

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 905**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 5/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07250870 .8**
96 Fecha de presentación: **01.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1964571**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **Tratamiento de disfunción endotelial en pacientes diabéticos**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.09.2012

73 Titular/es:
CSL LIMITED
45 POPLAR ROAD
PARKVILLE, VIC 3052, AU

72 Inventor/es:
Stroes, Erik S.G.

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 386 905 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

Tratamiento de disfunción endotelial en pacientes diabéticos

Campo de la invención

5 Esta invención se relaciona con un método para el tratamiento de disfunción endotelial en pacientes diabéticos. En particular, esta invención se relaciona con un método para mejorar la función endotelial en el tratamiento de trastornos que se relacionan con la disfunción endotelial, tanto macrovascular como microvascular, en pacientes diabéticos.

Antecedentes de la invención

10 En la enfermedad crónica diabetes mellitus (diabetes), el cuerpo pierde la capacidad de producir o responder adecuadamente a la hormona insulina, de tal manera que las células de los tejidos periféricos no toman de forma activa la glucosa de la sangre para su uso o almacenamiento. En el individuo diabético, el nivel de la glucosa en la sangre periférica se puede elevar (hiperglucemia) y por lo general permanece así a menos que se emplee alguna forma de intervención (por ejemplo, administración de insulina exógena) para que la glucosa en la sangre vuelva a niveles normales. Si no se controla, la hiperglucemia de individuos diabéticos puede dar lugar a *shock*, degeneración o falla de los órganos (por ejemplo, insuficiencia renal, ceguera, enfermedad nerviosa, enfermedad cardiovascular), necrosis de los tejidos (por ejemplo, que necesitan amputación de los pies), e incluso la muerte

15 Dos formas independientes de la diabetes son la diabetes de tipo 1 y tipo 2. La diabetes de tipo 1, que se conoce previamente como diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM) o diabetes juvenil, es una enfermedad autoinmune en la cual el cuerpo destruye las células β que producen la insulina (células de islotes) del páncreas que resultan en un requisito indispensable para la administración diaria de la insulina exógena para mantener los niveles normales de glucosa en sangre. Usualmente, la diabetes de tipo 1 se diagnostica en niños y adultos jóvenes, pero pueden ocurrir a cualquier edad. La diabetes de tipo 1 representa el 5-10% de los casos diagnosticados de diabetes.

20 Con mucho, la forma más frecuente de la diabetes es la diabetes tipo 2, que se conoce previamente como diabetes mellitus no dependiente de la insulina (NIDDM). Previamente la diabetes tipo 2, también se conoció como diabetes del adulto, sin embargo, cada vez con más frecuencia esta forma de diabetes se está haciendo prevalente en la población creciente de niños obesos clínicamente y con sobrepeso y en adultos jóvenes. La diabetes tipo 2 representa aproximadamente el 90-95% de todos los casos diagnosticados de diabetes. Por lo general, la diabetes tipo 2 comienza con resistencia a la insulina, un trastorno en el cual las células del cuerpo no responden adecuadamente a la insulina, seguido por una pérdida gradual en parte del páncreas para producir y secretar la insulina. La diabetes tipo 2 se asocia con una variedad de factores incluyendo edad avanzada, obesidad, antecedentes familiares de diabetes, antecedentes de diabetes gestacional, metabolismo alterado de la glucosa, inactividad física, y diversas razas o grupos étnicos. Los individuos con diabetes tipo 2 deben tratar de controlar su nivel glucosa en sangre con una dieta cuidadosa, ejercicio y reducción de peso, y medicamentos adicionales.

25 Los principales factores que contribuyen al estado pro-aterogénico en la diabetes, particularmente la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), incluyen dislipidemia, hiperglicemia, hipertensión, obesidad visceral y resistencia a la insulina (1,2). Estudios observacionales han demostrado claramente la importancia de la dislipidemia diabética para contribuir a la aterogénesis en la diabetes, ilustrada por el hecho que la correlación entre las lipoproteínas de baja densidad (LDL) así como lipoproteínas de alta densidad (HDL) contra eventos cardiovasculares superan la de la glucosa en plasma en ayunas (3). Los estudios de intervención de la estatina han demostrado un beneficio claro del tratamiento con estatina en la reducción de eventos cardiovasculares en DM2 (4, 5); sin embargo, a pesar de este logro impresionante, la mayoría de los pacientes con DM2 aún sufren de eventos cardiovasculares, incluso cuando utilizan estatinas (6).

35 Durante las dos últimas décadas, la disfunción endotelial se ha convertido en una de las etapas más tempranas de la aterogénesis. Se ha demostrado que la disfunción endotelial, la cual es un signo característico en todos los pacientes diabéticos (i.e tanto de tipo 1 y 2) tiene un valor predictivo de futuros eventos cardiovasculares (7-9). De acuerdo con la patogénesis multifactorial de la enfermedad vascular inducida por la diabetes (10, 11), se han evaluado numerosas intervenciones terapéuticas por su potencial para mejorar la función endotelial en pacientes con DM2 (9, 12). Sorprendentemente, mientras que la función endotelial podría estar completamente restaurada mediante la terapia con estatinas en pacientes dislipidémicos (13), varios estudios han demostrado que incluso un tratamiento intenso con estatina no puede normalizar la disfunción vascular en DM2 (14, 15). Esto últimos hacen hincapié en las posibilidades de modalidades terapéuticas adicionales en este grupo de alto riesgo.

45 Las lipoproteínas de alta densidad (HDLs) representan un amplio grupo de las lipoproteínas en plasma sobre todo las esféricas, los cuales muestran una considerable diversidad en su tamaño, apolipoproteína (apo) y composición lipídica. Las partículas de HDL caen en el rango de densidad de 1.063-1.21 g/ml (16) y ya que son más

pequeñas que las otras lipoproteínas, las HDLs pueden penetrar entre las células endoteliales más fácilmente permitiendo que concentraciones relativamente altas se acumulen en los fluidos del tejido (17). La principal apolipoproteína de casi todas las HDLs en plasma es la apo A-I, la cual en asociación con los fosfolípidos y el colesterol, encierra un núcleo de ésteres de colesterol (16). Las HDLs nacientes (i.e. sintetizadas recientemente) secretadas por el hígado y el intestino no contienen ésteres de colesterol y son de forma discoidal (16). La asociación negativa de la concentración de HDL en plasma con enfermedad de arteria coronaria ha sido bien documentada en estudios epidemiológicos (18). Aunque experimentos en animales han demostrado una actividad anti-aterogénica de las HDLs (19), todavía no se sabe si este efecto protector se relaciona con el papel de la lipoproteína en el transporte inverso del colesterol o con un mecanismo diferente. El mecanismo/mecanismos a través de los cuales las HDLs proveen estas acciones cardioprotectoras no se entiende claramente, pero pueden incluir un papel de HDLs en el transporte reverso del colesterol a partir de tejidos periféricos al hígado, inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, o modulación de la vasodilatación y activación de las plaquetas mediada por cambios en la producción de la prostaciclina (20). Las HDLs también pueden activar la sintasa del óxido nítrico (NO) endotelial posterior a su interacción con el receptor-B1 secuestrante (SR-B1).

En vista de los datos emergentes sobre los efectos promotores de NO de HDL, los compuestos con capacidad de aumentar la HDL son de interés particular (21-24). De hecho, en HDL de pacientes con DM2, se asocia positivamente con respuestas del vasomotor dependiente del endotelio (8). En el trabajo que conduce a la presente invención, los inventores han evaluado si y en qué medida HDL aumenta con la infusión de HDL exógena reconstituida (rHDL) se traduciría en una mejora de función vascular. Los niveles de ApoA-I y la función endotelial fueron evaluadas tanto agudamente (4 horas después de la infusión), así como 7 días después de la infusión de rHDL en DM2 y los controles correspondientes.

Los detalles bibliográficos de las publicaciones mencionadas en esta especificación se mencionan al final de la descripción. La referencia a cualquier documento de la técnica anterior en la especificación no es, y no se debería tomar como, un reconocimiento o ninguna forma de sugerencia de que el documento forma parte del conocimiento general común.

Resumen de la invención

A lo largo de esta especificación y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprenden", y/o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un número entero indicado o etapa o grupo de números enteros o etapas pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

El objeto de la invención se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 es un diagrama que muestra que la infusión intra-arterial del vasodilatador dependiente del endotelio serotonina aumentó el flujo sanguíneo del antebrazo (FBF) de una manera dependiente de la dosis en voluntarios saludables y pacientes con DM2. Al inicio del estudio, la respuesta del FBF a la serotonina se atenuó en DM2 en comparación con los controles ($p < 0.001$). Después de la infusión de rHDL, la respuesta de FBF a la serotonina aumentó significativamente, pero no alcanzó los niveles comparables con los controles ($p < 0.01$). La mejora en la vasodilatación dependiente del endotelio persistió 7 días después de la infusión de rHDL ($p < 0.01$). La infusión de rHDL no afectó la respuesta de la serotonina en los controles.

Figura 2 es un diagrama que muestra que en el inicio del estudio la respuesta del vasoconstrictor a L-NMMA, que refleja la actividad óxido nítrico (NO) basal, fue bloqueada en pacientes con DM2 en comparación con los controles ($p < 0.001$). Después de la infusión de rHDL, la respuesta del constrictor de L-NMMA se mejoró, incluso sigue presente 7 días después de la infusión ($p < 0.01$). De acuerdo con los datos de la serotonina, la infusión de rHDL no tuvo efecto en respuesta de L-NMMA en sujetos control.

Figura 3 es un diagrama que muestra que vasodilatación independiente del endotelio en respuesta a nitroprusiato de sodio fue inferior en DM2 contra los controles ($p < 0.01$) y la infusión de rHDL no mostró efecto sobre la respuesta del vasodilatador SNP tanto en pacientes como en controles

Descripción detallada de la invención

Los pacientes con diabetes, particularmente diabetes mellitus tipo 2 (DM2), se caracterizan por un aumento marcado en el riesgo cardiovascular. La disfunción endotelial sistémica, un signo característico en DM2, predice el riesgo futuro de eventos cardiovasculares. En vista de la relación entre HDL y la ruta de NO, los presentes inventores han evaluado el efecto de la infusión de rHDL en la función endotelial en DM2. Específicamente, en 7 pacientes con DM2 y 7 controles normolipidémicos, la función endotelial fue evaluada utilizando pletismografía de oclusión venosa. Se

determinaron las respuestas del flujo sanguíneo del antebrazo (FBF) a la infusión intra-arterial de la serotonina (5HT) de vasodilatadores independiente y dependiente del endotelio y nitroprusiato de sodio, respectivamente, y el inhibidor de óxido nítrico sintasa NG-monometil-1-arginina (L-NMMA), ambas antes de, 4 horas después de y 1 semana después de la infusión de rHDL (80mg/kg basándose en la proteína).

5 Al inicio del estudio HDL fue similar en DM2 contra los controles (1.1 ± 0.2 vs. 1.2 ± 0.3 mmol/L, ns). La vasodilatación inducida por 5HT (max $17 \pm 10\%$) y vasoconstricción inducida por L-NMMA (max - $17 \pm 15\%$) fueron reducidas en DM2 contra los controles (5-HT 114 ± 22 y L-NMMA $-48 \pm 5\%$, ambos $p < 0.05$). La infusión de rHDL elevó los niveles de apoA-I (1.2 ± 0.2 a 2.8 ± 0.4 vs. 1.2 ± 0.2 a 2.7 ± 0.4 g/L, $p < 0.01$) en DM2 y los controles, respectivamente y restauraron las respuestas de FBF a 5HT ($86 \pm 22\%$, $p < 0.05$) y L-NMMA ($-45 \pm 9\%$, $p < 0.01$) en
10 DM2. Este efecto persistió 7 días después de la infusión (5HT; $80 \pm 25\%$, $p < 0.05$ y L-NMMA $-37 \pm 7\%$, $p < 0.01$ en comparación con el valor inicial). La infusión de rHDL no tuvo efecto en los controles. En consecuencia, este trabajo demuestra que el aumento de HDL aguda mejora la función endotelial en DM2 y que la mejora persiste por al menos 7 días a pesar del regreso al valor inicial de la concentración de HDL.

15 En un aspecto, la presente invención puede ser utilizada en un método para el tratamiento de disfunción endotelial en un paciente diabético, que comprende la administración al paciente de una cantidad efectiva de lipoproteína de alta densidad (HDL).

Preferiblemente, la administración es administración parenteral.

20 La referencia en este documento a "tratamiento" se debe considerar en su contexto más amplio. El término "tratamiento" no necesariamente implica que un sujeto se trata hasta su total recuperación. En consecuencia, el tratamiento incluye la mejoría de los síntomas de un trastorno o condición particular así como la reducción de la severidad de, o eliminación de un trastorno o condición particular.

25 Como se utiliza en este documento, las referencias a "tratamiento de disfunción endotelial" se deben considerar como referencias a la mejora de función endotelial en el tratamiento de trastornos que se relacionan con la disfunción endotelial. Tales trastornos incluyen tanto los trastornos macrovasculares (en relación con los grandes vasos sanguíneos) tales como ataque isquémico transitorio, accidente cerebrovascular, angina, infarto del miocardio, falla cardíaca, y enfermedad vascular periférica, así como trastornos microvasculares (en relación con los vasos sanguíneos pequeños) tales como retinopatía diabética (no-proliferativa, proliferativa, edema macular), microalbuminuria, macroalbuminuria, enfermedad renal en etapa terminal, disfunción eréctil, neuropatía autonómica, neuropatía periférica, osteomielitis e isquemia de extremidad inferior.

30 Las referencias en este documento a un paciente "diabético" se deben entender como una referencia a un paciente que sufre de cualquiera la diabetes tipo 1 (DM1) o la diabetes tipo 2 (DM2).

35 De acuerdo con la presente invención, HDL es para ser administrada a un paciente diabético. El término "HDL" como se utiliza en este documento se relaciona con todas las formas de lipoproteínas de alta densidad e incluye HDL madura, HDL naciente o HDL reconstituida (rHDL) o cualquier mezcla de estas, así como rHDL producida de apolipoproteína recombinante o un análogo de este con relación funcional con HDL naciente o reconstituida. Tales análogos incluyen péptidos funcionales derivados de la estructura de la apolipoproteína (Apo), tales como aquellos descritos en International Patent Publications Nos. WO 99/16459 and WO 99/16408, los contenidos de los cuales se incorporan en este documento por referencia.

40 Las lipoproteínas de alta densidad comprenden un componente de proteína, y lípido. Las proteínas preferiblemente son apolipoproteínas, por ejemplo apolipoproteínas humanas tales como apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína A-II (apoA-II) o apolipoproteína A-IV (apoA-IV) o apolipoproteínas recombinantes, o péptidos funcionalmente homólogos con propiedades similares. Los lípidos apropiados son fosfolípidos, preferiblemente fosfatidilcolina, opcionalmente mezclada con otros lípidos (colesterol, ésteres del colesterol, triglicéridos, esfingolípidos, u otros lípidos). Los lípidos pueden ser lípidos sintéticos, lípidos que ocurren naturalmente o
45 combinaciones de estos.

Preferiblemente, la HDL es HDL reconstituida.

50 Producción de HDL reconstituida se describe, a modo de ejemplo, en US Patent No. 5652339 y por Matz and Jonas (25) y Lerch et al. (26). La producción de rHDL con apolipoproteínas recombinantes se describe, a modo de ejemplo, en European Patent No. EP 469017 (en levadura), US Patent No. 6559284 (en E. coli), e International Patent Publications Nos. WO 87/02062 (en E. coli, levadura y células Cho) y WO 88/03166 (en E. coli).

La HDL se administra en una cantidad efectiva. Una "cantidad efectiva" significa una cantidad necesaria al menos parcialmente para alcanzar la respuesta deseada, o para retrasar el inicio o inhibir la progresión o detener por completo, el inicio o progresión del trastorno o condición particular que se trata. La cantidad varía dependiendo de la

condición de salud y física del individuo que se trata, los antecedentes raciales del individuo que se trata, el grado de protección deseado, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un rango relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos de rutina.

5 Los rangos de dosificación de HDL preferidos son de 0.1-200 mg, más preferiblemente 10-80 mg, HDL (peso basado en apolipoproteína) por kg de peso corporal por tratamiento. Por ejemplo, la dosificación de HDL que se administra pueden ser aproximadamente 0.2-100 mg de HDL por kg de peso corporal (peso basado en apolipoproteína) dada como una inyección intravenosa y/o como una infusión durante un período de tiempo necesario clínicamente, por ejemplo por un periodo que oscila de unos pocos minutos a varias horas, por ejemplo hasta 24 horas. Si es necesario, la administración de HDL se puede repetir una o varias veces. La cantidad actual administrada será determinada tanto por la naturaleza de la condición o trastorno que se está tratando como por la velocidad a la cual la HDL está siendo administrada.

15 Preferiblemente, el paciente es un humano, sin embargo la presente invención se extiende al tratamiento y/o profilaxis de otros pacientes mamíferos incluyendo primates, animales de ganadería (por ejemplo ovejas, cerdos, ganado vacuno, caballos, burros), animales para ensayos de laboratorio (por ejemplo ratones, conejos, ratas, conejillo de Indias), animales de compañía (por ejemplo perros, gatos) y animales salvajes en cautividad.

20 De acuerdo con la presente invención, la HDL preferiblemente es para ser administrada a un paciente mediante una ruta de administración parenteral. La administración parenteral incluye cualquier ruta de administración que no sea a través del canal alimentario (es decir, no enteral), incluyendo administración por inyección, infusión y similares. La administración por inyección incluye, a modo de ejemplo, en una vena (intravenosa), una arteria (intraarterial), un músculo (intramuscular) y bajo la piel (subcutánea). La HDL también se puede administrar en un depósito o formulación de liberación controlada, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, en una dosificación que sea suficiente para obtener el efecto farmacológico deseado.

25 Las composiciones apropiadas para la administración parenteral convenientemente comprenden una preparación acuosa estéril del componente activo que preferiblemente es isotónica con la sangre del recipiente. Esta preparación acuosa se puede formular de acuerdo con métodos conocidos utilizando apropiados agentes dispersantes o de humectación y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una suspensión o solución inyectable estéril en un diluyente o solvente no-tóxico aceptable parenteralmente, por ejemplo como una solución en un polietileno glicol y ácido láctico. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden ser empleados son el agua, solución de Ringer, carbohidratos apropiados (por ejemplo sacarosa, maltosa, trehalosa, glucosa) y solución de cloruro de sodio isotónico. Además, se emplean convenientemente aceites fijos, estériles como un medio de suspensión o solvente. Para este propósito, cualquier aceite fijo blando se puede emplear incluyendo mono- o di-glicéridos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

35 La formulación de tales composiciones terapéuticas es bien conocida por los expertos en este campo. Los apropiados portadores y/o diluentes farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los convencionales solventes, medios de dispersión, agentes de carga, portadores sólidos, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en el oficio, y se describe, a modo de ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla el uso de este en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Los ingredientes activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

45 Otros sistemas de entrega pueden incluir sistemas de entrega de liberación controlada. Los sistemas de entrega de liberación controlada preferidos son aquellos que pueden proporcionar la liberación del componente activo de la invención en pellets o cápsulas de liberación controlada. Muchos tipos de sistemas de entrega de liberación controlada están disponibles. Estos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los cuales el componente activo está contenido dentro de una matriz, y (b) sistemas disfuncionales en los cuales el componente activo permea a una velocidad controlada a través de un polímero.

50 La presente invención también proporciona la lipoproteína de alta densidad (HDL) para su uso en el tratamiento de un paciente con diabetes tipo 2, para mejorar la función endotelial en el paciente, en donde la mejora en función endotelial persiste por al menos 7 días después de la administración.

55 En incluso otro aspecto, la invención proporciona el uso de HDL en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con diabetes tipo 2, para mejorar la función endotelial en el paciente, en donde la mejora en función endotelial persiste por al menos 7 días después de la administración.

EJEMPLO**I. Métodos**

Se inscribieron siete pacientes no fumadores con DM2 no complicada (4 hombres y 3 mujeres) y 7 no fumadores con edad- y sexo correspondientes a sujetos control normolipidémicos (4 hombres y 3 mujeres). El criterio de inclusión de los pacientes con DM2 fueron de la siguiente manera: (1) glucosa en plasma en ayunas > 7.0 mmol/L, (2) bajo tratamiento con dieta y metformina; (3) sin utilizar insulina exógena; (4) dislipidemia leve con niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol LDL de menos de 2.0 y 3.5 mmol/l, respectivamente. La presencia de enfermedad macrovascular, definida como anomalías de ECG, índice de ángulo braquial anormal o un antecedente de eventos vasculares periféricos cardíacos, cerebrales y la neuropatía autonómica fueron el criterio de exclusión para cualquiera de los pacientes o sujetos control. Todos los pacientes femeninos fueron postmenopáusicos y no estaban bajo terapia de reemplazo hormonal. La duración media de la diabetes fue 5.2 ± 1.2 [media \pm SD] años. Las evaluaciones se realizaron al menos 4 semanas después del cese de medicamentos vasoactivos, tales como inhibidores de ACE, bloqueadores del receptor de la angiotensina, bloqueadores del canal de calcio, aspirina, NSAIDs, y suplementos de vitaminas. Ninguno de los pacientes utilizaba la terapia con estatinas. El alcohol, la cafeína y la metformina fueron retenidos dentro de 12 horas antes del estudio. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito y se obtuvo la aprobación de la junta la revisión interna del Academic Medical Center (AMC), University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki.

Protocolo del Estudio

La función vascular fue evaluada en el inicio del estudio y después de la infusión de rHDL utilizando pletismografía de tensión de calibre de oclusión venosa según se publicó previamente (EC-4; Hokanson Inc, Bellevue, USA) (27). Las mediciones se realizaron en una habitación tranquila con una temperatura constante (22°C a 24°C) y se iniciaron a las 08:00 a.m. Los sujetos permanecen en posición supina a lo largo de todo el estudio. La arteria braquial del brazo no dominante se canuló con un catéter de poliuretano, flexible, de calibre 20 (Arrow Inc, Reading, USA). La inserción se continuó por un intervalo de 30 minutos de infusión salina para permitir el re-establecimiento de las condiciones iniciales. Posteriormente, el flujo sanguíneo del antebrazo (FBF), expresado como mililitros por minuto por 100 mL de volumen de tejido del antebrazo (FAV), y se midió simultáneamente en ambos brazos. Se utilizó un sistema desencadenante de onda R basado en microordenador para el monitoreo en línea. Durante cada medición, se inflaron los manguitos de presión arterial alrededor de ambos brazos superiores (40 mm de Hg) mediante el uso de un inflador de manguito rápido. De forma simultánea, se inflaron los puños de las muñecas bilaterales a la presión arterial sistólica superior para excluir la circulación de la mano (200 mm de Hg). La presión sanguínea intra-arterial y la frecuencia cardíaca fueron monitoreadas continuamente. Después, se midió la respuesta de FBF a las dosis acumulativas del vasodilatador dependiente del endotelio serotonina (5HT, Sigma; 0.6, 1.8, y 6 ng · 100 mL FAV⁻¹ · min⁻¹), el vasodilatador independiente del endotelio nitroprusiato de sodio (SNP, Spruyt Hillen; 6, 60, 180, y 600 ng · 100 mL FAV⁻¹ · min⁻¹), y el inhibidor competitivo de sintasa de NO endotelial (eNOS) NG-monometil-L-arginina (L-NMMA, Kordia; 50, 100, 200, y 400 µg · 100 mL FAV⁻¹ · min⁻¹). Los bloques de infusión de serotonina y nitroprusiato de sodio fueron administrados en orden aleatorio, seguido por infusión de L-NMMA. Todas las infusiones se prepararon en la farmacia del AMC de acuerdo con las directrices de buenas prácticas de manufactura (GMP). Los agentes fueron administrados vía intra-arterial por 6, 4, y 8 minutos en cada dosis, respectivamente, con una bomba de infusión de velocidad constante. Seis mediciones durante los últimos 2 minutos de cada bloque de infusión se promedian para determinar la media del FBF. Los 3 diferentes bloques de infusión procedieron después de un periodo de descanso de 15 minutos o hasta que el FBF ha regresado al valor inicial. Posteriormente, un catéter venoso se insertó en el brazo contralateral para la administración de rHDL a una dosis de 80 mg/kg de peso corporal durante un periodo de 4 horas (CSL Behring, Bern, Switzerland) (26, 27). Posteriormente, se repitieron los bloques de infusión. Se les pidió a los pacientes que no iniciaran su medicación (además de la metformina) y tuvieron que regresar 7 días después de la infusión de rHDL para repetir las mediciones de función endotelial.

Evaluaciones de Laboratorio

Las muestras de sangre fueron extraídas de los sujetos después de un ayuno durante la noche de 12 horas, inmediatamente, 4 horas y 7 días después de la infusión de rHDL. Después de la centrifugación dentro de 1 hora después de la recolección, las alícuotas fueron congeladas instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C hasta que los ensayos se realizan. Todas las mediciones se realizaron en el Vascular and Clinical laboratory of the Academic Medical Center, University Hospital of Amsterdam. ALAT y ASAT se midieron mediante el ensayo de activación de fosfato de piridoxal (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). HbA1c se midió por HPLC (Reagens Bio-Rad Laboratories B.V., the Netherlands) en una Variante II (Bio-Rad Laboratories). La glucosa en plasma fue evaluada por duplicado utilizando el método hexoquinasa (Gluko-quant on Hitachi 917; Hitachi). Los triglicéridos en plasma, colesterol total, niveles de LDL y HDL fueron determinados mediante métodos enzimáticos estándar (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Los niveles plasmáticos de apoA-I y apoB fueron evaluados en el plasma almacenado mediante nefelometría cinética.

Análisis Estadístico

Todos los resultados de los parámetros clínicos, incluyendo los datos pletismográficos, se expresan como la media \pm SD. Las estadísticas descriptivas entre los 2 grupos fueron comparados por medio de test t de Student independiente de 2-colas. FBF se promedió sobre 6 registros consecutivos durante los últimos 2 minutos de cada etapa de infusión. Los registros del FBF hicieron en los primeros 30 segundos después de la inflación del brazalete de la muñeca no fueron utilizadas para el análisis. El análisis estadístico de las mediciones de FBF, calidad de HDL y marcadores inflamatorios para sujetos individuales entre los 2 grupos se llevó a cabo mediante un ANOVA de 2 vías para mediciones repetidas. Un valor de probabilidad de $P < 0.05$ se consideró significativo y un valor de $P < 0.01$ como altamente significativo.

II Resultados

Las características del sujeto se enumeran en la Tabla 1. Los valores iniciales de FBFs no fueron significativamente diferentes entre pacientes y sujetos control (Tabla 1). Como era de esperar, los niveles plasmáticos de la glucosa en plasma en ayunas ($P < 0.01$), hemoglobina A1c ($P < 0.01$), triglicéridos ($P < 0.01$) y apoB ($P < 0.05$) fueron más altos en pacientes con DM2. Los niveles de HDL-C y de apoA-I fueron comparables entre pacientes con DM2 y controles. Después de la infusión de rHDL, apoA-I en plasma aumentó en DM2 y control después de 4 horas (1.2 ± 0.2 a 2.8 ± 0.4 contra 1.2 ± 0.2 a 2.7 ± 0.4 g/L, $p < 0.01$ respectivamente), mientras que un ligero incremento permanece en pacientes con DM2, 7 días después de la infusión (1.5 ± 0.3 g/L, $p < 0.05$ en comparación con el valor inicial). Los niveles de apoB en plasma fueron más altos en DM2 en comparación con los controles y no se afectaron por infusión de rHDL (1.0 ± 0.3 a 0.9 ± 0.3 contra 0.7 ± 0.2 a 0.7 ± 0.2 g/L, ns, respectivamente).

Los efectos agudos y a largo plazo de la infusión de rHDL en la bio-disponibilidad de NO

La infusión intra-arterial del vasodilatador dependiente del endotelio serotonina aumentó el FBF de una manera dependiente de la dosis en ambos grupos. Al inicio del estudio, la respuesta de FBF a la serotonina se atenuó en DM2 en comparación con los controles ($p < 0.001$, Figura 1). Después de la infusión de rHDL, la respuesta del FBF a la serotonina aumentó significativamente, pero no alcanzó niveles comparables a los controles ($p < 0.01$, Figura 1). Curiosamente, la mejora en la vasodilatación dependiente del endotelio persistió 7 días después de la infusión de rHDL ($p < 0.01$, Figura 1). La infusión de rHDL no afectó la respuesta de serotonina en los controles (Figura 1).

Al inicio del estudio la respuesta del vasoconstrictor a L-NMMA, que refleja actividad de NO basal, fue bloqueada en pacientes con DM2 en comparación con los controles ($p < 0.001$, Figura 2). Después de la infusión de rHDL, la respuesta del constricor de L-NMMA se mejoró, incluso sigue presente 7 días después de la infusión ($p < 0.01$, Figura 2). De acuerdo con los datos de la serotonina, la infusión de rHDL no tuvo efecto en la respuesta de LNMMA en sujetos control (Figura 2).

Por último, la vasodilatación independiente del endotelio en respuesta a SNP fue inferior en DM2 contra los controles ($p < 0.01$, Figura 3) y la infusión de rHDL no mostró efecto sobre la respuesta del vasodilatador SNP, tanto en los pacientes como en los controles.

III Discusión

El presente estudio demuestra que tanto la actividad de NO estimulada y basal se comprometen gravemente en pacientes con DM2 en comparación con los controles correspondientes en edad y sexo. Curiosamente, a pesar de los niveles de HDL cercanos a los normales en pacientes con DM2, la infusión de rHDL significativamente mejora la función endotelial. Esta mejora persiste hasta 7 días después de la infusión de rHDL, en los cuales los niveles de HDL ya han regresado a los valores iniciales. Estos datos implican que las estrategias de incremento de HDL pueden ofrecer beneficios terapéuticos en DM2, incluso si los niveles de HDL-C no se disminuyen claramente en estos pacientes.

Función vascular en el inicio del estudio

De acuerdo con estudios previos (8, 9, 12), se confirma la presencia de ambas la actividad de NO basal alterada así como la liberación de NO atenuada en DM2 bajo la estimulación mediada del receptor. Se ha demostrado que varios mecanismos contribuyen a la disfunción endotelial en la diabetes. La disminución de la bio-disponibilidad del cofactor esencial tetrahidrobiopterina (BH4) se asocia con el desacoplamiento de la sintasa de NO endotelial que conduce a la producción directa de radicales de oxígeno en lugar de NO por eNOS (28-30). Otras fuentes también pueden contribuir al aumento de la producción del radical, incluyendo NADPH-oxidasa así como el desacoplamiento mitocondrial (10). El papel central de ROS en la disfunción vascular diabética se ha acentuado por estudios de intervenciones, informando la restauración completa de la función endotelial bajo la infusión intra-arterial de concentración alta de los antioxidantes (9, 12).

Efecto de infusión de rHDL en la función vascular

La infusión de rHDL se asoció con una mejora rápida de tanto la actividad de NO basal así como actividad de NO estimulada del receptor, dentro de unas pocas horas después de la infusión. Una primera explicación sería que rHDL incrementa la producción de NO. El óxido nítrico (NO) se sintetiza por eNOS a través de la conversión de L-arginina a L-citrulina. Su actividad se regula por complejas vías de la transducción de la señal incluyendo la activación de las quininas que alteran la fosforilación de eNOS, i.e. señalización de MAP quinasa y akt-quinasa, o incremento del contenido intracelular de Ca^{2+} seguido por la activación dependiente de calcio-calmodulina de eNOS (33). Yuhanna demostró que el enlace de apoA-I con el receptor B-1 secuestrante endotelial se logró mediante las respuestas mejoradas de relajación dependiente del endotelio en aortas (24), en gran parte debido a la activación de akt y MAP-quinasa (32). Además, HDL también tiene la capacidad de favorecer la expresión del contenido de la membrana de eNOS dentro de las células endoteliales preservando la estabilidad de la proteína eNOS, así como mediante la prevención del desplazamiento de eNOS a partir de la membrana celular a organelos intracelulares (23). Todos estos efectos pueden haber contribuido al incremento en la disponibilidad de NO basal, evaluado como respuestas aumentadas del vasoconstrictor al inhibidor de NO competitivo L-NMMA, después de la infusión de rHDL. En contraste, los mecanismos mencionados anteriormente no pueden explicar completamente el incremento en disponibilidad de NO estimulada del receptor, dependiente de la serotonina, que es dependiente en la activación de calcio-calmodulina de eNOS (31). Dado que es poco probable que el enlace de la serotonina con el receptor 5HT-2A endotelial (33) cambie con la infusión de rHDL, la degradación disminuida de NO mediante radicales de oxígeno proporciona una segunda ruta principal que puede contribuir al incremento de la biodisponibilidad de NO. De hecho, HDL tiene potentes propiedades anti-oxidativas, no en lo más mínimo debido a la presencia de enzimas tales como paraoxonasa y factor hidrolasa de activación de las plaquetas en la partícula de HDL (23).

Efectos a largo plazo de rHDL en la función vascular

Sorprendentemente, la vasodilatación dependiente del endotelio incluso mejoró significativamente 1 semana después de la infusión de rHDL. En contraste, ambos apoAI así como los niveles de HDL habían vuelto casi a los niveles de pre-infusión. Notablemente, en los niveles iniciales de HDL en DM2 tampoco fueron significativamente diferentes de los de los sujetos control. En contraste, la infusión de rHDL no tuvo efecto en absoluto sobre la función vascular en los controles. Estos datos implican que, a pesar de la concentración normal de HDL, la calidad de HDL puede ser alterada en DM2. De hecho, la pérdida de efectos protectores de HDL en DM2 ha sido atribuida parcialmente a la glicación no enzimática de cadenas de leucina predominantemente en HDL. La glicación de apoAI-HDL compromete la capacidad de HDL para proteger LDL a partir del daño oxidativo, entre otros por la pérdida de actividad de PON-1 (34). Además, la HDL glicosilada reduce la expresión de eNOS dentro del endotelio, que conduce a capacidad de producir NO alterado (35). De hecho, el nivel de actividad antioxidativa de HDL en pacientes con DM2 se liga íntimamente a los niveles de estrés oxidativo y control glicémico (36).

Limitaciones del Estudio

Dado que un efecto de rHDL no se observó 4 horas después de la infusión en el grupo control, los estudios de función vascular no se repitieron después de 7 días en el grupo control. Por consiguiente, los datos de función vascular el día 7 en pacientes con DM2 fueron comparados con las observaciones iniciales y del día 1 en los controles. Sin embargo, dado que la conclusión más importante en la función vascular se relaciona con la persistente mejora en comparación con los pacientes con DM2 en el inicio del estudio, la falta del estudio del día 7 en los controles no tiene impacto en las conclusiones recogidas en el presente estudio. En segundo lugar, aunque solo un grupo relativamente pequeño de pacientes con DM2 se estudió, el hecho que una mejora significativa ya se encontró en un grupo limitado de pacientes y reproducible después de 4 horas y 1 semana, es soporte de una conclusión clara en el efecto de HDL en función vascular en pacientes con DM2, a pesar del pequeño tamaño de muestra.

Implicaciones clínicas de los pacientes con DM2

Las estatinas son el paradigma central de estrategias preventivas cardiovasculares. Sin embargo, en vista del gran número de eventos no prevenidos durante la terapia con estatinas, la búsqueda de las terapias de combinación óptimas es un progreso completo. La promesa de estrategias de incremento de HDL se expande rápidamente. La relación inversa fuerte entre HDL-C y los eventos cardiovasculares es un hallazgo consistente en ambos pacientes no-diabéticos así como diabéticos. Lamentablemente, los datos sólidos que proporcionan evidencia de la reducción del riesgo cardiovascular seguido por las intervenciones del aumento de HDL son escasos, predominantemente debido a la falta de compuestos que incrementan la HDL potente y selectiva (37).

Datos recientes han demostrado que 5 infusiones semanales de rHDL producida con una apolipoproteína variante (apoA-I Milano) fueron capaces de frenar la progresión o incluso inducir la regresión del volumen de ateroma coronario en paciente con infarto del miocardio reciente (38). De acuerdo con un efecto tan rápido, ambos estudios experimentales así como in vivo han demostrado que la capacidad antiaterogénica de HDL no es solamente restringida con su papel en el transporte inverso del colesterol. La presente observación de restauración aguda y

persistente de la disfunción endotelial en DM2 presta mayor apoyo a los efectos de HDL más allá de su papel en el transporte inverso del colesterol. Este apoyo de un papel del incremento de HDL en DM2 incluso si los niveles de HDL no se disminuyen claramente.

Tabla 1.

	DM2 (n=7)	CON (n=7)
Edad, años	53.6 ± 3.0	48.6 ± 15.1
Sexo (femenino/masculino)	3/4	3/4
BMI, kg/m ²	28.9 ± 2.4	25.6 ± 3.6
Fumador (s/n)	0/7	0/7
Presión sanguínea sistólica, mm de Hg	148 ± 12	135 ± 16
Presión sanguínea diastólica, mm de Hg	78 ± 13	83 ± 9
Frecuencia cardíaca, bpm	65 ± 5	61 ± 4
Glucosa en plasma en ayunas, (mmol/L)	8.3 ± 1.2	5.2 ± 0.4 #
HbA1c, %	7.1 ± 0.3	5.4 ± 0.3 #
Colesterol total, mmol/L	5.6 ± 0.4	5.3 ± 0.4
LDL-C, mmol/L	2.9 ± 0.6	3.0 ± 0.7
HDL-C, mmol/L	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3
ApoA-I, g/L	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2
ApoB, g/L	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.2 *
Triglicéridos, mmol/L	1.5 ± 0.4	0.8 ± 0.3 #
Basal FBF, ml · 100 mL FAV-1 · min	4.1 ± 2.0	2.6 ± 0.9

* p < 0.05, # p < 0.01

5

REFERENCIAS

1. Haffner SM. "Coronary heart disease in patients with diabetes". N Engl J Med (2000); 342(14):1040-2.
2. Rohrer L, Hersberger M, von Eckardstein A. "High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease." Curr Opin Lipidol. (2004); 15(3):269-78.
- 10 3. Turner RC, Millns H, Neil HA et al. "Riskfactors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS:23)". BMJ(1998); 316:823-828.
4. Pyorala K, Pedersen TR, Kjekshus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G. "Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)". Diabetes Care(1997); 20(4):614-20.
- 15 5. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH; CARDS investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in

- type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebocontrolled trial. *Lancet* (2004); 364(9435):685-96.
6. Cheung BM, Lauder IJ, Lau CP, Kumana CR. "Meta-analysis of large randomized controlled trials to evaluate the impact of statins on cardiovascular outcomes." *Br J Clin Pharmacol.* (2004); 57(5):640-51.
- 5 7. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. "Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse longterm outcome of coronary heart disease." *Circulation* (2000); 101:1899-1906.
8. Woodman RJ, Playford DA, Watts GF. "Basal production of nitric oxide (NO) and non-NO vasodilators in the forearm microcirculation in Type 2 diabetes: associations with blood pressure and HDL cholesterol." *Diabetes Res Clin Pract.* (2006); 71(1):59-67.
- 10 9. van Etten RW, de Koning EJ, Verhaar MC, Gaillard CA, Rabelink TJ. "Impaired NO-dependent vasodilation in patients with Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is restored by acute administration of folate." *Diabetologia* (2002); 45(7):1004-10.
10. Brownlee M. "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." *Nature* (2001); 414(6865): 813-20.
- 15 11. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. "Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation." *J Clin Invest.* (2006); 116(4):1071-80.
12. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. "Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Invest.* (1996); 97(1):22-8.
- 20 13. Stroes ES, Koomans HA, de Bruin TW, Rabelink TJ. "Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic patients off and on lipid-lowering medication." *Lancet* (1995);346(8973):467-71.
14. van Etten RW, de Koning EJ, Honing ML, Stroes ES, Gaillard CA, Rabelink TJ. "Intensive lipid lowering by statin therapy does not improve vasoreactivity in patients with type 2 diabetes." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2002); 22(5):799-804.
- 25 15. Balletshofer BM, Goebbel S, Rittig K, Enderle M, Schmolzer I, Wascher TC et al. "Intense cholesterol lowering therapy with a HMG-CoA reductase inhibitor does not improve nitric oxide dependent endothelial function in type-2-diabetes--a multicenter, randomised, double-blind, three-arm placebo-controlled clinical trial." *Exp Clin Endocrinol Diabetes*(2005); 113(6):324-30.
16. Cockerill GW, Reed S: High-density lipoprotein: Multipotent effects on cells of the vasculature. *Int. Rev. Cytol.* (1999); 188: 257-297.
- 30 17. Nanjee MN, Doran JE, Lerch PG, Miller NE: Acute effects of intravenous infusion of apolipoprotein A-I/phosphatidylcholine discs on plasma lipoproteins in human. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*(1999); 19: 979-989.
18. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ: High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation* (1989); 79:8-15.
- 35 19. Paszty C, Maeda N, Verstuyft J: Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E-deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* (1998); 94: 899 -903.
20. Tangirala RK, Tsukamoto K, Chun SH, Usher D, Pure E, Rader DJ: Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-1 in mice. *Circulation* (1999); 100: 1816-1822.
- 40 21. Bisoendial RJ, Hovingh GK, El Harchaoui K, Levels JH, Tsimikas S, Pu K, Zwinderman AE, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ, Stroes ES. "Consequences of cholesteryl ester transfer protein inhibition in patients with familial hypoalphalipoproteinemia." *Atheroscler Thromb Vasc Biol.*(2005); 25(9); e133-34.
22. Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW, Mancuso JP, Rader DJ. "Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol." *N Engl J Med.* (2004); 350(15):1505-1515.
23. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. "Endothelial and antithrombotic actions of HDL." *Circ Res.* (2006); 98(11):1352-64.

24. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. "High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-B1 activates endothelial nitric oxide synthase." *Nat Med* (2001); 7(7):853-7.
- 5 25. Matz CE, Jonas A. "Micellar complexes of human apolipoprotein A-1 with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersion." *J. Biol. Chem.* (1982); 257:4535-4540.
26. Lerch PG, Fortsch V, Hodler G, Bolli R. "Production and characterization of a reconstituted high density lipoprotein for therapeutic applications." *Vox Sang.* (1996); 71(3):155-64.
- 10 27. Bisioendial RJ, Hovingh GK, Levels JH, Lerch PG, Andresen I, Hayden MR, Kastelein JJ, Stroes ES. "Restoration of endothelial function by increasing high-density lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein." *Circulation* (2003); 107(23):2944-8.
28. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Luscher T, Rabelink T. "Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia." *J Clin Invest.* 1997; 99(1):41-6.
- 15 29. Alp NJ, Mussa S, Khoo J, Cai S, Guzik T, Jefferson A, Goh N, Rockett KA, Channon KM. "Tetrahydrobiopterin-independent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression." *J Clin Invest.*(2003); 112(5):725-235.
30. Heitzer T, Krohn K, Alvers S, Meinertz T. "Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with type II diabetes mellitus." *Diabetologia* (2000); 43(11):1435-8.
31. Govers R, Rabelink TJ. "Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase." *Am J Physiol Renal Physiol.* (2001); 280(2):F193-206.
- 20 32. Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW. "High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases." *J Biol Chem.*(2003); 278(11):9142-9.
33. Takano S, Hoshino Y, Li L, Matsuoka I, Ono T, Kimura J. "Dual roles of 5-hydroxytryptamine in ischemiareperfusion injury in isolated rat hearts." *J Cardiovasc Pharmacol Ther.*(2004); 9(1):43-50.
- 25 34. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, Wong H, Peters AL. "Glycation impairs high-density lipoprotein function." *Diabetologia.* (2000); 43(3):312-20.
35. Matsunaga T, Nakajima T, Miyazaki T, Koyama I, Hokari S, Inoue I, Kawai S, Shimomura H, Katayama S, Hara A, Komoda T. "Glycated high-density lipoprotein regulates reactive oxygen species and reactive nitrogen species in endothelial cells." *Metabolism* (2003); 52(1):42-9.
- 30 36. Nobecourt E, Jacqueminet S, Hansel B, Chantepie S, Grimaldi A, Chapman MJ, Kontush A. "Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia." *Diabetologia.* (2005); 48(3):529-38.
37. Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR et al; FIELD study investigators. "Effects of longterm fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial." *Lancet* (2005); 366(9500):1849-61.
- 35 38. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R. "Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial." *JAMA* (2003); 290(17): 2292-300.

REIVINDICACIONES

1. Lipoproteína de alta densidad (HDL) para su uso en el tratamiento de un paciente con diabetes tipo 2, para mejorar la función endotelial en el paciente, en donde la mejora en función endotelial persiste por al menos 7 días después de la administración.
- 5 2. El uso de HDL en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con diabetes tipo 2, para mejorar la función endotelial en el paciente, en donde la mejora en función endotelial persiste por al menos 7 días después de la administración.
3. La HDL para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, en donde dicha mejora es la mejora de la vasodilatación dependiente del endotelio.
- 10 4. La HDL para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el uso de la reivindicación 2, en donde dicha mejora está en el tratamiento de un trastorno macrovascular inducido por la diabetes, seleccionado de ataque isquémico transitorio, accidente cerebrovascular, angina, infarto del miocardio, falla cardíaca, y enfermedad vascular periférica.
- 15 5. La HDL para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el uso de la reivindicación 2, en donde dicha mejora está en el tratamiento de un trastorno microvascular inducido por la diabetes seleccionado de retinopatía diabética (no-proliferativa, proliferativa, edema macular), microalbuminuria, macroalbuminuria, enfermedad renal en etapa terminal, disfunción eréctil, neuropatía autonómica, neuropatía periférica, osteomielitis y isquemia de extremidad inferior.
- 20 6. La HDL para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3-5, o el uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-5, en donde dicha HDL se selecciona del grupo que consiste de HDL madura, HDL naciente, HDL reconstituida, HDL producida con apolipoproteína recombinante, un péptido funcional u otro análogo de este.
7. La HDL para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3-6 o el uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-6, en donde dicha HDL es HDL reconstituida.
- 25 8. La HDL para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3-7 o el uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-7, en donde dicha HDL es para ser administrada en un rango de dosificación de 0.1-200 mg por kg de peso corporal del paciente por tratamiento, preferiblemente en un rango de dosificación de 10-80 mg por kg de peso corporal por tratamiento.
9. La HDL para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3-8 o el uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-8, en donde dicha administración es la administración parenteral.
- 30 10. La HDL para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, o el uso de la reivindicación 9, en donde dicha administración parenteral se selecciona del grupo que consiste de inyección o infusión intravenosa, intraarterial, intramuscular y subcutánea.
11. La HDL para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, o el uso de la reivindicación 9, en donde dicha administración parenteral es inyección o infusión intravenosa.

Figura 1

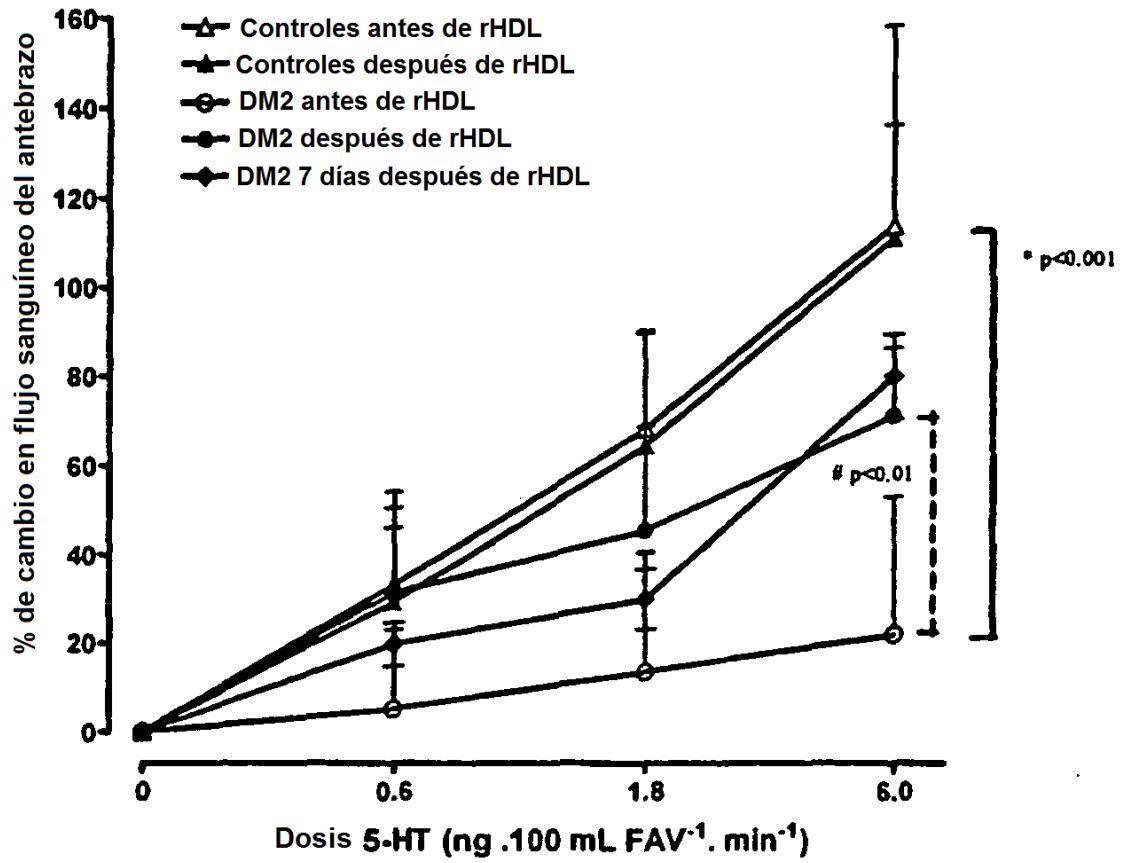


Figura 2

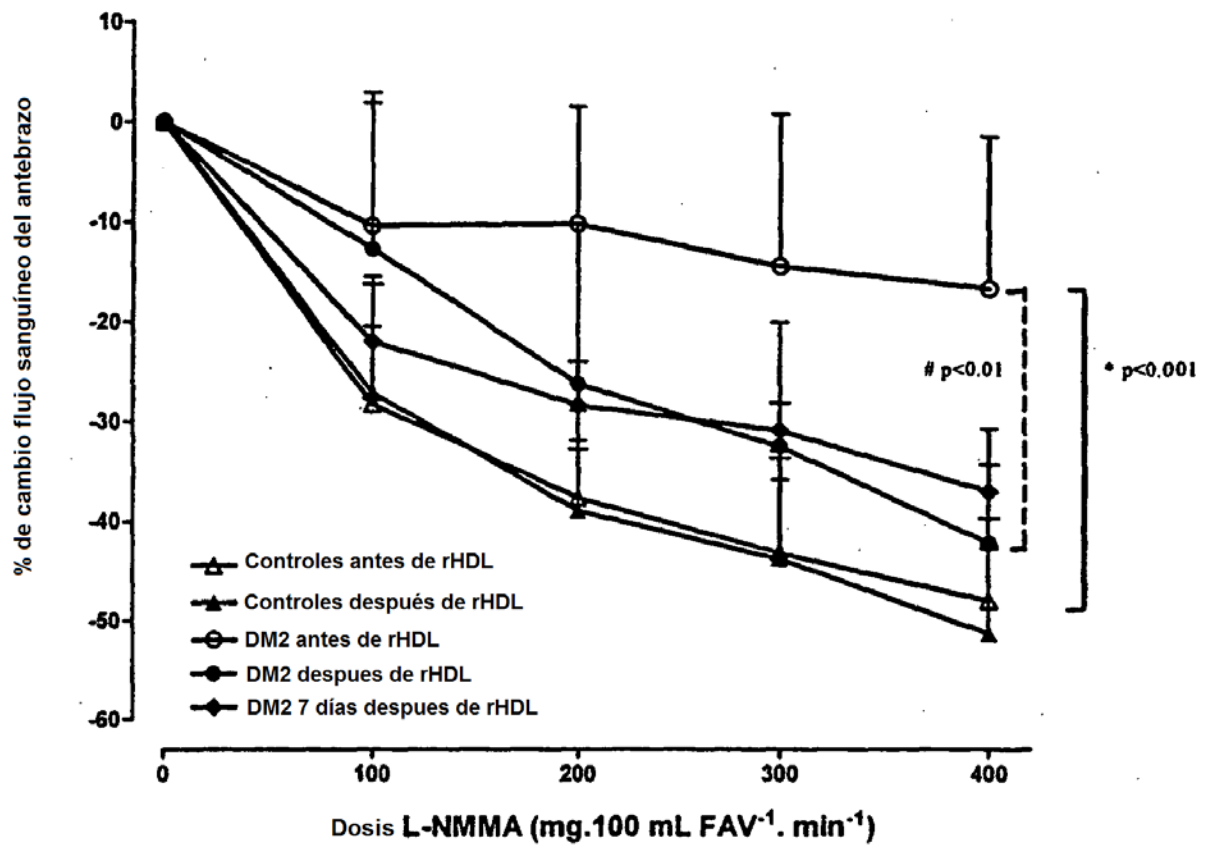


Figura 3

