionado con una modificación de la estructura del ApoA-I<sub>M</sub> mutante, con pérdida de una alfa-hélice y una creciente exposición de restos hidrófobos (Franceschini y col., 1985, *J. Biol. Chem.* 260: 1632 – 35). La pérdida de la estructura ajustada de las múltiples alfa-hélices conduce a una creciente flexibilidad de la molécula, que se asocia más fácilmente con lípidos, en comparación con la ApoA-I normal. Además, los complejos apolipoproteína-lípido son más susceptibles a la desnaturalización, sugiriendo de esta manera que la liberación del lípido está también mejorada en el caso del mutante.

**[0029]** Bielicki, y col. (1997, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (9): 1637 – 43) han demostrado que ApoA-I<sub>M</sub> tiene

una capacidad limitada para reclutar el colesterol de la membrana en comparación con la ApoA-I natural. Además, el HDL nascente formado por la asociación de ApoA-<sub>IM</sub> con los lípidos de membrana fue predominantemente de partículas de 7,4 nm más bien que de complejos más grandes de 9 y 11 nm formados con ApoA-I natural. Estas observaciones indican que la sustitución de Arg<sub>173</sub>→Cys<sub>173</sub> en la secuencia principal de ApoA-I interfirieron con el proceso normal de reclutamiento del colesterol celular y del ensamblaje del HDL nascente. La mutación está asociada aparentemente con una eficacia decreciente en la eliminación del colesterol de las células. Sus propiedades antiaterogénicas pueden por tanto no estar relacionadas con el TIC.

**[0030]** El cambio estructural más sobresaliente atribuido a la sustitución Arg<sub>173</sub>→Cys<sub>173</sub> es la dimerización de ApoA-<sub>IM</sub> (Bielicki y col., 1997, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (9): 1637 – 43). ApoA-<sub>IM</sub> puede formar homodímeros consigo mismo y heterodímeros con ApoA-II. Los estudios de fracciones sanguíneas que comprenden una mezcla de apolipoproteínas indican que la presencia de dímeros y complejos en la circulación puede ser responsable de una eliminación creciente de la semivida de las apolipoproteínas. Dicha eliminación creciente de la semivida se ha observado en estudios clínicos de portadores de la mutación (Gregg y col., 1988, *NATO ARW on Human Apolipoprotein Mutants: From Gene Structure to Phenotypic Expression*, Limone S G). Otros estudios indican que los dímeros de ApoA-<sub>IM</sub> (ApoA-<sub>IM</sub> / ApoA-<sub>IM</sub>) actúa como un factor inhibidor en la interconversión de las partículas del HDL in vitro (Franceschini et al., 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 12224 – 31).

### 3.3 Tratamientos actuales para la dislipidemia y trastornos relacionados

**[0031]** Los trastornos dislipidémicos son enfermedades asociadas con elevados niveles de colesterol y triglicéridos en suero y relaciones decrecientes de HDL: LDL en suero, e incluyen hiperlipidemia especialmente hipercolesterolemia, cardiopatía, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedades vasculares y perivasculares, y enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis. Se incluyen también los síndromes asociados con aterosclerosis tales como cojera intermitente, producida por insuficiencia arterial. Están disponibles actualmente numerosos tratamientos para disminuir los elevados niveles de colesterol y triglicéridos en suero asociados con trastornos dislipidémicos. Sin embargo, cada uno tiene sus propios inconvenientes y limitaciones en términos de eficacia, efectos secundarios y cualificación de la población de pacientes.

**[0032]** Las resinas de unión a ácidos biliares son un tipo de fármacos que interrumpen la recirculación de los ácidos biliares desde el intestino al hígado, por ejemplo, colestiramina (Questran Light®, Bristol-Myers Squibb), y clorhidrato de colestipol (Colestid®, The Upjohn Company). Cuando se toman por vía oral, estas resinas cargadas positivamente se unen a los ácidos biliares cargados negativamente en el intestino. Debido a que las resinas no se pueden absorber desde el intestino, se excretan transportando con ellas los ácidos biliares. El uso de dichas resinas disminuye solo, como máximo, los niveles de colesterol en suero en aproximadamente un 20 % y está asociado con efectos secundarios gastrointestinales, incluidos estreñimiento y algunas deficiencias vitamínicas. Además, debido a que las resinas se unen a otros fármacos, se pueden tomar otras medicaciones orales al menos una hora antes o de cuatro a seis horas después de la ingestión de la resina; complicando, por tanto, las pautas terapéuticas para el corazón del paciente.

**[0033]** Las estatinas son agentes disminuidores del colesterol que bloquean la síntesis del colesterol inhibiendo la HMGCoA reductasa, la enzima clave implicada en la ruta biosintética del colesterol. Las estatinas, por ejemplo, lovastatina (Mevacor®), simvastatina (Zocor®), pravastatina (Pravachol®), fluvastatina (Lescol®) y atorvastatina (Lipitor®), se usan algunas veces en combinación con las resinas de unión a ácidos biliares. Las estatinas reducen significativamente los niveles de colesterol en suero y de LDL en suero, y retrasan la progresión de la aterosclerosis coronaria. Sin embargo, los niveles de colesterol HDL en suero aumentan solo moderadamente. El mecanismo del efecto de disminución del LDL puede implicar la reducción de la concentración del VLDL y la inducción de la expresión celular del receptor del LDL, lo que conduce a una reducida producción y/o un mayor catabolismo de las LDL. Efectos secundarios, que incluyen disfunción hepática y renal se asocian con el uso de estos fármacos (The Physicians Desk Reference, 56ª Ed., 2002) Medical Economics).

**[0034]** La niacina (ácido nicotínico) es un complejo de vitamina B soluble en agua que se utiliza como un suplemento de la dieta y agente antihiperlipidémico. La niacina disminuye la producción de VLDL y es eficaz en la disminución del LDL. En algunos casos, se usa en combinación con resinas de unión de ácidos biliares. La niacina puede aumentar el HDL cuando se usa en dosis adecuadas, sin embargo, su utilidad está limitada por importantes efectos secundarios cuando se usa a las mencionadas dosis elevadas. Niaspan® es una forma de niacina de liberación extendida que produce menos efectos secundarios que la niacina pura. Niacina/Lovastatina (Nicostatin®) es una formulación que contiene niacina y lovastatina y combina los beneficios de cada fármaco.

**[0035]** Los fibratos son un tipo de fármacos disminuidores de lípidos usados para tratar diversas formas de hiperlipidemia (es decir, elevados niveles de triglicéridos en suero) que puede estar también asociada con hipercolesterolemia. Los fibratos parecen reducir la fracción de VLDL y aumentan modestamente el HDL—sin embargo, el efecto de estos fármacos sobre el colesterol en suero es variable. En los Estados Unidos, los fibratos tales como clofibrato (Atromid-S®), fenofibrato (Tricor®) y bezafibrato (Bezalip®) se han aprobado para el uso como

fármacos antilipidémicos, pero no han recibido la aprobación como agentes para la hipercolesterolemia. Por ejemplo, clofibrato es un agente antilipidémico que actúa (mediante un mecanismo desconocido) para disminuir los triglicéridos en suero reduciendo la fracción de VLDL. Aunque se puede reducir el colesterol en suero en algunas subpoblaciones de pacientes la respuesta bioquímica al fármaco es variable, y no es siempre posible predecir qué pacientes obtendrán resultados favorables. Atromid-S® no se ha demostrado que sea eficaz para la prevención de cardiopatías. El fármaco relacionado química y farmacológicamente, gemfibrozil (Lopid®) es un agente regulador de lípidos que disminuye moderadamente los triglicéridos y el colesterol VLDL en suero, y aumenta moderadamente el colesterol HDL-las subfracciones HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub> así como ApoA-I y A-II (es decir, la fracción AI/AMT-HDL). Sin embargo, la respuesta de los lípidos es heterogénea, especialmente entre diferentes poblaciones de pacientes. Además, aunque se observó la prevención de cardiopatías en pacientes varones entre 40-55 años sin historial o síntomas de cardiopatía existente, no está claro en qué extensión se pueden extrapolar estos hallazgos a otras poblaciones de pacientes (por ejemplo, mujeres, varones más mayores y más jóvenes). En vez de esto, no se observó eficacia en pacientes con cardiopatía establecida. Se asocian graves efectos secundarios con el uso de fibratos que incluyen toxicidad tal como neoplasia (especialmente cáncer gastrointestinal), enfermedad de la vejiga biliar y una creciente incidencia en la mortalidad no coronaria.

**[0036]** Se puede considerar el tratamiento de sustitución de estrógeno por vía oral para la hipercolesterolemia moderada en mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, el aumento del HDL puede estar acompañado por un aumento en los triglicéridos. El tratamiento con estrógeno está, por supuesto, limitado a una población específica de pacientes (mujeres postmenopáusicas) y se asocia con graves efectos secundarios que incluyen la inducción de neoplasmas malignos, enfermedad de la vejiga biliar, enfermedad tromboembólica, adenoma hepático, presión sanguínea elevada, intolerancia a la glucosa, e hipercalcemia.

**[0037]** Otros agentes útiles para el tratamiento de la hiperlipidemia incluyen ezetimibe (Zetia®; Merck), que bloquea o inhibe la absorción del colesterol. Sin embargo, los inhibidores de ezetimibe han demostrado presentar algunas toxicidades.

**[0038]** Existe por tanto la necesidad de fármacos más seguros que sean más eficaces en la disminución del colesterol en suero, que aumenten los niveles de HDL en suero, que eviten y/o traten la dislipidemia y/o las enfermedades, dolencias y/o trastornos asociados con la dislipidemia.

**[0039]** Por ejemplo, el HDL, así como las formas recombinantes de ApoA-I complejadas con fosfolípidos pueden servir como sumideros/secuestrantes de moléculas apolares o anfifáticas, por ejemplo, colesterol y derivados (oxiesteroles, esteroides oxidados, esteroides vegetales, etc.), ésteres de colesterol, fosfolípidos y derivados (fosfolípidos oxidados), triglicéridos, productos de oxidación, y lipopolisacáridos (LPS) (véase, por ejemplo, Casas et al., 1995, J. Surg. Res. Nov 59(5): 544 – 52). El HDL puede servir también como un secuestrante de TNF-alfa y otras linfocinas. El HDL puede servir también como un portador de paraoxonasa humana en suero, por ejemplo, PON-1,-2,-3- Paraoxonasa, una esterasa asociada con el HDL, es importante para proteger los componentes celulares frente a la oxidación. La oxidación del LDL, que se produce durante el estrés oxidativo, parece directamente unida al desarrollo de la aterosclerosis (Aviram, 2000, Free Radic. Res. 33 Suppl: S85 – 97). Paraoxonasa parece jugar un papel en la susceptibilidad a la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular (Aviram, 1999, Mol. Med. Today 5(9): 381 – 86). Paraoxonasa humana en suero (PON-1) se une a lipoproteínas de alta densidad (HDL). Su actividad está inversamente relacionada con la aterosclerosis. PON-1 hidroliza los organofosfatos y puede proteger frente a la aterosclerosis mediante la inhibición de la oxidación del HDL y la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Aviram, 1999, Mol. Med. Today 5(9): 381 – 86). Los estudios experimentales sugieren que esta protección está asociada con la capacidad de PON-1 de hidrolizar peróxidos específicos de lípidos en lipoproteínas oxidadas. Las intervenciones que preservan o aumentan la actividad de PON-1 pueden ayudar a retrasar el inicio de la aterosclerosis y de la cardiopatía.

**[0040]** HDL tiene además un papel como agente antitrombótico y reductor del fibrinógeno, y como un agente en el choque hemorrágico (Cockerill y col., WO 01/13939, publicado el 1 de marzo de 2001). HDL, y ApoA-I en particular, han demostrado facilitar un intercambio del lipopolisacárido producido por la sepsis en partículas de lípidos que comprenden ApoA-I, dando como resultado la neutralización funcional del lipopolisacárido (Wright y col., documento WO9534289, publicado el 21 de diciembre de 1995; Wright y col., Patente de los Estados Unidos N° 5.928.624 otorgada el 27 de julio de 1999; Wright y col., Patente de los Estados Unidos N° 5.932.536, otorgada el 3 de agosto de 1999).

**[0041]** El uso terapéutico de ApoA-I, ApoA-IM, ApoA-IP y otras variantes, así como el HDL reconstituido, está actualmente limitado, sin embargo, por la gran cantidad de apolipoproteína requerida para la administración terapéutica y por el coste de producción de la proteína, considerando el bajo rendimiento total de producción. Se ha sugerido en estudios clínicos tempranos que el intervalo de dosis está entre 1,5 – 4 g de proteína por infusión para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Se desconoce el número de infusiones requeridas para un tratamiento completo (véanse, por ejemplo, Eriksson y col., 1999, Circulation 100(6): 594 – 98; Carlson, 1995, Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 5: 85 – 91; Nanjee y col., 2000, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 20(9): 2148 – 55; Nanjee y

col., 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(4): 979 – 89; Nanjee y col., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(9): 1203 – 14). Por tanto, existe una necesidad de desarrollar nuevos procedimientos para el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades, dolencias y/o trastornos dislipidémicos.

5 **[0042]** La citación o identificación de cualquier referencia en la Sección 2 o en cualquier otra sección de esta solicitud debe desarrollarse como una admisión, de tal manera esté disponible como la técnica anterior a la presente invención.

#### 4. RESUMEN

10 **[0043]** La presente divulgación proporciona complejos de lipoproteínas cargadas, composiciones que comprenden los complejos y procedimientos de uso de los complejos para tratar y/o prevenir una variedad de trastornos y dolencias, entre los que se incluyen la dislipidemia y/o las diversas enfermedades, trastornos y/o dolencias asociadas con la misma tal como se define en las reivindicaciones. Los complejos son generalmente lipoproteínas que comprenden dos fracciones, una fracción de apolipoproteína y una fracción de lípidos, y que incluye como ingrediente clave una cantidad especificada de fosfolípido cargado negativamente (o una mezcla de dos o más diferentes, normalmente fosfolípidos de idéntica carga). El(los) fosfolípido(s) cargado(s) están negativamente cargados a pH fisiológico. En algunas realizaciones, el fosfolípido cargado comprende uno o más de fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y/o ácido fosfatídico.

20 **[0044]** La fracción de apolipoproteína comprende una apolipoproteína ApoA-I que es capaz de movilizar colesterol cuando está incluida en el complejo.

25 **[0045]** La fracción lipídica comprende generalmente uno o más fosfolípidos neutros que son esfingomielina y el fosfolípido cargado negativamente, y puede incluir opcionalmente lípidos adicionales, tales como por ejemplo, triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol, lisofosfolípidos, y sus diversos análogos y/o derivados. En algunas realizaciones, los complejos de lipoproteínas cargadas no incluyen dichos lípidos opcionales.

30 **[0046]** Los complejos de lipoproteínas cargadas en los que la fracción lipídica comprende SM, al menos un(os) fosfolípido(s) cargado(s) y opcionalmente otros lípidos, se denominan complejos “ternarios”, debido a que comprenden tres componentes “principales”: una apolipoproteína, una esfingomielina y un(os) fosfolípido(s) cargado(s).

35 **[0047]** La cantidad total de fosfolípido(s) cargado(s) que comprende la fracción lipídica de los complejos de lipoproteínas cargadas comprende aproximadamente un 3,0 % en peso del(de los) fosfolípido(s) cargado(s).

40 **[0048]** La cantidad total de fosfolípido(s) neutro(s) que comprende la fracción lipídica depende de la cantidad de fosfolípido(s) y cualquier lípido opcional incluido. En las realizaciones que no incluyen lípidos opcionales, la fracción lipídica comprenderá generalmente de aproximadamente 90 a 99,8 % en peso de fosfolípido(s) neutro(s), de acuerdo con la cantidad indicada de fosfolípido(s) cargado(s).

**[0049]** Tal como se ha mencionado anteriormente, el fosfolípido neutro comprende una SM.

45 **[0050]** La relación molar lípido a apolipoproteína de los complejos de lipoproteínas cargadas puede variar. Los complejos de lipoproteínas cargadas comprenden una relación molar lípido: apolipoproteína que varía de aproximadamente 2: 1 a aproximadamente 200: 1. En algunas realizaciones, la relación molar lípido: apolipoproteína es aproximadamente de 50: 1.

50 **[0051]** Los complejos de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva pueden tomar una variedad de conformaciones, tamaños y formas, que varían desde estructuras micelares, a pequeñas partículas discoidales que son semejantes a las partículas pre-beta HDL que se producen naturalmente, a partículas discoidales más grandes que son semejantes a las partículas alfa-HDL que se producen naturalmente, hasta grandes partículas esféricas que son semejantes a las subfracciones HDL<sub>2</sub> o HDL<sub>3</sub> que se producen naturalmente. El tamaño y la forma deseados de los complejos de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se pueden controlar ajustando los componentes y las relaciones en peso (o molares) de los lípidos que comprenden la fracción lipídica, así como la relación molar lípido: apolipoproteína, como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Barter y col., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4243 – 4250).

60 **[0052]** Los complejos de lipoproteínas cargadas se encuentran en forma de partículas discoidales, en el que la fracción lipídica formada consiste esencialmente en aproximadamente 90 a 99,8 % en peso de fosfolípido(s) neutro(s) total(es) y aproximadamente 0,2 a 10 % en peso de fosfolípido(s) cargado(s) negativamente total(es). Las partículas discoidales pueden ser grandes (que tienen, *por ejemplo*, un diámetro achatado de aproximadamente 10 a 14 nm) o pequeño (que tienen, *por ejemplo*, un diámetro achatado de aproximadamente 5 a 10 nm). Se puede controlar el tamaño de las partículas discoidales ajustando la relación molar lípido: apolipoproteína, como se conoce

en la técnica (véase, por ejemplo, Barter y col., 1996, *más arriba*). Los tamaños de las partículas se pueden determinar usando, por ejemplo, cromatografía en columna por exclusión de tamaño.

5 **[0053]** Las composiciones farmacéuticas comprenden generalmente complejos de lipoproteínas cargadas tal como se describe en la presente memoria descriptiva, y pueden incluir opcionalmente uno o más vehículos, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas se pueden envasar en cantidades de dosificación adecuadas para la administración. Por ejemplo, las composiciones comprenden cantidades de dosificación unitarias de complejos de lipoproteínas cargadas secas (por ejemplo, liofilizadas) envasados en viales cerrados herméticamente. Dichas composiciones son adecuadas para la reconstitución con agua, solución fisiológica  
10 (tal como solución salina) o tampón, y administración mediante inyección. Dichas composiciones pueden incluir opcionalmente uno o más agentes antiapelmazamiento y/o antiaglomerantes para facilitar la reconstitución de complejos cargados, o uno o más agentes tamponantes, azúcares o sales (por ejemplo, cloruro de sodio) diseñados para ajustar el pH, la osmolalidad y/o la salinidad de la suspensión reconstituida.

15 **[0054]** Los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se espera que realicen y/o faciliten la salida y/o la eliminación del colesterol, y se espera por tanto que sean útiles en el tratamiento y/o la profilaxis de una variedad de dolencias y o trastornos, que incluyen por ejemplo, dislipidemia y/o enfermedades, dolencias y/o trastornos asociados con dislipidemia o con consumo, acumulación o eliminación de lípidos (por ejemplo, depósitos de grasa, degradación celular)/o moléculas apolares tales como toxinas, xenobióticos, etc. Los ejemplos no limitantes de dichas enfermedades, trastornos y/o dolencias asociadas que se  
20 pueden tratar o evitar con los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva incluyen, enfermedad vascular periférica, hipertensión, inflamación, enfermedad de Alzheimer, restenosis, aterosclerosis, y miríadas de manifestaciones clínicas de la aterosclerosis, tales como, por ejemplo, ictus, ictus isquémico, ataque isquémico transitorio, infarto de miocardio, síndrome coronario agudo, angina de pecho, hipertensión renovascular, insuficiencia renovascular, cojera intermitente, isquemia crítica periférica, dolor en reposo y gangrena.

**[0055]** Los procedimientos implican por lo general administrar una cantidad de un complejo de lipoproteína cargada o complejo farmacéutico descrito en la presente memoria descriptiva eficaz para tratar o evitar la indicación concreta. Los complejos y/o composiciones se pueden administrar solos (como monoterapia) o, alternativamente, se  
30 pueden administrar de forma coadyuvante con otros agentes terapéuticos útiles para tratar y/o evitar la dislipidemia y/o sus dolencias, enfermedades y/o trastornos asociados. Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos con los que los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se pueden administrar de forma coadyuvante incluyen resinas de unión a ácidos biliares, inhibidores de la HMG CoA-reductasa (estatinas), niacina, resinas, inhibidores de la absorción del colesterol y fibratos.

**[0056]** Aunque no se pretende estar ligado por ninguna teoría de actuación, se cree que los fosfolípidos cargados que comprenden la fracción lipídica impartirán a los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva propiedades terapéuticas mejoradas sobre los complejos de lipoproteínas convencionales. Una de las diferencias clave entre los pre-beta HDL discoidales pequeños, que se degradan en el riñón, y los HDL discoidales y/o esféricos grandes, que se reconocen por el hígado en el que el colesterol bien se almacena, recircula, metaboliza (como ácidos biliares) o elimina (en la bilis), es la carga de las partículas. El pre-beta HDL discoidal pequeño tiene una carga superficial negativa inferior, que el HDL discoidal y/o esférico grande que está cargado negativamente. Aunque no se pretende estar ligado por ninguna teoría de actuación, se cree que la mayor carga negativa es uno de los factores que estimula el reconocimiento de las partículas por el hígado, y que evita por tanto el catabolismo de las partículas por el riñón. Se debe en parte a la presencia de fosfolípido(s) cargados, se cree que los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva permanecerán en la circulación más tiempo que los complejos de lipoproteínas convencionales, o que la carga afectará la semivida de la lipoproteína de una manera dependiente de la carga. Se espera que su tiempo de  
40 circulación más largo (residencia) facilitará la movilización del colesterol (proporcionando a los complejos más tiempos para acumular colesterol) y la esterificación (proporcionando más tiempo para que LCAT catalice la reacción de esterificación). La carga puede aumentar también la velocidad de captura y/o la eliminación del colesterol, facilitando por tanto la eliminación del colesterol en cantidades más grandes. Como consecuencia, se espera que los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva proporcionarán  
50 beneficios terapéuticos sobre los tratamientos convencionales de lipoproteínas, ya que se necesitará administrar menos complejo y/o composición, y menos a menudo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

60 **[0057]** La FIG. 1 proporciona el cromatograma de un complejo de lipoproteínas no cargadas que consiste en proApo-AI (33 % en peso) y esfingomielina (67 % en peso);

**[0058]** La FIG. 2 proporciona el cromatograma de una realización de un complejo de lipoproteínas cargadas que consiste en proApo-AI (33 % en peso), esfingomielina (65 % en peso) y fosfatidilglicerol (2 % en peso).

5 **[0059]** La FIG. 3 proporciona representaciones gráficas que ilustran la cantidad total de colesterol libre en HDL medida como una función del tiempo en conejos tras la administración de un complejo de lipoproteínas no cargadas control (curvas marcadas IIA) o una realización del complejo de lipoproteína cargada tal como se describe en la presente memoria descriptiva (curvas marcadas IIB); y

10 **[0060]** La FIG. 4 proporciona una representación gráfica que ilustra la cantidad promedio de colesterol libre en HDL medida como una función del tiempo en conejos a los que se administró un complejo de lipoproteínas no cargadas control (grupo IIA; dos animales) o una realización de un complejo de lipoproteínas cargadas tal como se describe en la presente memoria descriptiva (grupo IIB; dos animales).

## 6. DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 **[0061]** La presente divulgación describe complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas que son útiles para, entre otras cosas, el tratamiento y/o la profilaxis de la dislipidemia y/o las enfermedades, trastornos y/o dolencias asociadas con la dislipidemia. Tal como se ha discutido en la sección del Resumen, los complejos de lipoproteínas cargadas comprenden dos fracciones principales, una fracción de apolipoproteína y una fracción lipídica, e incluyen un ingrediente clave de una cantidad especificada de uno o más fosfolípidos cargados.

20 **[0062]** Los complejos de lipoproteínas cargadas se pueden aislar de fuentes naturales, tales como de suero humano (denominado en la presente memoria descriptiva como “complejos aislados de lipoproteínas cargadas”, o se pueden preparar o reconstituirse a partir de sus componentes individuales (denominados en la presente memoria descriptiva como “complejos reconstituidos de lipoproteínas cargadas”). Tal como apreciarán los técnicos expertos, los complejos reconstituidos de lipoproteínas cargadas pueden ser ventajosos en muchas aplicaciones, debido a que se pueden controlar selectivamente las identidades y cantidades de sus diversos componentes.

### 6.1 Apolipoproteínas y péptidos de apolipoproteínas

30 **[0063]** La naturaleza de las apolipoproteínas que comprenden la fracción de apolipoproteína de los complejos de lipoproteínas cargadas no es fundamental para el éxito. Virtualmente, cualesquiera apolipoproteína y/o derivado o análogo de la misma que proporcione beneficio terapéutico y/o profiláctico tal como se describe en la presente memoria descriptiva se puede incluir en los complejos cargados. Además, cualquier péptido alfa hélice o el péptido análogo, o cualquier tipo de molécula que “imite” la actividad de una apolipoproteína (tal como, por ejemplo ApoA-I) en la que ésta puede activar LCAT o formar partículas discoidales cuando se asocia con lípidos, puede comprender los complejos cargados, y se incluye por tanto en la definición de “apolipoproteína”. Los ejemplos de apolipoproteínas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, formas de preapolipoproteínas de ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V y ApoE; formas pro y maduras de ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, y ApoE; y formas, isoformas, variantes y mutantes polimórficos activos así como las formas truncadas, las más comunes de las cuales son ApoA-<sub>IM</sub> (ApoA-<sub>IM</sub>) y ApoA-<sub>IP</sub> (ApoA-<sub>IP</sub>). Se conocen también apolipoproteínas mutantes que contienen restos de cisteína, y se pueden usar también (véase, por ejemplo, el documento U.S. 2003/0181372). Las apolipoproteínas pueden estar en forma de monómeros o dímeros, que pueden ser homodímeros o heterodímeros. Por ejemplo homo y heterodímeros (cuando sea factible) de ApoA-I pro y madura (Duverger y col., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12): 1424 – 29), ApoA-<sub>IM</sub> (Franceschini y col., 1985, *J. Biol. Chem.* 260: 1632 – 35), ApoA-<sub>IP</sub> (Daum y col., 1999, *J. Mol. Med.* 77: 614 – 22), ApoA-II (Shelness y col., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(14): 8637 – 46; Shelness y col., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(15): 9929 – 35), ApoA-IV (Duverger y col., 1991, *Euro. J. Biochem.* 201(2): 373 – 83), ApoE (McLean y col., 1983, *J. Biol. Chem.* 258(14): 8993 – 9000), se pueden usar ApoJ y ApoH. Las apolipoproteínas pueden incluir restos correspondientes a elementos que facilitan su aislamiento, tales como etiquetas His, u otros elementos designados para otros fines, siempre que la apolipoproteína retenga alguna actividad biológica cuando se incluya en un complejo.

50 **[0064]** Dichas apolipoproteínas se pueden purificar de fuentes animales (y en particular de fuentes humanas) p producirse de forma recombinante como se conoce bien en la técnica, véanse, por ejemplo, Chung y col., 1980, *J. Lipid Res.* 21(3): 284 – 91; Cheung y col., 1987, *J. Lipid Res.* 28(8): 913 – 29. Véanse también Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup>. 5.059.528, 5.128.318, 6.617.134, y Publicaciones de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 20002/0156007, 2004/0067873, 2004/0077541, y 2004/0266660.

60 **[0065]** Los ejemplos no limitantes de péptidos y análogos de péptidos que corresponden a apolipoproteínas, así como a agonistas que imitan la actividad de ApoA-I, ApoA-<sub>IM</sub>, ApoA-II, ApoA-IV, y ApoE, que son adecuados para el uso como apolipoproteínas en los complejos y composiciones cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se dan a conocer en las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166 (otorgadas a Dasseux y col), Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.840.688 (otorgada a Tso), Publicaciones de los Estados Unidos 2004/0266671, 2004/0254120, 2003/0171277 y 2003/0045460 (de Fogelinan), y publicación de los Estados Unidos 2003/0087819 (de Bielicki). Estos péptidos y análogos de péptidos pueden estar compuestos de L-aminoácidos o D-aminoácidos o de una mezcla de L y D aminoácidos. Pueden incluir también una o más uniones no peptídicas o de

amidas, tales como uno o más isoésteres de péptido/amida bien conocidos. Dichas apolipoproteínas de “péptido y/o péptidos miméticos” se pueden sintetizar o fabricar usando cualquier técnica para la síntesis peptídica conocida en la materia, incluyendo, por ejemplo, las técnicas descritas en las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166.

5  
 [0066] Los complejos cargados pueden incluir un único tipo de apolipoproteína, o mezclas de dos o más apolipoproteínas diferentes, que se pueden derivar de la misma o de diferentes especies. Aunque no se requiera, los complejos de lipoproteínas cargadas comprenderán preferentemente apolipoproteínas que se derivan de, o corresponde en la secuencia de aminoácidos a, las especies animales que se están tratando, con el fin de evitar  
 10 inducir una respuesta inmune al tratamiento. El uso de apolipoproteínas de péptidos miméticos puede también evitar o reducir una respuesta inmune.

## 6.2 Fosfolípidos

15 [0067] La fracción lipídica de los complejos y composiciones cargadas incluyen dos tipos de fosfolípidos: un fosfolípido neutro y un fosfolípido cargado. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “fosfolípidos neutros” son fosfolípidos que tienen una carga neta de aproximadamente cero a pH fisiológico. En muchos ejemplos descritos en la presente memoria descriptiva, los fosfolípidos neutros son iones híbridos, aunque se conocen y se pueden usar otros tipos de fosfolípidos neutros netos. El fosfolípido neutro comprende uno o ambos de la lecitina y/o  
 20 la SM, y puede incluir opcionalmente otros fosfolípidos neutros. En algunos ejemplos, el fosfolípido neutro comprende lecitina, pero no SM. En otros ejemplos, el fosfolípido neutro comprende SM, pero no lecitina. En otros ejemplos más, el fosfolípido neutro comprende lecitina y SM. Todos estos ejemplos específicos pueden incluir fosfolípidos neutros además de la lecitina y/o la SM, pero en muchos ejemplos no se incluyen dichos fosfolípidos neutros adicionales.

25 [0068] La identidad de la SM usada no es fundamental para el éxito. De esta manera, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “SM” no incluye solo las esfingomielinas derivadas de fuentes naturales, sino también los análogos y derivados de las SM que se producen de forma natural que son insensibles a la hidrólisis por LCAT, como la SM que se produce naturalmente. La SM es un fosfolípido muy similar en estructura a la lecitina, pero, s diferencia de la lecitina, no tiene un esqueleto d glicerol, y por tanto no tiene enlaces éster que se unen a las cadenas de acilo. Más bien, la SN tiene un esqueleto de ceramida, con enlaces amida que conectan las cadenas de acilo. La SM no es un sustrato para LCAT, y generalmente no se puede hidrolizar por ésta. Puede actuar, sin embargo como inhibidora de LCAT o puede disminuir la actividad de LCAT diluyendo la concentración del fosfolípido del sustrato. Debido a que la SM no está hidrolizada, permanece en la circulación más tiempo. Se espera  
 30 que esta característica permitirá a los complejos de lipoproteínas cargadas que incluyen SM tener una duración más larga del efecto farmacológico (movilización del colesterol) y recoger más lípidos, en particular colesterol, que los complejos de apolipoproteínas que no incluyen la SM (véase, por ejemplo, los complejos de apolipoproteínas descritos en la Publicación de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 2004/0067873). Este efecto puede dar como resultado que sean necesarias dosis menos frecuentes o más pequeñas para el tratamiento que requieran los complejos de lipoproteínas que no incluyan la SM.  
 40

[0069] Virtualmente, se puede derivar la SM de cualquier fuente. Por ejemplo, se puede obtener la SM de leche huevo o cerebro. Se pueden usar también análogos o derivados de la SM. Los ejemplos no limitantes de análogos y derivados de SM útiles incluyen, pero no se limitan a, palmitoilesfingomielina, estearoilesfingomielina, D-eritro-N-16: 0-esfingomielina y su dihidro isómero, D-eritro-N-16: 0-dihidro-esfingomielina.  
 45

[0070] Las esfingomielinas aisladas de fuentes naturales se pueden enriquecer artificialmente en una cadena de acilo saturado o insaturado concreta. Por ejemplo, la esfingomielina de leche (Avanti Phospholipid, Alabaster, Ala.) se caracteriza por cadenas largas de acilo saturado (es decir, cadenas de acilo que tienen 20 o más átomos de carbono). En contraste, la esfingomielina de huevo se caracteriza por cadenas de acilo saturadas cortas (es decir, cadenas de acilo menos de 20 átomos de carbono). Por ejemplo, mientras que solo aproximadamente un 20 % de esfingomielina de leche comprende cadenas de acilo C16: 0 (16 carbonos, saturados), aproximadamente un 80 % de la esfingomielina de huevo comprende cadenas de acilo C16: 0. Usando la extracción del disolvente, se puede enriquecer la esfingomielina de leche para tener una composición de la cadena de acilo comparable a la de la esfingomielina de huevo, o viceversa.  
 50  
 55

[0071] La SM puede ser semisintética de tal manera que tenga cadenas de acilo concretas. Por ejemplo, la esfingomielina de leche puede purificarse en primer lugar de la leche, a continuación, una cadena de acilo particular, por ejemplo, la cadena de acilo C16: 0, se puede escindir y sustituirse por otra cadena de acilo. Se puede también sintetizar completamente la SM, mediante por ejemplo, síntesis a gran escala. Véase, por ejemplo, Dong y col, Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.220.043, titulada Synthesis of D-erythro-sphingomyelins, otorgada el 15 de junio de 1993; Weis, 1999, Chem. Phys. Lipids 102(1 – 2): 3 – 12.  
 60

[0072] Se pueden variar selectivamente las longitudes y los niveles de saturación de las cadenas de acilo que

comprende una SM semisintética o sintética. Las cadenas de acilo pueden ser saturadas o insaturadas y pueden contener de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 átomos de carbono. Cada cadena puede contener el mismo número de átomos de carbono, o, alternativamente, cada cadena puede contener diferentes números de átomos de carbono. En algunos ejemplos, descritos en la presente memoria descriptiva, la SM semisintética o sintética comprende cadenas de acilo mixtas de tal manera que una cadena que una cadena está saturada y una cadena está insaturada. En dichas cadenas de acilo mixtas de las SM, las longitudes de las cadenas pueden ser iguales o diferentes. En otros ejemplos, las cadenas de acilo de la SM semisintética o sintética son tanto saturadas como insaturadas. De nuevo, las cadenas pueden contener números iguales o diferentes de átomos de carbono. En algunos ejemplos, ambas cadenas de acilo que comprenden la SM semisintética o sintética son idénticas. En un ejemplo específico, las cadenas corresponden a las cadenas de acilo de un ácido graso que se produce naturalmente, tal como por ejemplo, ácido oleico, palmítico o esteárico. En otro ejemplo específico, ambas cadenas de acilo están saturadas y contienen de 6 a 24 átomos de carbono. Los ejemplos no limitantes de cadenas de acilo presentes en ácidos grasos que se producen comúnmente que se pueden incluir en las SM semisintéticas y sintéticas se proporcionan en la Tabla 1, siguiente:

Tabla 1	
Longitud: Número de insaturaciones	Nombre común
14: 0	Ácido mirístico
16: 0	Ácido palmítico
18: 0	Ácido esteárico
18: 1 cis $\Delta^9$	Ácido oleico
18: 2 cis $\Delta^{9,12}$	Ácido linoleico
18: 3 cis $\Delta^{9,12,15}$	Ácido linolénico
20: 4 cis $\Delta^{5,8,11,14}$	Ácido araquidónico
20: 5 cis $\Delta^{5,8,11,14,17}$	Ácido eicosapentanoico (un ácido graso omega-3)

**[0073]** De la misma forma que la SM, la identidad de la lecitina usada no es fundamental para el éxito. También, de la misma forma que la SM, la lecitina se puede derivar o aislar de fuentes naturales, o se puede obtener sintéticamente. Los ejemplos de lecitinas adecuadas aisladas de fuentes naturales incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolina de huevo, y fosfatidilcolina de soja. Los ejemplos no limitantes adicionales de lecitinas adecuadas incluyen, dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina, 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina, 1-oleoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina y los derivados de éter o sus análogos.

**[0074]** De la misma forma que la SM, las lecitinas derivadas o aisladas de fuentes naturales se pueden enriquecer para incluir cadenas de acilo especificadas. Cuando se emplean lecitinas semisintéticas o sintéticas la(s) identidad(es) de las cadenas de acilo se puede(n) variar selectivamente, tal como se ha discutido anteriormente junto con la SM. En algunos ejemplos de los complejos cargados descritos en la presente memoria descriptiva que incluyen la SM y la lecitina, las cadenas de acilo de la SM y la lecitina son todas idénticas. En un ejemplo específico, las cadenas de acilo corresponden a las cadenas de acilo del ácido mirístico, palmítico, oleico o esteárico.

**[0075]** La fracción lipídica incluye también un fosfolípido cargado. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "fosfolípidos cargados" son fosfolípidos que tienen una carga neta a pH fisiológico. El fosfolípido cargado puede comprender un único tipo de fosfolípido cargado, o una mezcla de dos o más diferentes, normalmente fosfolípidos cargados de la misma manera. En algunos ejemplos, los fosfolípidos cargados son glicerofosfolípidos cargados negativamente. La(s) identidad(es) del(de los) fosfolípido(s) cargado(s) es(son) fundamental(es) para el éxito. Los ejemplos específicos de fosfolípidos cargados negativamente adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico. En algunos ejemplos, el fosfolípido cargado negativamente comprende uno o más de fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y/o ácido fosfatídico.

**[0076]** De la misma forma que la SM y la lecitina, los fosfolípidos cargados negativamente se pueden derivar de fuentes naturales o prepararse mediante síntesis química. Cuando se emplean fosfolípidos sintéticos cargados negativamente, se pueden variar selectivamente las identidades de las cadenas de acilo, tal como se ha discutido anteriormente junto con la SM. En algunos ejemplos de los complejos de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva, ambas cadenas de acilo en los fosfolípidos cargados negativamente son idénticas. En algunos ejemplos de complejos de lipoproteínas cargadas ternarios y cuaternarios descritos en la presente memoria descriptiva, las cadenas de acilo de la SM, la lecitina y los fosfolípidos cargados negativamente son todos idénticos. En un ejemplo específico el(los) fosfolípido(s) cargado(s), y/o la SM tienen todas cadenas de acilo C16: 0 o C16: 1. En otro ejemplo específico, las cadenas de acilo del(de los) fosfolípido(s) cargado(s), la lecitina y/o la SM corresponden a la cadena de acilo del ácido palmítico. En otro ejemplo específico más, las cadenas de acilo del(de los) fosfolípido(s) cargado(s), la lecitina y/o la SM corresponden a la cadena de acilo del ácido oleico.

**[0077]** La cantidad total de fosfolípido(s) cargado(s) negativamente que comprenden los complejos cargados puede variar. Normalmente, la fracción lipídica comprenderá de aproximadamente 0,2 a 10 % en peso de fosfolípido(s) cargado(s) negativamente. En algunos ejemplos descritos en la presente memoria descriptiva, la fracción lipídica comprende aproximadamente 0,2 a 1 % en peso, 0,2 a 2 % en peso, 0,2 a 3 % en peso, 0,2 a 4 % en peso, 0,2 a 5 % en peso, 0,2 a 6 % en peso, 0,2 a 7 % en peso, 0,2 a 8 % en peso o 0,2 a 9 % en peso de fosfolípido(s) cargado(s) negativamente. En algunos ejemplos, la fracción lipídica comprende aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 % en peso de fosfolípido(s) cargado(s) negativamente, y/o un intervalo que incluye cualquiera de estos valores como criterios de valoración. En algunos ejemplos, la fracción lipídica comprende entre aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 % en peso de fosfolípido(s) cargado(s) negativamente hasta aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % en peso de fosfolípido(s) cargado(s) negativamente.

**[0078]** Se espera que la inclusión de fosfolípidos cargados negativamente en los complejos de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva proporcionará complejos con mayor estabilidad (en disolución) y semivida más larga del producto en comparación con los complejos convencionales. Además, el uso de fosfolípidos cargados negativamente se espera que minimice la agregación de partículas (por ejemplo, mediante repulsión de cargas), aumentando eficazmente por tanto el número de complejos disponibles presentes en un régimen de administración dado, y adyugar el direccionamiento del complejo para el reconocimiento por el hígado y no por el riñón.

**[0079]** In vivo, algunas lipoproteínas se intercambian desde un complejo de lipoproteína a otro (esto es verdadero para la lipoproteína ApoA-I). Durante el curso de dicho intercambio, la apolipoproteína transporta normalmente una o más moléculas de fosfolípidos. Debido a esta propiedad, se espera que los complejos de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva “sembrarán” los fosfolípidos cargados negativamente con HDL endógeno, transformándolos por tanto en partículas alfa que son más resistentes a la eliminación por los riñones. De esta manera, se espera que la administración de los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva aumentarán los niveles de HDL en suero, y/o alterarán la semivida del HDL endógeno así como el metabolismo del HDL endógeno. Se espera que esto dará como resultado la alteración del metabolismo del colesterol y el transporte inverso de lípidos.

**[0080]** Además del(de los) fosfolípido(s) neutros y cargados, la fracción lipídica puede incluir opcionalmente lípidos adicionales. Se pueden usar virtualmente cualquier tipo de lípidos, incluyendo, pero sin limitarse a, lisofosfolípidos, galactocerebrósidos, gangliósidos, cerebrósidos, triglicéridos, y colesterol y sus derivados.

**[0081]** Cuando se incluyen, dichos lípidos opcionales comprenderán normalmente menos de aproximadamente 50 % en peso de la fracción lipídica, aunque en algunos ejemplos, se podrían incluir lípidos más opcionales. En algunos casos, la fracción lipídica de los complejos de lipoproteínas cargadas no incluye lípidos opcionales.

**[0082]** Tal como se ha indicado en la sección del Resumen, la cantidad total de fosfolípido(s) neutro(s) que comprende la fracción lipídica de los complejos de lipoproteínas cargadas puede variar, y lo hará normalmente de aproximadamente 50 a 99,8 % en peso, dependiendo de la cantidad total de fosfolípido(s) cargado(s) incluida, y de si se incluyen cualesquiera lípidos opcionales. Los ejemplos específicos descritos en la presente memoria descriptiva en la que no se incluyen lípidos opcionales comprenderá normalmente aproximadamente 90 a 99,8 % en peso de fosfolípido(s) neutro(s). Las relaciones molares lecitina: SM adecuadas de las fracciones lipídicas que incluyen lecitina y SM se describen en la sección del Resumen.

**[0083]** En un ejemplo específico, el complejo de lipoproteína cargada es un complejo ternario en el que la fracción lipídica consiste esencialmente de aproximadamente 90 a 99,8 % en peso de la SM y de aproximadamente 0,2 a 10 % en peso del fosfolípido cargado negativamente, por ejemplo, aproximadamente 0,2 – 1 % en peso, 0,2 – 2 % en peso, 0,2 – 3 % en peso, 0,2 – 4 % en peso, 0,2 – 5 % en peso, 0,2 – 6 % en peso, 0,2 – 7 % en peso, 0,2 – 8 % en peso, 0,2 – 9 % en peso, o 0,2 – 10 % en peso de fosfolípido(s) cargado(s) negativamente. En otro ejemplo específico, el complejo de lipoproteína cargada es un complejo ternario en el que la fracción lipídica consiste esencialmente de aproximadamente 90 a 99,8 % en peso de lecitina y aproximadamente 0,2 a 10 % en peso de fosfolípido cargado negativamente, por ejemplo, aproximadamente 0,2 – 1 % en peso, 0,2 – 2 % en peso, 0,2 – 3 % en peso, 0,2 – 4 % en peso, 0,2 – 5 % en peso, 0,2 – 6 % en peso, 0,2 – 7 % en peso, 0,2 – 8 % en peso, 0,2 – 9 % en peso, o 0,2 – 10 % en peso de fosfolípido(s) cargado(s) negativamente.

**[0084]** En otro ejemplo más, el complejo de lipoproteína cargada es un complejo cuaternario en el que la fracción lipídica consiste esencialmente en aproximadamente 9,8 a 90 % en peso de SM, aproximadamente 9,8 a 90 % en peso de lecitina y aproximadamente 0,2 – 10 % en peso de fosfolípido cargado negativamente por ejemplo, de aproximadamente 0,2 – 1 % en peso, 0,2 – 2 % en peso, 0,2 – 3 % en peso, 0,2 – 4 % en peso, 0,2 – 5 % en peso, 0,2 – 6 % en peso, 0,2 – 7 % en peso, 0,2 – 8 % en peso, 0,2 – 9 % en peso, o 0,2 – 10 % en peso de fosfolípido(s)

cargado(s) negativamente.

**[0085]** Los complejos pueden incluir opcionalmente otras proteínas, tales como, por ejemplo, paraoxonasa (PON) o LCAT, antioxidantes, ciclodextrinas y/u otros materiales que ayudan a atrapar el colesterol en el núcleo o la superficie del complejo. El complejo puede opcionalmente pegarse (por ejemplo, cubrirse con polietilenglicol u otro polímero) para aumentar la semivida en circulación.

**[0086]** Como reconocerán los técnicos expertos, la relación molar de la fracción lipídica de la fracción de apolipoproteína de los complejos de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva puede variar, y dependerá de, entre otros factores, la(s) identidad(es) de la apolipoproteína que comprende la fracción de apolipoproteína, las identidades y cantidades de los fosfolípidos cargados que comprenden la fracción lipídica, y el tamaño deseado del complejo de lipoproteína cargada. Debido a que la actividad biológica de las apolipoproteínas tales como ApoA-I se piensa que está mediada por las hélices anfifáticas que comprenden la apolipoproteína, es conveniente expresar la fracción de apolipoproteína de la relación molar lípido: apolipoproteína usando los equivalentes de la proteína ApoA-I. Se acepta generalmente que ApoA-I contiene 6 – 10 hélices anfifáticas, dependiendo del procedimiento usado para calcular las hélices. Otras apolipoproteínas se pueden expresar en términos de equivalentes de ApoA-I basándose en el número de hélices anfifáticas que contienen. Por ejemplo, ApoA-<sub>LM</sub>, que existe normalmente como un dímero de puente disulfuro, que se puede expresar como 2 equivalentes de ApoA-I, debido a que cada molécula de ApoA-<sub>LM</sub> contiene como máximo dos hélices anfifáticas como una molécula de ApoA-I. de manera inversa, una apolipoproteína peptídica que contiene una única hélice anfifática se puede expresar como un equivalente de 1/10-1/6 ApoA-I, debido a que cada molécula contiene 1/10-1/6 como máximo hélices anfifáticas como una molécula de ApoA-I. En general, la relación molar equivalente lípido: ApoA-I de los complejos de lipoproteínas cargadas (definidos en la presente memoria descriptiva como “R<sub>i</sub>” variará de aproximadamente 2: 1 a 100: 1. En algunas realizaciones, la R<sub>i</sub> es aproximadamente de 50: 1. Se pueden obtener relaciones en peso usando un PM de aproximadamente 650 – 800 para los fosfolípidos.

**[0087]** El tamaño del complejo de lipoproteína cargada se puede controlar variando la R<sub>i</sub>. Esto es, la R<sub>i</sub> más pequeña, la más pequeña del disco. Por ejemplo, las grandes placas discoidales tendrán normalmente una R<sub>i</sub> de aproximadamente 200: 1 a 100: 1, mientras que las placas discoidales más pequeñas tendrán normalmente una R<sub>i</sub> en el intervalo de aproximadamente 100: 1 a 30: 1.

**[0088]** En algunos ejemplos específicos descritos en la presente memoria descriptiva, los complejos de lipoproteínas cargadas con grandes placas discoidales que contienen 2 – 4 equivalentes de ApoA-I (por ejemplo, 2 – 4 moléculas de ApoA-I, 1 – 2 moléculas del dímero ApoA-<sub>LM</sub> o 6 – 10 moléculas peptídicas de hélice simple, 1 molécula de fosfolípido cargado y 400 moléculas de fosfolípido neutro total. En otros ejemplos específicos, los complejos de lipoproteínas cargadas son pequeñas placas discoidales que contienen 2 – 4 equivalentes de ApoA-I, 1 molécula de fosfolípido cargado y 200 moléculas de fosfolípidos neutros totales.

**[0089]** Las diversas moléculas de apolipoproteínas y/o fosfolípidos que comprenden los complejos de lipoproteínas cargadas pueden etiquetarse con cualquier marcador detectable conocido, incluyendo isótopos estables (por ejemplo, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>2</sup>H, etc.); isótopos radioactivos (por ejemplo, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, etc.); fluoróforos, agentes quimioluminiscentes; o marcadores enzimáticos.

### 6.3 Procedimientos de preparación de complejos de lipoproteínas cargadas

**[0090]** Los complejos de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se pueden preparar en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a vesículas, liposomas, proteoliposomas, micelas, y partículas discoidales. Se pueden usar una variedad de procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia para preparar los complejos de lipoproteínas cargadas. Se pueden usar numerosas técnicas disponibles para preparar liposomas o proteoliposomas. Por ejemplo, se puede sonicar simultáneamente la apolipoproteína (usando un baño o sonda sonicadora) con los fosfolípidos adecuados para formar complejos. Alternativamente, se puede combinar la apolipoproteína con vesículas de lípidos preformadas dando como resultado la formación espontánea de complejos de lipoproteínas cargadas. Se pueden formar también complejos de lipoproteínas cargadas mediante un procedimiento de diálisis con detergente; por ejemplo, una mezcla de apolipoproteína, fosfolípido(s) de SM cargados y/o lecitina y un detergente tal como colato se dializan para eliminar el detergente y reconstituirse para formar complejos de lipoproteínas cargadas (véase, *por ejemplo*, Jonas y col., 1986, *Methods in Enzymol.* 128: 553 – 82), o usando un dispositivo extrusor o mediante homogenización.

**[0091]** Los complejos de lipoproteínas cargadas se pueden preparar mediante el procedimiento de dispersión de colato descrito en el Ejemplo 1 de la publicación de los Estados Unidos 2004/0067873. En resumen, el lípido seco se hidrata en tampón NaHCO<sub>3</sub>, a continuación se somete a vortización y se sonica hasta que se dispersa todo el lípido. A continuación se añade disolución de colato, se incuba la mezcla durante 30 minutos, con vortización y sonicación periódicas, hasta que se vuelve transparente, indicando que se forman micelas lipídicas de colato. Se añade ProApoA-I en tampón NaHCO<sub>3</sub>, y se incuba la disolución durante 1 hora a aproximadamente 37 °C – 50 °C. la

relación de lípido: proApoA-I en la disolución puede ser de 1: 1 a 200: 1 (moles/moles), pero en algunas realizaciones, la relación es aproximadamente de 2: 1 en peso de lípido a peso de proteína (p/p).

**[0092]** El colato se puede eliminar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el colato se puede eliminar mediante diálisis, ultrafiltración o por la eliminación de moléculas de colato mediante adsorción/absorción sobre una perla o resina de afinidad. En un ejemplo, se añaden las perlas de afinidad, por ejemplo BIO-BEADS® (Bio-Rad Laboratories) a la preparación de complejos de lipoproteínas cargadas para adsorber el colato. En otro ejemplo, la preparación, por ejemplo, una preparación micelar de los complejos de lipoproteínas cargadas y el colato, se pasan sobre una columna empaquetada con perlas de afinidad.

**[0093]** En un ejemplo específico, se elimina el colato de una preparación de complejos de lipoproteínas cargadas introduciendo la preparación en perlas BIO-BEADS® dentro de una jeringuilla. La jeringuilla a continuación se cierra herméticamente con una película de barrera y se incuba con una plataforma móvil a 4 °C durante la noche. Antes del uso, se retira el colato inyectando la disolución a través de BIO-BEADS®, donde se adsorbe por las perlas.

**[0094]** Se espera que los complejos de lipoproteínas cargadas tengan una semivida aumentada en la circulación cuando los complejos tienen un tamaño y una densidad similares a HDL, especialmente en los HDL en las poblaciones pre-beta-1 o pre-beta-2-HDL. Se pueden preparar mediante liofilización preparaciones estables que tengan una larga semivida. Por ejemplo, el procedimiento de liofilización simultánea descrito a continuación proporciona una formulación estable y un procedimiento fácil de formulación/preparación de partículas. Los procedimientos de liofilización simultánea se describen también en la Patente de los Estados Unidos N° 6.287.590 (titulada formación del complejo péptido/lípido mediante liofilización simultánea, por Dasseus, otorgada el 11 de septiembre de 2001). Los complejos de proteínas cargadas liofilizados se pueden usar para preparar suministros a granel de una reformulación farmacéutica, o para preparar alícuotas individuales o unidades de dosificación que se pueden reconstituir por rehidratación con agua estéril o una disolución tamponada adecuada antes de la administración a un sujeto.

**[0095]** Las Patentes de los Estados Unidos N°s 6.004.925, 6.037.323, 6.046.166 y 6.287.590 dan a conocer un procedimiento sencillo para preparar complejos de lipoproteínas cargadas que tienen características similares a HDL. Este procedimiento, que implica la liofilización simultánea de apolipoproteína y disoluciones de lípidos en un disolvente orgánico (o mezclas de disolventes) y la formación de complejos de lipoproteínas cargadas durante la hidratación del polvo liofilizado, tiene las siguientes ventajas: (1) el procedimiento requiere muy pocas etapas; (2) usa disolvente(s) barato(s); (3) la mayor parte o todos los ingredientes incluidos se usan para formar los complejos diseñados, evitando de esta manera el desperdicio del material de partida que es común en otros procedimientos; (4) los complejos liofilizados que se forman son muy estables durante el almacenamiento de tal manera que los complejos resultantes se pueden reconstituir inmediatamente antes del uso; (5) los complejos resultantes necesitan usualmente no purificarse adicionalmente tras la formación y antes del uso; (6) los compuestos tóxicos, incluyendo los detergentes tales como colato, se evitan; y (7) el procedimiento de producción se puede escalar fácilmente y es adecuado para la fabricación de GMP (es decir, en un ambiente exento de endotoxina).

**[0096]** En algunos casos, los procedimientos de liofilización simultánea comúnmente conocidos en la técnica se usan para preparar complejos de lipoproteínas cargadas. De manera breve las etapas de liofilización simultánea incluyen solubilizar la apolipoproteína ("Apo" y los fosfolípidos juntos en un disolvente orgánico o mezcla de disolventes, o solubilizar la Apo y los fosfolípidos por separado y mezclarlos juntos. Las características deseables del disolvente o la mezcla de disolventes son: (i) un medio con polaridad relativa para ser capaz de disolver los lípidos hidrófobos y la proteína anfifática, (ii) los disolventes deben ser un disolvente de tipo 2 o 3 de acuerdo con las directrices de disolventes de la FDA (Registro Federal, volumen 62, N° 247) para evitar la toxicidad potencial asociada con el disolvente orgánico residual, (iii) bajo punto de ebullición para asegurar la fácil eliminación del disolvente durante la liofilización, (iv) elevado punto de fusión para proporcionar una congelación más rápida, temperaturas más elevadas del condensador y, por tanto, menos desgaste del criocongelador. Se usa preferiblemente ácido acético glacial. Se pueden usar también las combinaciones de por ejemplo, metanol, ácido acético glacial, xileno, o ciclohexano.

**[0097]** La disolución Apo/lípido se liofiliza a continuación para obtener polvo de Apo/lípido homogéneo. Se pueden optimizar las condiciones de liofilización para obtener una evaporación rápida del disolvente con una mínima cantidad de disolvente residual en el polvo de Apo/lípido liofilizado. El técnico experto puede determinar las condiciones de criocongelación, y dependen de la naturaleza o del disolvente, el tipo y las dimensiones del receptáculo, por ejemplo, una disolución mantenida en un vial, el volumen de carga, y las características del criocongelador usado. La concentración de la disolución lípido/Apo antes de la liofilización, para la eliminación del disolvente orgánico y la formación satisfactoria de complejos, puede variar de 15 a 50 mg/ml de concentración de equivalente de ApoA-I y de 20 a 100 mg/ml de concentraciones de lípidos.

**[0098]** Los complejos de Apo-lípido se forman espontáneamente tras la hidratación del polvo de Apo-lípido liofilizado con unos medios acuosos de pH y osmolaridad adecuados. En algunos ejemplos, los medios pueden

contener también estabilizantes tales como sacarosa, trehalosa, glicerina y otros. En algunos ejemplos, la disolución debe calentarse varias veces por encima de la temperatura de transición para que se formen los lípidos de los complejos. La relación molar de lípido a proteína para la formación satisfactoria de complejos de lipoproteínas cargadas puede ser de 2: 1 a 200: 1 (expresada en equivalentes de ApoA-I) y es preferiblemente de aproximadamente 2: 1 en peso de lípido a peso de proteína (p/p). el polvo se hidrata para obtener una concentración final de complejo de aproximadamente 5 – 30 mg/ml expresada en equivalentes de ApoA-I.

**[0099]** En algunos casos, se obtiene polvo de Apo mediante criocongelación de la disolución de Apo en disolución acuosa de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ . Se forma una disolución homogénea de Apo y lípidos disolviendo sus polvos y la Apo en ácido acético glacial. A continuación se liofiliza la disolución, y se forman complejos de lipoproteínas cargadas similares a HDL mediante la hidratación del polvo liofilizados con medios acuosos.

**[0100]** En algunos casos, la homogeneización se usa para preparar complejos de Apo-lípidos. Se puede usar este procedimiento para preparar complejos de Apo de soja-PC y se usa de manera rutinaria par la formulación de complejos de ApoA-<sub>1M</sub>-POPC. La homogeneización se puede adaptar fácilmente para la formación d complejos de lipoproteínas cargadas. De manera breve, este procedimiento comprende formar una suspensión de lípidos en disolución acuosa de Apo mediante Ultraturex™, y la homogeneización de la suspensión de lípido-proteína formada usando un homogeneizador a elevada presión hasta que la disolución llega a ser transparente-opalescente y se forman los complejos. Se usa una temperatura elevada por encima de la de transición de los lípidos durante la homogeneización. La homogeneización se usan durante un periodo alargado de tiempo 1.14 horas a presión elevada.

**[0101]** En algunos casos, los complejos de lipoproteínas cargadas se pueden formar mediante liofilización secundaria de fosfolípidos con disoluciones o suspensiones de péptidos o proteínas. Se puede liofilizar la disolución homogénea de péptidos/proteínas, fosfolípidos cargados, SM y/o lecitina (más cualquier otro fosfolípido de elección) en un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos, y los complejos de lipoproteínas cargadas se pueden formar espontáneamente mediante hidratación del polvo liofilizado con un tampón acuoso. Se incluyen ejemplos de disolventes orgánicos o sus mezclas, pero no se limitan a, ácido acético, ácido acético y xileno, ácido acético y ciclohexano, y metanol y xileno.

**[0102]** Se puede determinar empíricamente una proporción adecuada de proteína (péptido) a lípido de tal manera que los complejos resultantes posean las propiedades físicas y químicas adecuadas, es decir, usualmente (pero no de forma necesaria) similares en tamaño al HDL. La mezcla resultante de Apo y lípido en disolvente se congela y liofiliza hasta sequedad. Algunas veces, se debe añadir un disolvente adicional a la mezcla para facilitar la liofilización. Se espera que este producto liofilizado será capaz de almacenarse durante largos periodos y permanecerá estable.

**[0103]** El producto liofilizado se puede reconstituir con el fin de obtener una disolución o suspensión del complejo de lipoproteína cargada. A este fin, el polvo liofilizado se rehidrata con una disolución acuosa hasta un volumen adecuado (normalmente 5-20 mg de complejo de lipoproteína cargada/ml) que es conveniente para, por ejemplo, la inyección intravenosa. En una realización preferida el polvo liofilizado se rehidrata con solución salina tamponada con fosfato, solución salina de bicarbonato, o una solución salina fisiológica. La mezcla se puede agitar o someterse a vortización para facilitar la rehidratación. En general, la etapa de reconstitución debe llevarse a cabo a una temperatura igual a o mayor que la temperatura de transición de la fase del componente lípido de los complejos. En minutos de reconstitución, debe darse como resultado una preparación transparente de complejos de lipoproteínas cargadas reconstituidos.

**[0104]** Otros procedimientos incluyen el secado por pulverizado, en el que las disoluciones se pulverizan y el disolvente se evapora (tanto a temperaturas elevadas como a presiones reducidas). Los lípidos y las apolipoproteínas podrían solubilizarse en el mismo disolvente o en diferentes disolventes. La carga del polvo se puede usar a continuación para rellenar viales.

**[0105]** El polvo liofilizado de las apolipoproteínas y los lípidos podría también mezclarse mecánicamente. El polvo homogéneo que contiene las apolipoproteínas y los lípidos podría a continuación hidratarse para formar complejos espontáneamente del tamaño adecuado y la relación lípido;apolipoproteína adecuada.

**[0106]** Se puede caracterizar una alícuota de la preparación reconstituida resultante para confirmar que los complejos en la preparación tienen la distribución de tamaños deseada; por ejemplo, la distribución de tamaños del HDL. Se puede llevar a cabo la caracterización de la preparación reconstituida usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, filtración por exclusión de tamaño, filtración en gel, filtración en columna y cromatografía de permeación en gel, y electroforesis en gel no desnaturizante.

**[0107]** Por ejemplo, tras la hidratación del polvo de lipoproteína cargada liofilizada o al final de la homogeneización o la diálisis del colato, las partículas de Apo-lípido similares al HDL formadas se caracterizan con respecto a su

tamaño, concentración, pH final y osmolalidad de la disolución resultante, en algunos ejemplos, se caracterizan la integridad del lípido y/o la apolipoproteína. El tamaño de las partículas de lipoproteínas cargadas resultantes es determinante de su eficacia, por tanto, esta medida se incluye normalmente para la caracterización de las partículas.

5 **[0108]** En algunos casos, la cromatografía de permeación en gel (GPC), se puede usar, por ejemplo, un sistema de cromatografía líquida de alta presión equipado con una columna Superdex™ de 1 x 30 cm (Pharmacia Biotech) y un detector UV. Los complejos se eluyen con solución salina tamponada con bicarbonato comprendida por NaCl 140 mM y bicarbonato de sodio 20 mM administrada con un caudal de 0,5 ml/min. Una cantidad típica de complejo inyectado es de 0,1 a 1 mg basándose en el peso de la proteína. Los complejos se pueden vigilar mediante la  
10 absorbancia a 280 nm.

**[0109]** La concentración de proteínas y lípidos de la disolución de partículas de lipoproteínas cargadas se puede medir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ensayos de proteínas y fosfolípidos así como mediante procedimientos cromatográficos tales como HPLC, cromatografía de filtración en gel, GC acoplada con diversos detectores que incluyen la espectrometría de masas, UV o ensayos con diodos, fluorescentes, dispersión elástica de la luz y otros. Se puede determinar también la integridad de los lípidos y las proteínas mediante las mismas técnicas cromatográficas que para la cartografía de péptidos, gel de SDS-page, y secuenciación N y C terminal de las proteínas y ensayos normalizados para determinar la oxidación de lípidos para los lípidos.  
15

**[0110]** Se puede medir la homogeneidad y/o la estabilidad de los complejos o composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de filtración en gel. Por ejemplo, en algunos ejemplos, un pico sencillo o un número limitado de picos pueden asociarse con un complejo estable. Se puede determinar la estabilidad de los complejos vigilando la aparición de los nuevos picos en el tiempo. La aparición de los nuevos picos es un signo de la reorganización entre los complejos debida a la inestabilidad de las partículas.  
20  
25

**[0111]** Se puede determinar la relación óptima de fosfolípidos a apolipoproteína(s) en los complejos cargados usando cualquier número de ensayos funcionales conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ensayo de movilidad por electroforesis en gel, cromatografía de exclusión por tamaño interacción con receptores del HDL, reconocimiento mediante un transportador del casete de unión a ATP (ABCA1), captación por el hígado, y farmacocinética/farmacodinámica. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de movilidad por electroforesis en gel para determinar la relación óptima de fosfolípidos a apolipoproteínas en los complejos cargados. Los complejos cargados descritos en la presente memoria descriptiva deben presentar una movilidad electroforética que sea similar a las partículas pre-beta-HDL o alfa-HDL naturales. De esta manera, en algunos ejemplos, se pueden usar partículas pre-beta-HDL o alfa-HDL naturales como estándares para determinar la movilidad de los complejos cargados.  
30  
35

**[0112]** Como ejemplo adicional, se puede usar la cromatografía de exclusión por tamaño para determinar el tamaño de los complejos cargados descritos en la presente memoria descriptiva en comparación con las partículas pre-beta-HDL naturales. Las partículas pre-beta-HDL naturales generalmente no son más grandes de 10 – 12 nm, y las partículas discoidales son normalmente de aproximadamente 7 – 10 nm.  
40

**[0113]** Como ejemplo adicional, se pueden usar los receptores de HDL en un ensayo funcional para identificar qué complejo está más cercano a las partículas pre-beta-HDL, o para identificar qué complejo es el más eficaz en la eliminación y/o movilización del colesterol o de los lípidos de una célula. En un ensayo, los complejos se pueden ensayar para su capacidad de unirse a los receptores de ABCA-1. Dicho ensayo puede diferenciar ABCA-1 dependiente o independientemente de la eliminación del colesterol. Incluso aunque se consideren a los ApoA-I los mejores ligandos para dicho ensayo, los complejos tales como pequeñas partículas micelares o pequeñas partículas discoidales son también potentes ligandos de ABCA-I. Los ensayos de unión a ABCA-1 que se pueden usar se describen en Brewer y col., 2004, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 1755 – 1760).  
45  
50

**[0114]** Como ejemplo adicional, se sabe que las células que expresan ABCA1 reconocen ApoA-1 libre y en una menor extensión, las partículas pre-beta-HDL naturales (Brewer y col., 2004, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 1755 – 1760). En estos ejemplos, el reconocimiento de las células ABCA1 de las partículas pre-beta-HDL naturales se puede comparar con uno cualquiera de los complejos cargados descritos en la presente memoria descriptiva para identificar el complejo que se asemeja más estrechamente con las partículas pre-beta-HDL naturales.  
55

**[0115]** Un enfoque relativamente sencillo para identificar los complejos cargados que se asemejan más estrechamente a las partículas pre-beta-HDL naturales es perfundir los hígados con una disolución que contenga los complejos cargados reconstituidos y medir la cantidad que el hígado captura.  
60

**[0116]** En algunos casos, se puede medir la farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD) de los complejos cargados tras una única inyección en conejos. En estos ejemplos, se usa la concentración de ApoA-1 como un marcador de la

cinética. La farmacodinámica se puede medir como la cantidad de colesterol movilizado por encima del valor inicial tras una única inyección, así como la cantidad de colesterol en la fracción de HDL. PK y PD dependen de la naturaleza de los fosfolípidos, la composición de los fosfolípidos, la relación molar lípido: apolipoproteína y la concentración de fosfolípidos del complejo. Por ejemplo los complejos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)/ApoA-1 tienen una semivida más larga que los complejos de fosfatidilcolina (BPC)/ApoA-I. Los complejos de Esfingomielina/ApoA-1 tienen una semivida más larga que los complejos de EPC/ApoA-1. La semivida de ApoA-1 es seres humanos es aproximadamente de 5 a 6 días.

[0117] En otro ejemplo, la farmacodinámica del complejo cargado se puede medir siguiendo la velocidad de esterificación del colesterol en la fracción de HDL en el tiempo. LCAT es la única enzima responsable de la esterificación del colesterol en sangre. La velocidad de esterificación del colesterol es un buen parámetro para acceder a la calidad de la partícula. LCAT actúa como una sonda molecular, la velocidad de esterificación será mayor si LCAT reconoce el complejo cuaternario. Esto significa que la superficie es ideal, la carga es ideal, la morfología es ideal y los dos sustratos (LCAT hidroliza en primer lugar una cadena de acilo a partir de unos fosfolípidos (actividad esterasa) y a continuación esterifica el OH libre a partir del colesterol (actividad esterasa) para formar un éster de colesterilo) son accesibles y en las concentraciones adecuadas. También, esto significa que la partícula está bien dimensionada y compuesta para solubilizar y atrapar los productos de la reacción: de otra manera, el lisofosfolípido y el éster de colesterilo podrían detener la reacción.

#### 6.4 Composiciones farmacéuticas

[0118] Las composiciones farmacéuticas contempladas por la divulgación comprenden complejos de lipoproteínas cargadas como ingrediente activo en un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración y liberación in vivo. Debido a que los péptidos pueden comprender términos ácidos y/o básicos y/o cadenas secundarias, se pueden incluir apolipoproteínas miméticas de péptidos en las composiciones tanto en forma de ácidos como de bases libres, o en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Se pueden usar también proteínas modificadas tales como proteínas amidadas, aciladas, acetiladas o pegiladas.

[0119] Las composiciones inyectables incluyen suspensiones, disoluciones o emulsiones estériles del ingrediente activo en vehículos acuosos u oleosos. Las composiciones pueden comprender también agentes de formulación, tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes. Las composiciones para inyección se pueden presentar en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, y pueden comprender conservantes añadidos. Para la infusión, se puede suministrar una composición en una bolsa de infusión preparada de material compatible con complejos de lipoproteínas cargadas, tales como vinil acetato de etileno o cualquier otro material compatible conocido en la técnica.

[0120] Alternativamente, se pueden proporcionar las composiciones inyectables en forma de polvo para la reconstitución con un vehículo adecuados, incluyendo, pero sin limitarse a, agua exenta de pirógeno estéril, disolución de dextrosa, etc, antes del uso. A este fin, se puede liofilizar Apo, o se pueden preparar complejos de lipoproteínas cargadas liofilizados simultáneamente. Las composiciones almacenadas se pueden suministrar en formas de dosificación unitaria y reconstituirse antes del uso in vivo.

[0121] Para la administración prolongada, se puede formular el ingrediente activo como una composición de depósito, para la administración mediante implante; por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, o intramuscular. De esta manera, por ejemplo, se puede formular el complejo Apo-lípido o la Apolipoproteína con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable, o en una espuma de fosfolípidos o resinas de intercambio iónico).

[0122] Alternativamente, se pueden usar sistemas de administración transdérmica fabricados como una placa o parche adhesivo para liberar lentamente el ingrediente activo para la absorción percutánea. A este fin, se pueden usar potenciadores de la permeación para facilitar la penetración transdérmica del ingrediente activo. Se puede conseguir un beneficio particular incorporando los complejos cargados descritos en la presente memoria descriptiva en un parche de nitroglicerina para uso en pacientes con cardiopatía isquémica e hipercolesterolemia.

[0123] Alternativamente, la administración podría llevarse a cabo localmente o intramuralmente (en el interior de la pared del vaso) usando un catéter o perfusor (véase, por ejemplo, la Publicación de los Estados Unidos 2003/0109442)

[0124] Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador que puede comprender una o más formas de dosificación unitaria que comprenden el ingrediente activo. El paquete puede comprender por ejemplo una hoja de metal o plástico, tal como un paquete blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para la administración.

## 6.5 Procedimientos de tratamiento

5 **[0125]** Los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se pueden usar para virtualmente cualquier objetivo para el cual los complejos de lipoproteínas hayan demostrado ser  
 10 útiles. En una realización específica, los complejos y composiciones se pueden usar para tratar o evitar la dislipidemia y/o virtualmente cualquier enfermedad, dolencia y/o trastorno asociado con la dislipidemia. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “dislipidemia” o “dislipidémico” se refieren a un nivel  
 15 anormalmente elevado o disminuido de lípidos en el plasma sanguíneo, incluyendo, pero sin limitarse a, el nivel alterado de lípidos asociado con las siguientes dolencias: cardiopatía coronaria; enfermedad de la arteria coronaria; enfermedad cardiovascular, hipertensión, restenosis, enfermedades vasculares o perivasculares; trastornos  
 20 dislipidémicos; dislipoproteinemia; elevados niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad, elevados niveles de colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad; bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad; elevados niveles de colesterol de lipoproteína Lp(a); elevados niveles de apolipoproteína B; aterosclerosis (que incluye el tratamiento y la prevención de la aterosclerosis; hiperlipidemia; hipercolesterolemia; hipercolesterolemia familiar (FH); hiperlipidemia familiar combinada (FCH); deficiencias de lipasa de la lipoproteína, tales como  
 25 hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia y de lipoproteína hipercolesterolémica.

20 **[0126]** Las enfermedades asociadas con la dislipidemia incluyen, pero no se limitan a cardiopatía coronaria, enfermedad de la arteria coronaria, síndrome coronario agudo, enfermedad cardiovascular, hipertensión, restenosis, enfermedades vasculares o perivasculares; trastornos dislipidémicos; dislipoproteinemia; elevados niveles de  
 25 colesterol de lipoproteínas de baja densidad, elevados niveles de colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad; bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad; elevados niveles de colesterol de lipoproteína Lp(a); elevados niveles de apolipoproteína B; aterosclerosis (que incluye el tratamiento y la prevención de la aterosclerosis; hiperlipidemia; hipercolesterolemia; hipercolesterolemia familiar (FH); hiperlipidemia familiar combinada (FCH);  
 30 deficiencias de lipasa de la lipoproteína, tales como hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia y de lipoproteína hipercolesterolémica.

30 **[0127]** Al usar los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva, se espera que sea eficaz una dosificación de fosfolípidos que varíe de aproximadamente 2 a 25 veces menos (en equivalentes de ApoA-I) que la dosificación eficaz actualmente conocida en la técnica, en el tratamiento o la prevención de la enfermedad o en lograr un efecto mejorado.

35 **[0128]** Los procedimientos pueden abarcar un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la dislipidemia, que comprende administrar a un sujeto un complejo o composición de lipoproteína cargada descrito en la presente memoria descriptiva en una cantidad eficaz para alcanzar un nivel en suero de apolipoproteína libre o complejada durante al menos un día tras la administración que esté en el intervalo de aproximadamente 10 mg/dl a 300 mg/dl por encima de un nivel de criterio inicial (inicial) antes de la administración.

40 **[0129]** Los procedimientos pueden abarcar un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la dislipidemia, que comprende administrar a un sujeto un complejo o composición de lipoproteína cargada descrito en la presente memoria descriptiva en una cantidad eficaz para alcanzar un nivel de concentraciones en plasma de una fracción de HDL-colesterol durante al menos un día tras la administración que sea al menos aproximadamente un 10 % mayor que una fracción de HDL-colesterol inicial antes de la administración.  
 45

50 **[0130]** Los procedimientos pueden abarcar un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la dislipidemia, que comprende administrar a un sujeto un complejo o composición de lipoproteína cargada descrito en la presente memoria descriptiva en una cantidad eficaz para alcanzar una concentración circulante en plasma de una fracción de HDL-colesterol que esté entre 30 y 300 mg/dl entre 5 minutos y 1 día después de la administración.

55 **[0131]** Los procedimientos pueden abarcar un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la dislipidemia, que comprende administrar a un sujeto un complejo o composición de lipoproteína cargada descrito en la presente memoria descriptiva en una cantidad eficaz para alcanzar una concentración circulante en plasma de ésteres de colesterol que esté entre 30 y 300 mg/dl entre 5 minutos y 1 día después de la administración.

60 **[0132]** Los procedimientos pueden abarcar un procedimiento en el tratamiento o protección de una enfermedad asociada con la dislipidemia, que comprende administrar a un sujeto un complejo o composición de lipoproteína cargada descrito en la presente memoria descriptiva en una cantidad eficaz para alcanzar un incremento en la excreción de colesterol fecal durante al menos un día tras la administración que es al menos aproximadamente de un 10 % por encima del nivel del criterio inicial (inicial) antes de la administración.

**[0133]** Los complejos o composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se

pueden usar solo o en tratamiento combinado con otros fármacos usados para tratar o evitar las dolencias anteriores. Dichos tratamientos incluyen, pero no se limitan a administración simultánea o secuencial de los fármacos implicados. Por ejemplo, en el tratamiento de la hipercolesterolemia o la aterosclerosis, se pueden administrar formulaciones de lipoproteínas cargadas con una cualquiera o más de los tratamientos disminuidores del colesterol actualmente en uso, resinas de ácidos biliares, niacina, estatinas, inhibidores de la absorción del colesterol y/o fibratos. Dicho régimen combinado puede producir efectos terapéuticos particularmente beneficiosos debido a que cada fármaco actúa sobre una diana diferente en la síntesis y el transporte del colesterol; es decir, recirculación del colesterol que afecta a las resinas de ácidos biliares, la población de quilomicrones y LDL; la población de VLDL y LDL afecta principalmente a la niacina; las estatinas inhiben la síntesis del colesterol, disminuyendo la población del LDL (y aumentando quizás la expresión del receptor de LDL); mientras que los complejos de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva afectan la RCT, aumentan el HDL y promueven la salida de colesterol.

**[0134]** Los complejos o composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se pueden usar junto con fibratos para tratar o prevenir la cardiopatía coronaria; enfermedad de la arteria coronaria; enfermedad cardiovascular, hipertensión, restenosis, enfermedades vasculares o perivasculares; trastornos dislipidémicos; dislipoproteinemia; elevados niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad, elevados niveles de colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad; bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad; elevados niveles de colesterol de lipoproteína Lp(a); elevados niveles de apolipoproteína B; aterosclerosis (que incluye el tratamiento y la prevención de la aterosclerosis; hiperlipidemia; hipercolesterolemia; hipercolesterolemia familiar (FH); hiperlipidemia familiar combinada (FCH); deficiencias de lipoproteína lipasa, tales como hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia y de lipoproteína hipercolesterolémica. Se describen a continuación as formulaciones a modo de ejemplo y los regímenes de tratamiento.

**[0135]** Los complejos o composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se pueden administrar mediante cualquier ruta adecuada que asegure la biodisponibilidad en la circulación. Una importante característica de las realizaciones que incluyen la SM es que los complejos de lipoproteínas cargadas se pueden administrar en dosis menores de 1-10 % de la dosis eficaz que se espera que sea eficaz, de la apolipoproteína (Apo) o del péptido Apo administrado solo, y en dosis 2 – 25 veces menores que la dosis eficaz requerida para la administración del PC de Apo de soja (o PC de Apo de huevo o Apo-POPC). Se requiere la administración a dosis (para la inyección intravenosa) tan bajas como aproximadamente 40 mg a 2 g/persona de apolipoproteína cada 2 a 10 días, más bien que las grandes cantidades de apolipoproteína (20 mg/kg a 100 mg/kg por administración cada 2 a 5 días, 1,4 g a 8 g para un ser humano de tamaño promedio) requeridas por los regímenes de tratamiento actualmente disponibles.

**[0136]** Los complejos o composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se pueden administrar en dosificaciones que incrementen la fracción pequeña de HDL, la fracción de HDL pre-beta, pre-gamma y tipo pre-beta, la fracción de HDL alfa, la fracción HDL3 y/o la fracción DL2. En algunos casos, las dosificaciones son eficaces para conseguir la reducción de la placa aterosclerótica tal como se midió mediante, por ejemplo, técnicas de formación de imágenes tales como formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) o ultrasonidos intravascular (IVUS). Los parámetros a seguir por el IVUS incluyen, pero no se limitan a, cambio en el porcentaje de volumen del ateroma desde el valor inicial y cambio en los parámetros totales de volumen del ateroma a seguir por la IRM incluyen; pero no se limitan a, los del IVUS y la composición de lípidos y calcificación de la placa.

**[0137]** La regresión de la placa podría medirse usando al paciente como su propio control (tiempo cero frente a tiempo t al final de la última infusión, o en las dos semanas después de la última infusión, o en los 3 meses, 6 meses, o 1 año después del inicio del tratamiento.

**[0138]** Se puede conseguir la administración mediante rutas parenterales de administración, incluyendo inyecciones intravenosas (IV), intramusculares (IM), intradérmicas, subcutáneas (SC), e intraperitoneales (IP). En algunos ejemplos, la administración es mediante un perfusor, un infiltrador o un catéter. En algunos ejemplos, los complejos de lipoproteínas cargadas se administran mediante inyección, mediante bomba subcutáneamente implantable o mediante una preparación de depósito, en cantidades que consigan una concentración circulante en suero igual a la obtenida a través de la administración parenteral. Los complejos podrían también absorberse en, por ejemplo, una prótesis endovascular u otro dispositivo.

**[0139]** La administración se puede conseguir mediante una variedad de diferentes regímenes de tratamiento. Por ejemplo, se pueden administrar periódicamente algunas inyecciones intravenosas durante un único día, no alcanzando el volumen total acumulativo de las inyecciones la dosis tóxica diaria. Alternativamente, se puede administrar una inyección intravenosa aproximadamente cada 3 a 15 días, preferiblemente aproximadamente cada 5 a 10 días, y lo más preferible aproximadamente cada 10 días. En otra alternativa más, se puede administrar una dosis en escalado, comenzando con aproximadamente 1 a 5 dosis en una dosis entre (50-200 mg) por administración, seguido a continuación por dosis repetidas de entre 200 mg y 1 g por administración. Dependiendo de las necesidades del paciente, la administración puede ser mediante infusión lenta con una duración de más de

una hora, mediante infusión rápida de una hora o menos, o mediante una única inyección en bolo.

**[0140]** La administración podría llevarse a cabo como un servicio de inyecciones y a continuación detenerse durante 6 meses a 1 año, y a continuación iniciarse otra serie. A continuación, se podrían administrar cada año o cada 3 a 5 años series de mantenimiento de inyecciones. Las series de mantenimiento podrían llevarse a cabo durante un día (perfusión para mantener un nivel en plasma especificado de complejos), algunos días (por ejemplo, cuatro inyecciones durante un periodo de ocho días) o algunas semanas (por ejemplo, cuatro inyecciones durante un periodo de cuatro semanas), y a continuación reiniciarse tras seis meses a un año.

**[0141]** Se pueden usar otras rutas de administración. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la absorción a través del tracto gastrointestinal mediante rutas orales de administración (incluyendo, pero sin limitarse a la ingestión, rutas bucales y sublinguales, siempre que se proporcionen las formulaciones adecuadas (por ejemplo, revestimientos entéricos) para evitar o minimizar la degradación del ingrediente activo, por ejemplo, en los ambientes rigurosos de la mucosa oral, el estómago y/o el intestino delgado. Alternativamente, se puede utilizar la administración mediante el tejido mucosal tal como en los modos vaginal y rectal de administración para evitar o minimizar la degradación en el tracto gastrointestinal. En otras realizaciones, las formulaciones de la invención se pueden administrar transcutáneamente (por ejemplo, transdérmicamente), o mediante inhalación. Se apreciará que la ruta preferida puede variar con la dolencia, edad y seguimiento del tratamiento por parte del receptor.

**[0142]** La dosis real de un complejo o composición de lipoproteína cargada descrito en la presente memoria descriptiva puede variar con la ruta de administración.

**[0143]** Los datos obtenidos en los sistemas de modelos animales descritos en las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166 (otorgadas a Dasseux y col.) muestran que los péptidos ApoA-I se asocian con el componente HDL, y tienen una semivida proyectada en seres humanos de aproximadamente cinco días. De esta manera, los complejos de lipoproteínas cargadas se pueden administrar mediante inyección intravenosa a una dosis entre aproximadamente 0,1 g – 1 g de complejo de lipoproteína cargada por administración cada 2 a 10 días por ser humano de tamaño promedio.

**[0144]** Se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de los diversos complejos de lipoproteínas cargadas usando procedimientos farmacéuticos normalizados en el cultivo celular o en animales experimentales para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DB50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población), La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL50/DE50. Se prefieren los complejos de lipoproteínas cargadas que presentan grandes índices terapéuticos. Los ejemplos no limitantes de los parámetros que se pueden seguir incluyen las transaminasas de la función hepática (niveles de criterios iniciales no superiores a 2X normal). Esto es una indicación mucho colesterol se dirige al hígado y no se puede asimilar dicha cantidad. Podría vigilarse también el efecto sobre los glóbulos rojos de la sangre, ya que la movilización del colesterol desde los glóbulos rojos de la sangre, los fragiliza, o afecta a su forma.

**[0145]** Los pacientes se pueden tratar desde unos pocos días a algunas semanas antes de un acto médico (por ejemplo, tratamiento preventivo), o durante o después de un acto médico. La administración puede ser paralela o simultánea con otro tratamiento invasivo, tal como, angioplastia, escisión de la carótida, rotoblader u trasplante de órgano (por ejemplo, corazón, riñón, hígado, etc)

**[0146]** Se pueden administrar complejos de lipoproteínas cargadas a un paciente cuya síntesis de colesterol está controlada por una estatina o un inhibidor de la síntesis del colesterol. En otros casos, los complejos de lipoproteínas cargadas se administran a un paciente que experimenta tratamiento con una resina de unión, por ejemplo, una resina semisintética tal como colestiramina, o con una fibra, por ejemplo, fibra vegetal, para atrapar las sales biliares y el colesterol, para aumentar la excreción de ácidos biliares y disminuir las concentraciones de colesterol en sangre.

## 6.6 Otros usos

**[0147]** Los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas descritos en la presente memoria descriptiva se pueden usar en ensayos in vitro para medir el HDL en suero, por ejemplo, a fines diagnósticos. Debido a que los péptidos ApoA-I, ApoA-II y Apo se asocian con el componente HDL del suero, los complejos de lipoproteínas cargadas se pueden usar como “marcadores” para la población de HDL, y las poblaciones pre-beta1 y pre-beta2 HDL. Además, los complejos de lipoproteínas cargadas se pueden usar como marcadores para la subpoblación de HDL que son eficaces en la RCT. A este fin, se pueden añadir complejos de lipoproteínas cargadas a o mezclarse con una muestra de suero del paciente; después de un tiempo de incubación apropiado, se puede evaluar el componente HDL detectando los complejos de lipoproteínas cargadas incorporados. Esto se puede llevar a cabo usando complejos etiquetados de lipoproteínas cargadas (por ejemplo, radiomarcas, marcas fluorescentes, marcas enzimáticas, colorantes, etc), o mediante inmunoensayos usando anticuerpo (o fragmentos de anticuerpos) específicos de los complejos de lipoproteínas cargadas.

5 **[0148]** Alternativamente, los complejos etiquetados de lipoproteínas cargadas se pueden usar en procedimientos de formación de imágenes (por ejemplo, barridos CAT, barridos IRM) para visualizar el sistema circulatorio, o para vigilar la RCT, o para visualizar la acumulación de HDL en vetas de grasa, lesiones ateroscleróticas, y similares, en el que el HDL debe ser activo en la salida del colesterol.

**[0149]** Los ejemplos y datos asociados con la preparación y caracterización de algunos complejos proApoA-1 lípidos se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2004/0067873.

10 **[0150]** Los datos obtenidos en un sistema de modelo animal que utiliza algunos complejos proApoA-1 lípidos se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2004/0067873

## 7. EJEMPLOS

### 15 **Ejemplo 1: Preparación de proApoA-I, Esfingomielina, y Fosfatidilglicerol**

20 **[0151]** La Unite de Biotechnologie, Institut Meurice, Hte Ecole Lucia De Brouckère, 1 Avenue Emile Gryzon, B-1070 Anderlecht, Bélgica, suministró la proteína proApoA-I en matraces de 100 ml individuales liofilizados que contenían aproximadamente 90 mg de proteína. El número de lote fue 20060202. La proteína se mantuvo a aproximadamente 4 °C hasta el uso. Antes de la liofilización, el contenido de proApo-I era de 3,225 mg/ml con un contenido en urea de aproximadamente 0,011 1 mg/ml. Se preparó una disolución de proApoA-I disolviendo aproximadamente 630 mg de proApoA-I en 25,6 ml de ácido acético/agua al 5 %. La concentración final de la disolución fue de 25 mg/ml.

25 **[0152]** NOF Corporation, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-Shi, 660-0095, Japón, suministró esfingomielina de huevo (Coatsome® No-10). El número de lote era 0502ES1. La esfingomielina se mantuvo a aproximadamente -20 °C hasta el uso. La pureza de la esfingomielina era del 99,1 %. Se preparó una disolución de esfingomielina disolviendo 799,4 mg de esfingomielina purificada en 16 ml de ácido acético/agua al 5 % para dar como resultado una concentración final de 50 mg/ml.

30 **[0153]** NOF Corporation, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-Shi, 660-0095, Japón, suministró 1,2-dipalmitoil-SN-glicero-3-fosfatidilglicerol como sal de sodio (DPPG-Na, Coatsome® MG-6060LS). El número de lote era 0309651L. DPPG-Na se mantuvo a aproximadamente -20 °C hasta el uso. La pureza de DPPG-Na era del 99,2 %. Se preparó una disolución de DPPG-Na disolviendo 49,1 mg de DPPG-Na en 1 ml de ácido acético/agua al 5 % para dar como resultado una concentración final de 50 mg/ml.

### **Ejemplo 2: Preparación de complejos de control de lipoproteínas no cargadas**

40 **[0154]** Se prepararon complejos de control de lipoproteínas no cargadas consistentes en proApoA-I (33 % en peso) y esfingomielina (67 % en peso) tal como se describe a continuación.

45 **[0155]** Se prepararon formulaciones de complejos de control de lipoproteínas no cargadas mezclando 5,6 ml de proApoA-I a 25 mg/ml con aproximadamente 5,6 ml de esfingomielina a 50 mg/ml en matraz(ces) de vidrio de 100 ml. Se filtró la mezcla resultante a través de un filtro de nylon de 0,22 µm. Se calentó la mezcla a aproximadamente 50 °C y a continuación se congeló en nitrógeno líquido con agitación manual. Inmediatamente después de la congelación, los matraces se colocaron en un liofilizador durante 15 horas. Tras la liofilización, los matraces se colocaron a vacío a aproximadamente 40 °C durante 4 horas. Las formulaciones resultantes se almacenaron a aproximadamente 4 °C hasta el uso.

50 **[0156]** Se añadieron catorce ml de una disolución que contenía NaCl 140 mM y NaHCO<sub>3</sub> 20 mM a un matraz de vidrio que contenía una formulación liofilizada de un complejo de control de lipoproteína no cargada. La disolución resultante se ajustó a un pH básico añadiendo 0,75 ml de NaOH 1M en 20 ml de disolución. La disolución se agitó manualmente, se calentó a aproximadamente 50 °C, y a continuación se colocó en un baño de ultrasonidos durante al menos una hora. La concentración de proApoA-I en la formulación resultante era de 10 mg/ml. Se inyectó(arón) la(s) formulación(es) en un sistema HPLC para comprobar la presencia de complejos de lipoproteínas no cargadas. La FIG. 1 proporciona un ejemplo de un cromatograma de HPLC de un complejo de lipoproteína no cargada preparado tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

### 60 **Ejemplo 3: Preparación de complejos de prueba de lipoproteínas cargadas**

**[0157]** Se prepararon complejos de lipoproteínas cargadas consistentes en proApoA-I (33 % en peso), esfingomielina (65 % en peso) y fosfatidilglicerol (2 % en peso) tal como se describe a continuación.

**[0158]** Se prepararon formulaciones de complejos de lipoproteínas cargadas mezclando 5,6 ml de proApoA-I a 25

mg/ml con aproximadamente 5,6 ml de esfingomiélin a 50 mg/ml, y aproximadamente 0,15 ml de DPPG-Na a 50 mg/ml en un(os) matraz(ces) de vidrio de 100 ml y a continuación se filtró la mezcla resultante a través de un filtro de nylon de 0,22 µm. se calentó la mezcla a aproximadamente 50 °C y se congeló en nitrógeno líquido con agitación manual. Inmediatamente después de la congelación, los matraces se colocaron en un liofilizador durante 15 horas.

5 Tras la liofilización, los matraces se colocaron a vacío a aproximadamente 40 °C durante 4 horas. La formulación resultante se almacenó a aproximadamente 4 °C hasta el uso.

10 **[0159]** Se añadieron catorce ml de NaCl 140 mM y NaHCO<sub>3</sub> 20 mM a un matraz de vidrio que contenía la formulación liofilizada descrita anteriormente. La disolución resultante se ajustó a un pH básico añadiendo 0,75 ml de NaOH 1M en 20 ml de disolución. La disolución se agitó manualmente, se calentó a aproximadamente 50 °C, y a continuación se colocó en un baño de ultrasonidos durante al menos una hora. La concentración de proApoA-I en la formulación resultante era de 10 mg/ml. La(s) formulación(es) se inyectó(aron) en un sistema HPLC para comprobar la presencia de complejos de lipoproteínas no cargadas. La FIG.2 proporciona un ejemplo de un cromatograma de HPLC de un complejo de lipoproteína cargada preparado tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

15 **Ejemplo 4: Sistema de modelo animal**

20 **[0160]** Se utilizaron conejos macho New Zealand que pesaban entre 3 y 4 kg para la prueba de movilización del colesterol por los complejos no cargados y cargados descritos anteriormente. CEGAV, Francia suministró los animales y se identificaron individualmente con un único tatuaje en la oreja. Se alojaron los conejos en las instalaciones de animales de Avogadro (Francia) en jaulas individuales. El alojamiento y el cuidado de los animales cumplió con las recomendaciones de la Directiva 86/609/EEC. Las instalaciones de animales de Avogadro tienen el número de licencia B 31 188 01 obtenido de las Autoridades Veterinarias Francesas. Se gestionaron todos los animales de manera similar y con el debido respeto por su bienestar de acuerdo con las prácticas prevalentes y los procedimientos operativos normalizados corrientes (SOP) en Avogadro. El equipo y los alojamientos animales se limpiaron a intervalos adecuados.

25 **[0161]** Las condiciones de alojamiento de los animales fueron como sigue: temperatura: 22 ± 2 °C, humedad relativa: 55 ± 15 %, y un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. La temperatura y la humedad relativa se registraron diariamente y se almacenaron con los datos brutos del estudio. Se observó cada conejo una vez al día, se registraron como observados cualesquiera hallazgos anormales, y se informó al Director del Estudio.

30 **[0162]** Los animales se aclimataron durante al menos 7 días antes del comienzo del estudio. Los animales recibieron una dieta de pienso controlada *a voluntad* sobre una base diaria. A lo largo del estudio, el agua estuvo disponible a voluntad.

35 **[0163]** Antes de la administración de los complejos, se hizo ayunar a los animales durante la noche. Se pesaron los animales justo antes de la administración de los complejos. Se administraron los complejos por vía intravenosa a una tasa de dosificación de 15 mg/kg que corresponde a 1,5 ml/kg. El volumen administrado se basó en el peso. Se reinició la alimentación aproximadamente 6 horas después de la administración de los complejos. Los detalles del tratamiento registrados incluyeron los cálculos de la dosificación, la dosis administrada, la fecha, y el tiempo de administración.

40 **[0164]** Antes de la recogida de muestras de sangre, se hizo ayunar a los animales durante la noche. Se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular o de la vena marginal de la oreja. Se extrajo la sangre de la vena yugular usando una jeringuilla montada con una aguja con EDTA (aproximadamente 1 ml de sangra por tiempo de muestreo). Inmediatamente después de la extracción, se mantuvieron las muestras de sangre a aproximadamente 4 °C para evitar la alteración de la muestra de sangre. Se centrifugaron los especímenes de sangre (3500 g durante 10 minutos a aproximadamente 5 °C). se separaron los especímenes de plasma y se distribuyeron en alícuotas (3 alícuotas de al menos 200 µl (alícuotas A, B, C)) y se almacenaron a aproximadamente -80 °C. Se descartó la sangre restante coagulada.

#### **Ejemplo 5: los complejos de lipoproteínas cargadas movilizan el colesterol**

45 **[0165]** Los complejos de lipoproteínas de control (formulación IIA) o los complejos de lipoproteínas cargadas (formulación IIB) se prepararon tal como se ha descrito anteriormente y se administraron a conejos (15 mg de complejo/kg de peso corporal), dos conejos por grupo.

50 **[0166]** Se tomaron muestras de sangre (1 ml) antes de la dosis, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 6 h después de la administración. Se analizaron muestra de plasma para el colesterol total, el colesterol libre y triglicéridos de acuerdo con los procedimientos publicados (véase, por ejemplo, Usui, S., y col., 2002, J. Lipid Res., 43: 805 – 14). Se calculó la concentración de colesterol esterificado sustrayendo el contenido de colesterol libre del contenido de colesterol total. En la FIG. 3 se ilustran los resultados del colesterol libre en HDL de cada animal. En la FIG. 4 se ilustran los valores promediados de los dos animales que comprenden el grupo control (grupo IIA) y el grupo de

prueba (grupo IIB).

5 **[0167]** Tal como se esperaba, los complejos de lipoproteínas control y de prueba movilizaron el colesterol, mostrando el promedio del grupo de prueba una movilización creciente en comparación con el promedio del grupo control.

**[0168]** Las realizaciones específicas descritas se ofrecen únicamente por medio de ejemplo, y la invención estará limitada solo por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un complejo de lipoproteína que comprende una fracción de la apolipoproteína ApoA-1 y una fracción lipídica, en el que dicha fracción lipídica consiste esencialmente en esfingomielina y aproximadamente 3 % en peso de un fosfolípido cargado negativamente, y la relación molar de la fracción lipídica respecto de la fracción de la apolipoproteína ApoA-1 está en el intervalo de aproximadamente 200: 1 a 2: 1.
- 10 2. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 1 en el que el fosfolípido cargado negativamente se selecciona entre un fosfatidilinositol, una fosfatidilserina, un fosfatidilglicerol, un ácido fosfatídico y sus mezclas.
3. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 1 en el que el fosfolípido cargado negativamente es fosfatidilglicerol.
- 15 4. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 1 en el que la esfingomielina comprende D-eritro-N-16: 0-esfingomielina y/o D-eritro-N-16: 0-dihidroesfingomielina.
- 20 5. El complejo de lipoproteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que las cadenas de acilo de la esfingomielina y/o el fosfolípido cargado negativamente, se seleccionan cada uno, independientemente entre sí, de entre un hidrocarburo saturado, uno monoinsaturado y uno poliinsaturado que contiene de 6 a 24 átomos de carbono.
6. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 5 en el que cada cadena de acilo de la esfingomielina y o del fosfolípido cargado negativamente es igual a la otra.
- 25 7. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 5 en el que las cadenas de acilo de la esfingomielina y el fosfolípido cargado negativamente contienen igual número de átomos de carbono.
8. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 5 en el que las cadenas de acilo de la esfingomielina y el fosfolípido cargado negativamente tienen diferentes grados de saturación.
- 30 9. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 1 en el que la apolipoproteína ApoA-1 se selecciona entre ApoA-I humano maduro, ApoA-I<sub>Milano</sub> maduro, ApoA-I<sub>Paris</sub> maduro y sus mezclas.
- 35 10. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 1 o 9 en el que la apolipoproteína ApoA-1 está en forma de un monómero.
11. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 1 en el que la apolipoproteína ApoA-1 es una apolipoproteína Apo-1 humana madura y el fosfolípido cargado negativamente es fosfatidilglicerol.
- 40 12. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 1 en el que la relación molar de la fracción lipídica a la fracción de la apolipoproteína ApoA-I está en el intervalo de aproximadamente 200: 1 a 100: 1.
- 45 13. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 1 en el que la relación molar de la fracción lipídica a la fracción de la apolipoproteína ApoA-1 está en el intervalo de aproximadamente 100: 1 a 30: 1.
- 50 14. El complejo de lipoproteína de la reivindicación en el que la apolipoproteína ApoA-I es una apolipoproteína ApoA-I, la esfingomielina es esfingomielina de huevo, el fosfolípido cargado negativamente es fosfatidilglicerol, y la relación molar de la fracción lipídica a la fracción de la apolipoproteína ApoA-I está en el intervalo de aproximadamente 200.1 a 100: 1.
- 55 15. El complejo de lipoproteína de la reivindicación 1 en el que la apolipoproteína ApoA-1 es una apolipoproteína ApoA-1 humana madura, la esfingomielina es esfingomielina de huevo, el fosfolípido cargado negativamente es fosfatidilglicerol, y la relación molar de la fracción lipídica a la fracción de la apolipoproteína ApoA-I está en el intervalo de aproximadamente 100: 1 a 30: 1.
- 60 16. Una composición farmacéutica que comprende un complejo de lipoproteína de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
17. Un complejo de lipoproteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto con dislipidemia, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de dicho complejo de lipoproteína.
18. El complejo de lipoproteína para uso de acuerdo con la reivindicación 17 en el que la cantidad de complejo de lipoproteína administrado es eficaz para aumentar el nivel en suero del sujeto de apolipoproteína ApoA-

1 complejada en aproximadamente 10-300 mg/dl en comparación con un nivel de criterio inicial.

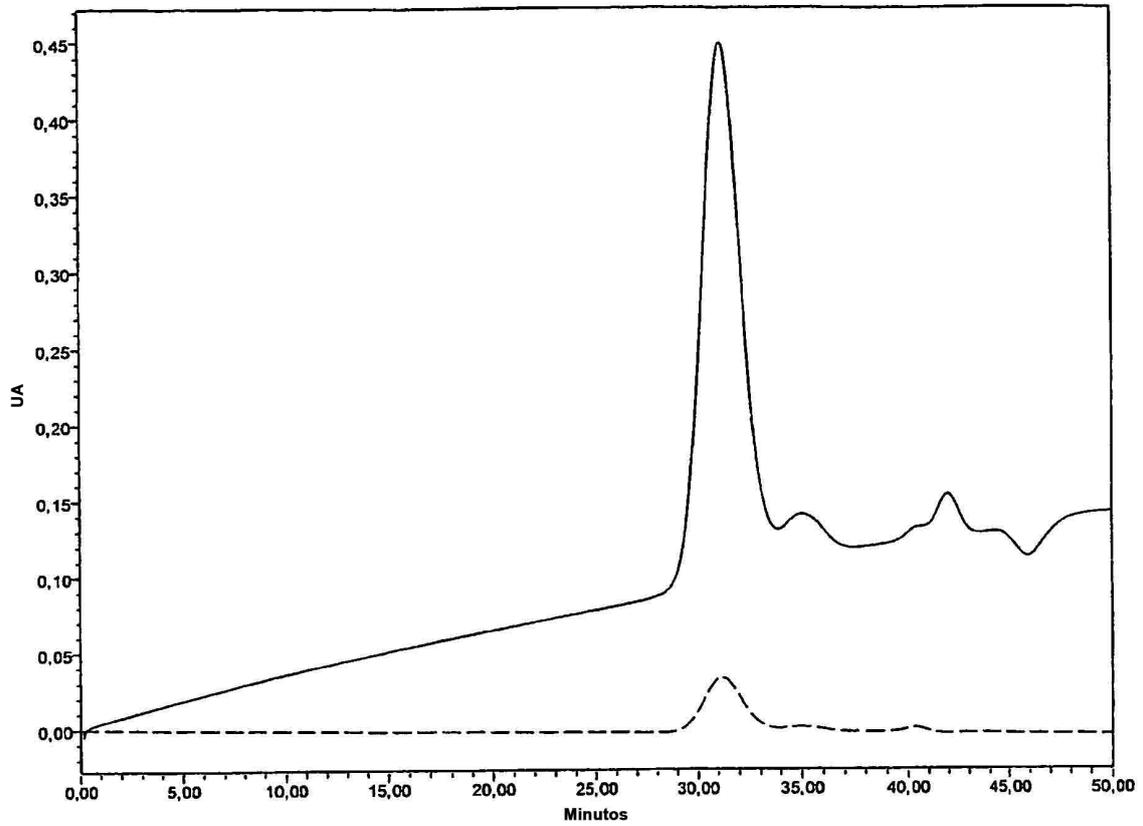
- 5 19. El complejo de lipoproteína para uso de acuerdo con la reivindicación 17 o 18 en el que la cantidad de complejo de lipoproteína administrado es suficiente para liberar aproximadamente 1 a 100 mg/kg de apolipoproteína ApoA-I.
20. El complejo de lipoproteína para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 en el que el complejo de lipoproteína se administra por vía intravenosa.
- 10 21. El complejo de lipoproteína para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20 en el que el complejo de lipoproteína se administra conjuntamente con una resina de ácidos biliares, niacina, una estatina, un fibrato y/o un inhibidor de la absorción del colesterol,
- 15 22. El complejo de lipoproteína para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21 en el que el complejo de lipoproteína se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende el complejo y un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 23. El complejo de lipoproteína para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en el que el sujeto tiene una o más dolencias asociadas a dislipidemia seleccionadas entre inflamación, enfermedad de Alzheimer, ictus, ictus isquémico, ataque isquémico transitorio, infarto de miocardio, angina de pecho, hipertensión renovascular, insuficiencia renovascular, cojera intermitente, isquemia crítica de extremidades, dolor en reposo, gangrena, cardiopatía coronaria, enfermedad de la arteria coronaria, síndrome coronario agudo, enfermedad cardiovascular, hipertensión, restenosis, enfermedad vascular, enfermedad perivascular, dislipoproteinemia, elevados niveles de colesterol de lipoproteína de baja densidad, elevados niveles de colesterol de lipoproteína de muy baja densidad, bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad, elevados niveles de colesterol Lp(a) de lipoproteína, elevados niveles de apolipoproteína B, aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada, y deficiencia de lipoproteína lipasa.
- 25 24. El complejo de lipoproteína para uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que la deficiencia de lipoproteína lipasa es hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia, o lipoproteína hipercolesterolémica.
- 30 25. El complejo de lipoproteína para uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que la dolencia asociada con dislipidemia es aterosclerosis, síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, angina, o ictus.
- 35 26. Uso de un complejo de lipoproteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto con dislipidemia.
- 40 27. El uso de la reivindicación 26 en el que la cantidad de complejo de lipoproteína para la administración es eficaz para aumentar el nivel en suero del sujeto de la apolipoproteína ApoA-1 libre o complejada en aproximadamente 10-300 mg/dl en comparación con el nivel criterio inicial.
28. El uso de la reivindicación 26 o la reivindicación 27 en el que la cantidad del complejo de lipoproteína para la administración es suficiente para liberar aproximadamente 1 a 100 mg/kg de apolipoproteína ApoA-I.
- 45 29. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 en el que el complejo de lipoproteína es para la administración intravenosa.
30. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29 en el que el complejo de lipoproteína es para la administración complementaria con una resina de ácidos biliares, niacina, una estatina, un fibrato y/o un inhibidor de la absorción del colesterol.
- 50 31. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30 en el que el complejo de lipoproteína es para la administración en la forma de una composición farmacéutica que comprende el complejo y un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable
- 55 32. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31 en el que el sujeto tiene una o más dolencias asociadas a dislipidemia seleccionadas entre inflamación, enfermedad de Alzheimer, ictus, ictus isquémico, ataque isquémico transitorio, infarto de miocardio, angina de pecho, hipertensión renovascular, insuficiencia renovascular, cojera intermitente, isquemia crítica de extremidades, dolor en reposo, gangrena, cardiopatía coronaria, enfermedad de la arteria coronaria, síndrome coronario agudo, enfermedad cardiovascular, hipertensión, restenosis, enfermedad vascular, enfermedad perivascular, dislipoproteinemia, elevados niveles de colesterol de lipoproteína de baja densidad, elevados niveles de colesterol de lipoproteína de muy baja densidad, bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad, elevados niveles de colesterol Lp(a) de lipoproteína, elevados niveles de apolipoproteína B, aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada, y
- 60

deficiencia de lipoproteína lipasa.

33. El uso de la reivindicación 32 en el que la deficiencia de la lipoproteína lipasa es hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia, o lipoproteína colesterolémica.

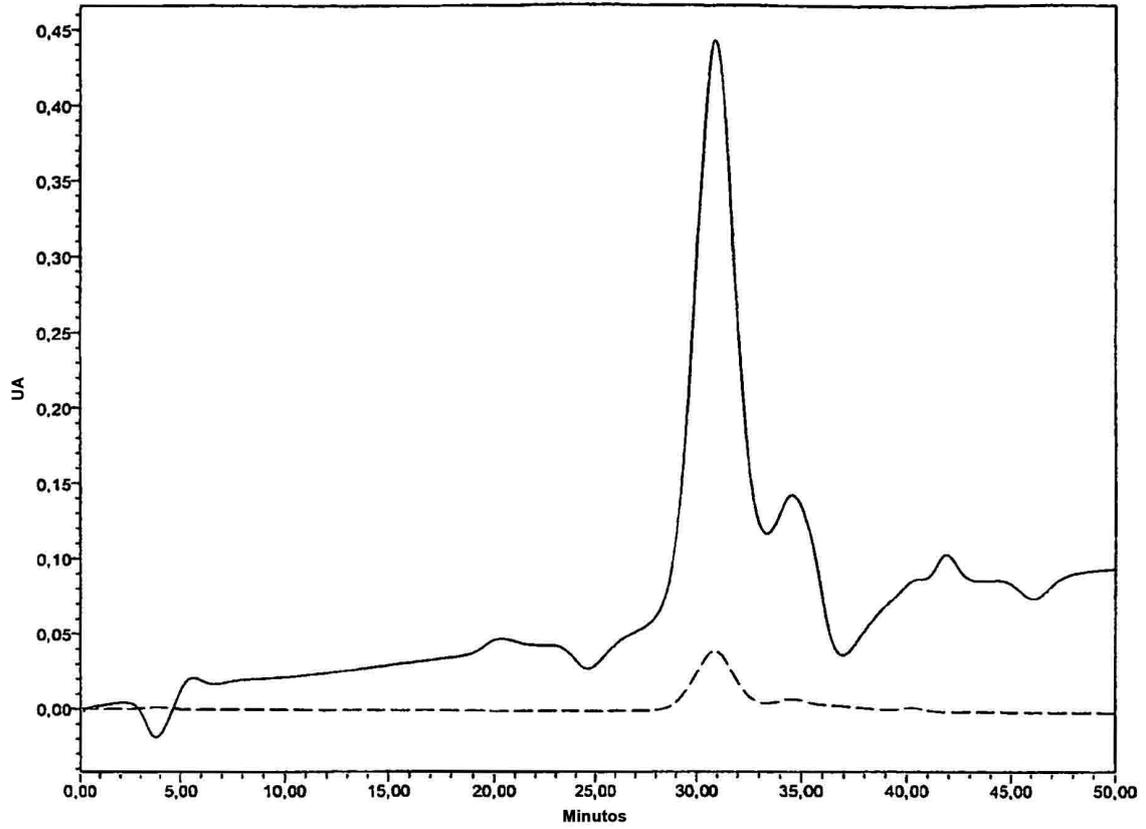
5

34. El uso de la reivindicación 32, en el que la dolencia asociada a dislipidemia es aterosclerosis, síndrome coronario agudo, infarto d miocardio, angina, o ictus.



———— Lípidos (220 nm)  
- - - - Proteínas (280 nm)

**FIG. 1**



————— **Lípidos (220 nm)**

- - - - - **Proteínas (280 nm)**

**FIG. 2**

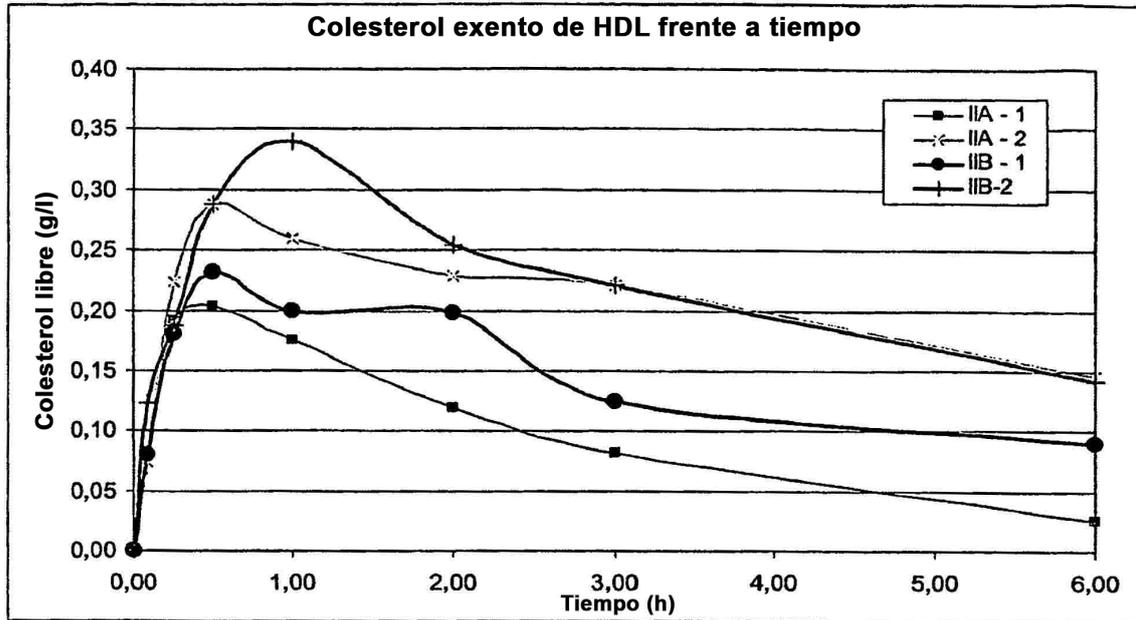


FIG. 3

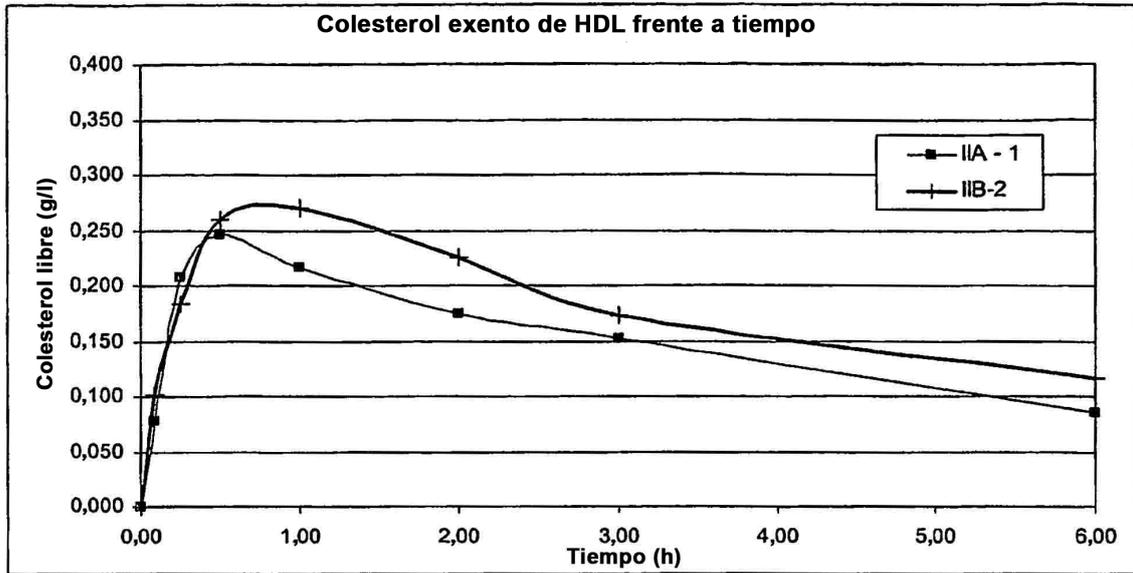


FIG. 4