

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 594**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2007** **E 11185508 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013** **EP 2465519**

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2014

73 Titular/es:

CSL LIMITED (100.0%)
45 Poplar Road
Parkville, Victoria 3052, AU

72 Inventor/es:

STROES, ERIK S.G.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 442 594 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 la disfunción endotelial en pacientes diabéticos

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método para el tratamiento de la disfunción endotelial en pacientes diabéticos. En particular, esta invención se refiere a un método para mejorar la función endotelial en el tratamiento de los trastornos que se relacionan con la disfunción endotelial, tanto macrovasculares como microvasculares, en pacientes diabéticos.

Antecedentes de la invención

En la enfermedad crónica, diabetes mellitus (diabetes), el organismo pierde la capacidad de producir o responder adecuadamente a la hormona insulina de modo que las células de los tejidos periféricos no pueden captar activamente la glucosa de la sangre para usarla o almacenarla. En el individuo diabético, el nivel de glucosa en la sangre periférica puede tornarse elevado (hiperglucemia) y normalmente permanece así a menos que se emplee algún tipo de intervención (por ejemplo, la administración de insulina exógena) para retornar a niveles normales de glucosa en sangre. Si no se controla, la hiperglucemia de los individuos diabéticos puede producir choque, degeneración o insuficiencia orgánica (por ejemplo, insuficiencia renal, ceguera, enfermedad nerviosa, enfermedad cardiovascular), necrosis de los tejidos (por ejemplo, que requiera amputación de pie) e incluso la muerte.

Existen dos formas principales de diabetes la tipo 1 y la tipo 2. La diabetes tipo 1, que se conocía como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) o diabetes de comienzo juvenil, es una enfermedad autoinmunitaria en la cual el organismo destruye las células β productoras de insulina (células de los islotes) del páncreas lo que produce la necesidad absoluta de administración diaria de insulina exógena para mantener los niveles de glucemia normales. La diabetes tipo 1 generalmente se diagnostica en niños y adultos jóvenes, pero puede aparecer a cualquier edad. La diabetes tipo 1 representa el 5-10% de los casos diagnosticados de diabetes.

Por lejos la forma más frecuente de diabetes es la diabetes tipo 2, que se conocía como diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM). La diabetes tipo 2 también se conocía como diabetes adulta, sin embargo, esta forma de diabetes se está volviendo cada vez más frecuente en la población creciente de niños y adultos jóvenes con sobrepeso y clínicamente obesos. La diabetes tipo 2 representa aproximadamente 90-95% de todos los casos diagnosticados de diabetes. La diabetes tipo 2 comienza generalmente con resistencia a la insulina, un trastorno en el cual las células del organismo no responden adecuadamente a la insulina, seguido de una pérdida gradual de parte del páncreas para la producción y secreción de insulina. La diabetes tipo 2 se asocia a diversos factores como edad avanzada, obesidad, antecedentes familiares de diabetes, antecedentes de diabetes gestacional, trastorno del metabolismo de la glucosa, inactividad física y diversas razas o etnias. Las personas con diabetes tipo 2 deben intentar controlar su nivel de glucosa en sangre con una dieta cuidadosa, ejercicio y reducción de peso, y medicamentos adicionales.

Los factores principales que contribuyen al estado pro-aterogénico en la diabetes, particularmente la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), son dislipemia, hiperglucemia, hipertensión, obesidad visceral y resistencia a la insulina (1,2). Los estudios de observación han demostrado claramente la importancia de la dislipemia diabética en la contribución a la aterogénesis en la diabetes, ilustrada por el hecho de que la correlación entre las lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como las lipoproteínas de alta densidad (HDL) frente a los episodios cardiovasculares es mayor que la de glucosa plasmática en ayunas (3). Los estudios de intervención con estatinas han puesto de manifiesto un claro beneficio del tratamiento con estatina en la reducción de episodios cardiovasculares en DM2 (4, 5); sin embargo, a pesar de este logro impresionante, la mayoría de los pacientes con DM2 igual sufrirán episodios cardiovasculares, aun cuando estén usando estatinas (6).

Durante las dos últimas décadas, la disfunción endotelial emergió como una de las primeras etapas de la aterogénesis. Se ha demostrado que la disfunción endotelial, que es una característica de todos los pacientes diabéticos (es decir ambos tipos 1 y 2) tiene valor predictivo de futuros episodios cardiovasculares (7-9). En consonancia con la patogenia multifactorial de la enfermedad vascular inducida por la diabetes (10, 11), se evaluaron numerosas intervenciones terapéuticas respecto a su potencial para mejorar la función endotelial en pacientes con DM2 (9, 12). Sorprendentemente, mientras que la función endotelial podría ser totalmente restaurada por el tratamiento con estatinas en pacientes dislipémicos (13), varios estudios han demostrado que incluso el tratamiento intensivo con estatinas no puede normalizar la disfunción vascular en DM2 (14, 15). Esto último hace hincapié en la posibilidad de modalidades terapéuticas adicionales en este grupo de alto riesgo.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) representan un grupo amplio de lipoproteínas plasmáticas mayormente esféricas, que exhiben una considerable diversidad en su tamaño, apolipoproteína (apo) y composición lipídica. Las partículas de HDL están comprendidas en el rango de densidad de 1.063-1.21 g/ml (16) y como son más

pequeñas que las otras lipoproteínas, las HDL pueden penetrar entre las células endoteliales más fácilmente permitiendo que se acumulen concentraciones relativamente altas en los líquidos tisulares (17). La apolipoproteína principal de casi todas las HDL plasmáticas es apoA-I, que en asociación con los fosfolípidos y el colesterol, encierra un núcleo de ésteres de colesterol (16). Las HDL nacientes (es decir, recién sintetizadas) segregadas por el hígado y el intestino no contienen ésteres de colesterol y son de forma discoidal (16). La asociación negativa de la concentración plasmática de HDL con arteriopatía coronaria ha sido bien documentada en estudios epidemiológicos (18). Aunque los experimentos en animales han demostrado una actividad antiaterogénica de las HDL (19), aún se desconoce si este efecto protector está relacionado con el papel de la lipoproteína en el transporte inverso del colesterol o con un mecanismo diferente. El mecanismo o los mecanismos mediante los cuales las HDL proporcionan estas acciones cardioprotectoras no se entienden claramente, pero pueden incluir un papel de las HDL en el transporte inverso del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado, la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad o la modulación de la vasodilatación y la activación de las plaquetas mediada por cambios en la producción de prostaciclina (20). Las HDL también pueden activar la óxido nítrico (NO) sintasa endotelial a continuación de su interacción con el receptor depurador B1 (SR-B1).

En vista de los datos emergentes sobre los efectos promotores de NO de HDL, los compuestos con capacidad para aumentar las HDL son de particular interés (21-24). De hecho, en los pacientes con DM2, HDL se asocia positivamente a respuestas vasomotoras dependientes del endotelio (8). En trabajos que conducen a la presente invención, los inventores evaluaron si, y en qué medida, el aumento de HDL luego de la infusión de HDL reconstituida exógena (rHDL) se traduciría en una mejora de la función vascular. Se evaluaron los niveles de ApoA-I y la función endotelial agudamente (4 horas después de la infusión) así como 7 días después de la infusión de rHDL en DM2 y controles compatibles.

Los detalles bibliográficos de las publicaciones mencionadas en esta memoria se indican con referencias al final de la descripción. La referencia a cualquier documento del estado anterior de la técnica en esta memoria no es, y no debe tomarse como, un reconocimiento ni ningún tipo de sugerencia de que el documento forma parte del conocimiento general.

Resumen de la invención

En toda esta memoria y en las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden" y las variaciones como "comprende" y "que comprende(n)", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o paso o grupo de números enteros o pasos establecidos pero que no excluye ningún otro número entero o paso ni grupo de números enteros o pasos.

El tema de la invención se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama que muestra que la infusión intrarterial del vasodilatador dependiente del endotelio serotonina, aumentó el flujo sanguíneo del antebrazo (FBF) de manera dependiente de la dosis en voluntarios sanos y pacientes con DM2. Al inicio del estudio, la respuesta del FBF a la serotonina estuvo atenuada en DM2 en comparación con los controles ($p < 0.001$). Después de la infusión de rHDL, la respuesta del FBF a la serotonina aumentó significativamente, pero no alcanzó niveles comparables a los de 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 a la serotonina en los controles.

La figura 2 es un diagrama que muestra que al inicio la respuesta al vasoconstrictor L-NMMA, que refleja la actividad basal del óxido nítrico (NO), estuvo atemperada en pacientes con DM2 en comparación con los controles ($p < 0.001$). Después de la infusión de rHDL, la respuesta al constrictor L-NMMA mejoró, nuevamente aún presente 7 días después de la infusión ($p < 0.01$). En consonancia con los datos de la serotonina, la infusión de rHDL no tuvo efecto sobre la respuesta a L-NMMA en los sujetos de control.

La figura 3 es un diagrama que muestra que la vasodilatación independiente del endotelio en respuesta al nitroprusiato de sodio fue menor en DM2 que en los controles ($p < 0.01$) y la infusión de rHDL no mostró ningún efecto sobre la respuesta al vasodilatador SNP ni en los pacientes ni en los controles.

Descripción detallada de la invención

Los pacientes con diabetes, especialmente diabetes mellitus tipo 2 (DM2), se caracterizan por un marcado aumento en el riesgo cardiovascular. La disfunción endotelial sistémica, una característica de la DM2, predice el riesgo futuro de episodios cardiovasculares. En vista de la relación entre HDL y la vía del NO, los inventores de la presente evaluaron el efecto de la infusión de rHDL en la función endotelial en DM2. Específicamente, en 7 pacientes con DM2 y 7 controles normolipémicos, se evaluó la función endotelial mediante pletismografía de oclusión venosa. Se midieron las respuestas del flujo sanguíneo en el antebrazo (FBF) a la infusión intrarterial de los vasodilatadores dependiente e independiente del endotelio serotonina (5HT) y nitroprusiato de sodio, respectivamente, y al inhibidor

de la óxido nítrico sintasa NG-monometil-1-arginina (L-NMMA), antes, 4 horas después y 1 semana después de la infusión de rHDL (80 mg/kg basado en proteínas).

Al inicio HDL fue similar en DM2 que en los controles (1.1 ± 0.2 vs. 1.2 ± 0.3 mmol/L, ns). La vasodilatación inducida por 5HT (máx. $17 \pm 10\%$) y la vasoconstricción inducida por L-NMMA (máx. $17 \pm 15\%$) se redujeron en DM2 versus 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 restauró las respuestas del FBF a 5HT ($86 \pm 22\%$, $p < 0.05$) y L-NMMA ($-45 \pm 9\%$, $p < 0.01$) en 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 los valores iniciales). La infusión de rHDL no tuvo efecto en los controles. En consecuencia, este trabajo demuestra que el aumento agudo de HDL mejora la función endotelial en DM2 y que la mejora persiste durante al menos 7 días a pesar del retorno de la concentración de HDL al valor inicial.

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

Preferentemente, la administración es administración parenteral.

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

Según se usa en este documento, las referencias a "tratamiento de la disfunción endotelial" se deben considerar como referencias a la mejora de la función endotelial en el tratamiento de los trastornos que se relacionan con la disfunción endotelial. Dichos trastornos incluyen los trastornos macrovasculares (relacionados con los grandes vasos sanguíneos) como ataque isquémico transitorio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca y enfermedad vascular periférica, así como los trastornos microvasculares (relacionados con los vasos sanguíneos pequeños) como retinopatía diabética (no proliferativa, proliferativa, edema macular), microalbuminuria, macroalbuminuria, insuficiencia renal en fase terminal, disfunción eréctil, neuropatía autónoma, neuropatía periférica, osteomielitis e isquemia de miembros inferiores.

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

De acuerdo con la presente invención, se debe administrar HDL a un paciente diabético. El término "HDL" según se usa en este documento se refiere a todas las formas de las lipoproteínas de alta densidad e incluye HDL madura, HDL naciente o HDL reconstituida (rHDL) o cualquiera de sus mezclas, así como rHDL producida a partir de apolipoproteína recombinante o uno de sus análogos con relación funcional a HDL naciente o reconstituida. Dichos análogos incluyen péptidos funcionales derivados de la estructura de apolipoproteína (Apo) como los descritos en las publicaciones de patentes internacionales N° WO 99/16459 y WO 99/16408.

Las lipoproteínas de alta densidad constan de un componente proteico y lípido. Las proteínas son preferentemente apolipoproteínas, por ej. apolipoproteínas humanas como la apolipoproteína A-I (apoA-I), la apolipoprotein A-II (apoA-II) o la apolipoproteína A-IV (apoA-IV) o apolipoproteínas recombinantes o péptidos funcionalmente homólogos con propiedades similares. Los lípidos adecuados son fosfolípidos, preferentemente fosfatidilcolina, opcionalmente mezclada con otros lípidos (colesterol, ésteres de colesterol, triglicéridos, esfingolípidos u otros lípidos). Los lípidos pueden ser lípidos sintéticos, lípidos naturales o sus combinaciones.

Preferentemente, la HDL es HDL reconstituida.

La producción de HDL reconstituidas fue descrita, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 5652339 y por Matz y Jonas (25) y Lerch *et al* (26). La producción de rHDL con apolipoproteínas recombinantes se describe, a modo de ejemplo, en la patente europea N° EP 469017 (en levadura), la patente de Estados Unidos N° 6559284 (en *E. coli*) y las publicaciones de patentes internacionales N° WO 87/02062 (en *E. coli*, levaduras y células Cho) y WO 88/03166 (en *E. coli*).

La HDL se administra en una cantidad eficaz. Una "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria al menos en parte para lograr la respuesta deseada, o para retrasar la aparición o inhibir el avance o detener por completo, la aparición o el avance de la afección o el trastorno particular en tratamiento. La cantidad varía dependiendo de la salud y el estado físico de la persona a ser tratada, el origen racial del individuo a ser tratado, el grado de protección deseado, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica y otros factores pertinentes. Se espera que los Rangos de dosis preferidos de HDL sean de 0.1-200 mg, más preferentemente de 10-80 mg de HDL

(peso basado en apolipoproteína) por kg de peso corporal por tratamiento. Por ejemplo, la dosis de HDL que se administre puede ser de aproximadamente 0.2-100 mg de HDL por kg de peso corporal (peso basado en apolipoproteína) administrada como una inyección intravenosa o como infusión durante un período de tiempo, por ejemplo, durante un período clínicamente necesario que varíe desde unos minutos a varias horas, por ejemplo hasta de 24 horas. Si fuera necesario, la administración de HDL se puede repetir una o varias veces. La cantidad real administrada se determinará tanto mediante la naturaleza de la afección o trastorno en tratamiento como mediante la velocidad a la cual se administra la HDL.

Preferentemente, el paciente es un ser humano, sin embargo, la presente invención se extiende al tratamiento y la profilaxis de otros pacientes mamíferos como los primates, el ganado (por ej. ovejas, cerdos, ganado vacuno, caballos, burros), animales para pruebas de laboratorio (por ej. ratones, conejos, ratas, conejillos de Indias), animales de compañía (por ej, perros, gatos) y animales salvajes cautivos.

De acuerdo con la presente invención, preferentemente la HDL se debe administrar a un paciente por vía parenteral. La administración parenteral incluye cualquier vía de administración que no sea a través del tubo digestivo (es decir, no enteral), por ejemplo la administración por inyección, infusión y similares. La administración por inyección incluye, a modo de ejemplo, en una vena (intravenosa), una arteria (intrarterial), un músculo (intramuscular) y debajo de la piel (subcutánea). La HDL también se puede administrar en una formulación en depot o de liberación retardada, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, en una dosis que sea suficiente para obtener el efecto farmacológico deseado.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral consisten convenientemente en una preparación acuosa estéril del principio activo que sea preferentemente isotónica con la sangre del receptor. Las preparaciones acuosas se pueden formular de acuerdo con las técnicas conocidas utilizando dispersantes o humectantes y suspensivos adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente atóxico aceptable para uso parenteral, como por ejemplo una solución en polietilenglicol y ácido láctico. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer, carbohidratos adecuados (por ej. sacarosa, maltosa, trehalosa, glucosa) y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convenientemente aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Con este fin, se puede utilizar cualquier aceite fijo blando incluidos los mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se pueden usar ácidos grasos como el ácido oleico.

La formulación de dichas composiciones terapéuticas es bien conocida por las personas especializadas en este campo. Los excipientes y/o diluyentes adecuados, farmacéuticamente aceptables, incluyen cualquiera y todos los solventes convencionales, medios de dispersión, rellenos, excipientes sólidos, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares. El uso de dichos medios y agentes para principios farmacéuticamente activos es conocido en el área, y se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, Mack Publishing Company, Pennsylvania, EE.UU. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, su uso está previsto en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. También se pueden incorporar en las composiciones principios activos complementarios.

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación sostenida. Los sistemas de administración de liberación sostenida preferidos son los que pueden proporcionar una liberación del principio activo de la invención en gránulos o cápsulas de liberación sostenida. Existen muchos tipos de sistemas de administración de liberación sostenida. Éstos incluyen, pero no exclusivamente, (a) sistemas erosivos que contienen el principio activo dentro de una matriz y (b) sistemas de difusión en los cuales el principio activo penetra a una velocidad controlada a través de un polímero.

La presente invención también proporciona lipoproteína de alta densidad (HDL) para usar en el tratamiento de la disfunción endotelial en un paciente diabético.

Aún en otro aspecto, la invención proporciona el uso de lipoproteína de alta densidad (HDL) en la fabricación de un medicamento para la administración, preferentemente la administración parenteral, en el tratamiento de la disfunción endotelial en un paciente diabético.

La presente invención se ilustra aún más en el ejemplo no limitante siguiente.

Ejemplo

I. Métodos

Se inscribieron siete pacientes no fumadores con DM2 sin complicaciones (4 hombres y 3 mujeres) y 7 sujetos de control no fumadores, de edad y género coincidentes, normolipémicos (4 hombres y 3 mujeres). Los criterios de

inclusión para los pacientes con DM2 fueron los siguientes: (1) glucosa plasmática en ayunas >7.0 mmol/L, (2) en tratamiento con dieta y metformina; (3) no usan insulina exógena; (4) dislipemia leve con niveles de triglicéridos y LDL colesterol plasmáticos de menos de 2.0 y 3.5 mmol/l, respectivamente. La presencia de enfermedad macrovascular, definida como anomalías ECG, índice tobillo-braquial anormal o antecedentes de episodios cardiacos, cerebrales o vasculares periféricos y neuropatía autónoma fueron criterios de exclusión para los pacientes o los sujetos de control. Todos los pacientes femeninos eran postmenopáusicas y no estaban recibiendo terapia de reemplazo hormonal. La mediana de la duración de la diabetes fue de 5.2 ± 1.2 años [media \pm DE]. Las evaluaciones se realizaron al menos 4 semanas después de la cesación del medicamento vasoactivo como inhibidores de la ACE, bloqueadores del receptor de la angiotensina, antagonistas del canal del calcio, aspirina, AINES y suplementos vitamínicos. Ninguno de los pacientes estaba en tratamiento con estatina. El alcohol, la cafeína y la metformina fueron suspendidos 12 horas antes del estudio. Todos los sujetos dieron consentimiento informado por escrito y se obtuvo la aprobación de la Junta de revisión interna del Academic Medical Center (AMC), University of Amsterdam, Amsterdam, Los Países Bajos. El estudio se llevó a cabo conforme a los principios de la declaración de Helsinki.

Protocolo del estudio

Se evaluó la función vascular al inicio y después de la infusión de rHDL utilizando pletismografía de galgas extensométricas de oclusión venosa como se publicó previamente (EC-4; Hokanson Inc, Bellevue, EE.UU.) (27). Las mediciones se realizaron en una habitación silenciosa con una temperatura constante (22 °C a 24 °C) y empezaron a las 8:00 a.m. Los sujetos permanecieron en posición supina durante todo el estudio. La arteria braquial del brazo no dominante se canuló con un catéter de poliuretano calibre 20, flexible (Arrow Inc, Reading, EE.UU.). La inserción fue seguida de un intervalo de 30 minutos de infusión salina para permitir el restablecimiento de las condiciones iniciales. Después de eso, se midió el flujo sanguíneo del antebrazo (FBF), expresado en mililitros por minuto por 100 mL de volumen de tejido del antebrazo (FAV) simultáneamente en ambos brazos. Se utilizó un sistema de onda-R-activa basado en microcomputadoras para monitoreo en línea. Durante cada medición, se inflaron manguitos de presión arterial alrededor de la parte superior de ambos brazos (40 mm Hg) utilizando un dispositivo de inflado rápido del manguito. Simultáneamente, se inflaron manguitos de muñecas bilaterales a la presión arterial sistólica anterior para excluir la circulación de mano (200 mmHg). Se monitorearon continuamente la presión intraarterial y la frecuencia cardíaca. A continuación se midió la respuesta FBF a dosis acumuladas del vasodilatador dependiente del endotelio serotonina (5HT, Sigma; 0.6, 1.8, and 6 ng 100 mL $FAV^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), el vasodilatador independiente del endotelio nitroprusiato de sodio (SNP, Spruyt Hillen; 6, 60, 180 y 600 ng 100 mL $FAV^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) y el inhibidor competitivo de la NO sintasa endotelial (eNOS) NG-monometil-L-arginina (L-NMMA, Kordia; 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ mL } FAV^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Los bloques de infusión de serotonina y nitroprusiato de sodio se administraron en orden aleatorio, seguidos de la infusión de L-NMMA. Todas las infusiones se prepararon en la farmacia del AMC conforme a las directrices de las buenas prácticas de manufactura (GMP). Los agentes se administraron intraarterialmente durante 6, 4 y 8 minutos a cada dosis, respectivamente, con una bomba de infusión de velocidad constante. Se promediaron seis mediciones durante los últimos 2 minutos de cada bloque de infusión para determinar la media del FBF. Los 3 bloques de infusión diferentes procedieron después de un período de descanso de 15 minutos o hasta que el FBF regresó a los valores iniciales. Posteriormente, se introdujo un catéter venoso en el brazo contralateral para la administración de rHDL a una dosis de 80 mg/kg de peso corporal en un período de 4 horas (CSL Behring, Berna, Suiza) (26, 27). Posteriormente, se repitieron los bloques de infusión. Después se solicitó a los pacientes que no reiniciaran su medicación (aparte de la metformina) y tuvieron que regresar 7 días después de la infusión de rHDL para repetir las mediciones de la función endotelial.

Evaluaciones de laboratorio

Se extrajeron muestras de sangre de los sujetos después de un ayuno nocturno de 12 horas, inmediatamente, 4 horas y 7 días después de la infusión de rHDL. Después de la centrifugación en el transcurso de 1 hora después de la extracción, se congelaron rápidamente alícuotas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se realizaron los ensayos. Todas las mediciones se realizaron en el laboratorio vascular y clínico del Academic Medical Center, Hospital de la Universidad de Amsterdam. Se midieron ALAT y ASAT mediante análisis de activación de piridoxalfosfato (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Se midió HbA1c por HPLC (Reagens Bio-Rad Laboratories B.V., Los Países Bajos) en un Variant II (Bio-Rad Laboratories). Se evaluó la glucosa plasmática por duplicado utilizando el método de hexoquinasa (Gluco-quant en Hitachi 917; Hitachi). Se determinaron los triglicéridos, el colesterol total, y los niveles de LDL y HDL plasmáticos por métodos enzimáticos estándar (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Se evaluaron los niveles plasmáticos de apoA-I y apoB en plasma almacenado por nefelometría.

Análisis Estadístico

Todos los resultados de los parámetros clínicos, incluidos los datos pletismográficos se expresan como la media \pm DE. Se compararon las estadísticas descriptivas entre los dos grupos mediante la prueba t de Student para 2 muestras independientes. Se promedió el FBF de 6 registros consecutivos durante los últimos 2 minutos de cada paso de infusión. Los registros de FBF realizados en los primeros 30 segundos después de inflar los manguitos para

muñeca no se utilizaron en el análisis. Se realizó el análisis estadístico de las mediciones del FBF, la calidad de HDL y los marcadores inflamatorios para cada sujeto entre los dos grupos por ANOVA bilateral para medidas repetidas. Un valor de probabilidad de $P < 0.05$ fue considerado significativo y un valor de $P < 0.01$ como altamente significativo.

5 II Resultados

Las características de los sujetos se enumeran en la tabla 1. Los valores de FBF iniciales no fueron significativamente diferentes entre los pacientes y los sujetos de control (Tabla 1). Como era de esperar, los niveles plasmáticos de glucosa plasmática en ayunas ($P < 0.01$), hemoglobina A1c ($P < 0.01$), triglicéridos ($P < 0.01$) y apoB ($P < 0.05$) fueron mayores en los pacientes con DM2. Los niveles de HDL-C y apoA-I fueron comparables entre los pacientes con DM2 y los controles. Después de la infusión de rHDL, la apoA-I plasmática aumentó en los pacientes con DM2 y de control después de 4 horas (1.2 ± 0.2 a 2.8 ± 0.4 versus 1.2 ± 0.2 a 2.7 ± 0.4 g/L, $p < 0.01$ respectivamente), mientras que permaneció un aumento leve en pacientes con DM2 7 días después de la infusión (1.5 ± 0.3 g/L, $p < 0.05$ en comparación con los valores iniciales). Los niveles de apoB plasmáticos fueron superiores en DM2 en comparación con los controles y no fueron afectados por la infusión de rHDL (1.0 ± 0.3 a 0.9 ± 0.3 versus 0.7 ± 0.2 a 0.7 ± 0.2 g/L, ns, respectivamente).

Efectos agudos y a largo plazo de la infusión de rHDL sobre la biodisponibilidad de NO

20 La infusión intrarterial del vasodilatador dependiente del endotelio serotonina aumentó el FBF de manera dependiente de la dosis en ambos grupos. Al inicio del estudio, la respuesta del FBF a la serotonina estuvo atenuada 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 de 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 la serotonina en los controles (Figura 1).

Al inicio la respuesta vasoconstrictora a L-NMMA, que refleja la actividad de NO inicial, estuvo atemperada en pacientes con DM2 en comparación con los controles ($p < 0.001$, Figura 2). Después de la infusión de rHDL, la respuesta al constrictor L-NMMA mejoró, nuevamente aún presente 7 días después de la infusión ($p < 0.01$, Figura 2). En consonancia con los datos de la serotonina, la infusión de rHDL no tuvo efecto sobre la respuesta a L-NMMA en los sujetos de control (Figura 2).

Finalmente, la vasodilatación independiente del endotelio en respuesta al SNP fue menor en DM2 versus los controles ($p < 0.01$, Figura 3) y la infusión de rHDL no mostró efecto sobre la respuesta al vasodilatador SNP ni en los pacientes ni en los controles.

III Discusión

40 El presente estudio demuestra que la actividad basal y la estimulada por NO están seriamente comprometidas en los pacientes con DM2 en comparación con controles de género y edad compatibles. Curiosamente, a pesar de los niveles de HDL próximos a los normales en pacientes con DM2, la infusión de rHDL mejoró significativamente la función endotelial. Esta mejora persistió hasta 7 días después de la infusión de rHDL, momento en el cual los niveles de HDL ya habían vuelto a los valores iniciales. Estos datos implican que estrategias de aumento de HDL pueden ofrecer beneficios terapéuticos en DM2, incluso si los niveles de HDL-C no están claramente disminuidos en estos pacientes.

Función vascular al inicio

50 En consonancia con estudios previos (8, 9, 12), se confirma la presencia de actividad de NO basal deteriorada así como de liberación de NO atenuada en DM2 luego de confirmar la estimulación mediada por receptor. Varios mecanismos han demostrado contribuir a la disfunción endotelial en la diabetes. La menor biodisponibilidad del cofactor esencial tetrahidrobiopterina (BH4) se asocia a desacoplamiento de la NO-sintasa endotelial que conduce a la producción directa de radicales oxígeno en lugar de NO por eNOS (28-30). Otras fuentes también pueden contribuir al aumento de la producción del radical, incluida la NADPH oxidasa, así como el desacoplamiento mitocondrial (10). El papel crucial de ROS en la disfunción vascular diabética ha sido subrayado por los estudios de intervenciones que reportan la restauración completa de la función endotelial luego de la infusión intrarterial de alta concentración de antioxidantes (9, 12).

Efecto de la infusión de rHDL sobre la función vascular

La infusión de rHDL se asoció a una rápida mejora de la actividad basal de NO así como de la actividad de NO estimulada por receptor, en el correr de unas pocas horas después de la infusión. Una primera explicación sería que rHDL aumenta la producción de NO. El óxido nítrico (NO) es sintetizado por eNOS a través de la conversión de L-

arginina a L-citrulina. Su actividad es regulada por vías de transducción de la señalización complejas como la activación de las cinasas que alteran la fosforilación de la eNOS, es decir, la señalización de la MAP-cinasa y akt-cinasa, o aumentan el contenido de Ca^{2+} intracelular seguido de la activación dependiente de calcio-calmodulina de eNOS (33). Yuhanna demostró que la unión de apoA-I al receptor depurador endotelial B-1 fue acompañada por mayores respuestas de relajación dependiente del endotelio en las aortas (24), en gran parte debido a la activación de las cinasas MAP y akt (32). Además, HDL también tiene la capacidad de regular el contenido de la membrana de eNOS dentro de las células endoteliales preservando la estabilidad de la proteína eNOS así como previniendo la traslocación de eNOS desde la membrana celular a los organelos intracelulares (23). Todos esos efectos pueden haber contribuido al aumento en la disponibilidad de NO basal, evaluada como mayores respuestas vasoconstrictoras al inhibidor competitivo de NO L-NMMA, después de la infusión de rHDL. En contraste, los mecanismos mencionados no pueden explicar totalmente el aumento en la disponibilidad de NO dependiente de serotonina, estimulada por receptor, que es dependiente de la activación calcio-calmodulina de eNOS (31). Puesto que la unión de la serotonina al receptor endotelial 5HT-2A (33) no es probable que cambie con la infusión de rHDL, la menor degradación de NO por los radicales oxígeno proporciona una segunda vía principal que puede contribuir a una mayor biodisponibilidad de NO. De hecho, HDL tiene potentes propiedades antioxidantes, ni por asomo debida a la presencia de enzimas como la paraoxonasa y la hidrolasa del factor activador de plaquetas sobre la partícula de HDL (23).

Efectos a largo plazo de rHDL sobre la función vascular

Sorprendentemente, la vasodilatación dependiente del endotelio fue aún significativamente mejorada 1 semana después de la infusión de rHDL. En contraste, apoAI así como los niveles de HDL casi habían vuelto a los niveles previos a la infusión. Notablemente, los niveles iniciales de HDL en DM2 tampoco fueron significativamente diferentes de los de los sujetos de control. En contraste, la infusión de rHDL no tuvo efecto alguno sobre la función vascular en los controles. Estos datos implican que, a pesar de la concentración normal de HDL, la calidad de las HDL puede estar deteriorada en DM2. De hecho, la pérdida de los efectos protectores de HDL en la DM2 se ha atribuido en parte a glucosilación no enzimática de predominantemente cadenas de leucina de HDL. La glucosilación de apoAI-HDL compromete la capacidad de HDL de proteger a LDL del daño oxidativo, entre otras cosas por la pérdida de actividad de PON-1 (34). Además, HDL glucosilada reduce la expresión de eNOS en el endotelio, que deriva en una capacidad deteriorada de producir NO (35). De hecho, el nivel de actividad antioxidante de HDL en pacientes con DM2 está íntimamente vinculado a los niveles de estrés oxidativo y control de la glucemia (36).

Limitaciones del estudio

Puesto que no se observó un efecto de rHDL 4 horas después de la infusión en el grupo de control, no se repitieron los estudios de la función vascular en el grupo de control después de 7 días. En consecuencia, se compararon los datos de la función vascular en el día 7 en los pacientes con DM2 con las observaciones al inicio y el día 1 en los controles. Sin embargo, puesto que la principal conclusión sobre la función vascular se refiere a la mejora persistente en comparación con los pacientes con DM2 al inicio, la falta de estudio el día 7 en los controles no tiene impacto sobre las conclusiones obtenidas en el presente estudio. En segundo lugar, aunque sólo se estudió un grupo relativamente pequeño de pacientes con DM2, el hecho de que se encontrara una mejora significativa ya en un grupo limitado de pacientes y reproducible después de 4 horas y 1 semana, es un respaldo para una conclusión clara sobre el efecto de HDL sobre la función vascular en pacientes con DM2, a pesar del pequeño tamaño de la muestra.

Implicaciones clínicas para los pacientes con DM2

Las estatinas son el paradigma central para las estrategias de prevención cardiovasculares. Sin embargo, teniendo en cuenta el gran número de episodios no impedidos durante el tratamiento con estatinas, la búsqueda de terapias de combinación óptimas está en plena marcha. La promesa de estrategias de aumento de HDL se está expandiendo rápidamente. La fuerte relación inversa entre HDL-C y los episodios cardiovasculares es un hallazgo constante en pacientes tanto no diabéticos como diabéticos. Desafortunadamente, datos sólidos que proporcionen pruebas de la reducción del riesgo cardiovascular tras las intervenciones de aumento de HDL son escasos, principalmente debido a la falta de compuestos selectivos y potentes que aumenten HDL (37).

Datos recientes demostraron que 5 infusiones semanales de rHDL producidas con una apolipoproteína variante (apoA-I Milano) fueron capaces de retardar el avance o incluso de inducir regresión del volumen de un ateroma coronario en pacientes con infarto miocárdico reciente (38). En consonancia con un efecto tan rápido, estudios experimentales así como in vivo han demostrado que la capacidad antiaterogénica de HDL no se limita simplemente a su papel en el transporte inverso del colesterol. La presente observación de restauración aguda y persistente de la disfunción endotelial en DM2 presta un apoyo adicional a los efectos de HDL más allá de su papel en el transporte inverso del colesterol. Esto sostiene una función para el aumento de HDL en DM2 incluso si los niveles de HDL no están claramente disminuidos.

Tabla 1.

	DM2 (n = 7)	CON (n = 7)
Edad, años	53.6 ± 3.0	48.6 ± 15.1
Género (femenino/masculino)	¾	¾
IMC, kg/m ²	28.9 ± 2.4	25.6 ± 3.6
Fumador (s/n)	0/7	0/7
Presión arterial sistólica, mm de Hg	148 ± 12	135 ± 16
Presión arterial diastólica, mm de Hg	78 ± 13	83 ± 9
Frecuencia cardíaca, lpm	65 ± 5	61 ± 4
Glucosa plasmática 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 #
FBF basal, ml·100 mL FAV ⁻¹ ·min	4.1 ± 2.0	2.6 ± 0.9

* p < 0.05, #p < 0.01

REFERENCES

5 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.
 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.
 10 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.
 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 placebo-controlled trial. Lancet (2004); 364(9435):685-96.
 15 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.
 7. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. "Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease." Circulation (2000); 101:1899-1906.
 20 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.
 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.
 25 10. Brownlee M. "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature (2001); 414(6865):813-20.
 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.
 30 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.
 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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 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.
21. Basisoendial 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." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2005); 25(9); e133-34.
- 20 22. Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW, 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.
- 25 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.
- 25 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.
- 30 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.
27. Basisoendial 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.
- 35 28. Stroes ES, 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.
29. Alp NJ, Mussa S, Khoo J, Cai S, Guzik T, Jefferson A, Goh N, Rockett KA, Channon KM. "Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression." *J Clin Invest.* (2003); 112(5):725-235.
- 40 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.
- 45 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 ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts." *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* (2004); 9(1):43-50.
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.
- 50 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.
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.
- 55 37. Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR et al; FIELD study investigators. "Effects of long-term 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.
- 60 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

- 5 1. Lipoproteína de alta densidad (HDL) para ser utilizada en el tratamiento de la disfunción endotelial en un paciente diabético.
2. La lipoproteína para ser utilizada según la reivindicación 1, donde dicho paciente es un paciente con diabetes tipo 2.
- 10 3. La lipoproteína para ser utilizada según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho tratamiento es el tratamiento de un trastorno macrovascular inducido por la diabetes seleccionado entre ataque isquémico transitorio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca y enfermedad vascular periférica.
- 15 4. La lipoproteína para ser utilizada según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho tratamiento es el tratamiento de un trastorno microvascular inducido por la diabetes seleccionado entre retinopatía diabética (no proliferativa, proliferativa, edema macular), microalbuminuria, macroalbuminuria, insuficiencia renal en fase terminal, disfunción eréctil, neuropatía autónoma, neuropatía periférica, osteomielitis e isquemia de miembros inferiores.
- 20 5. La lipoproteína para ser utilizada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha HDL se elige del grupo formado por HDL madura, HDL naciente, HDL reconstituida, HDL producida con apolipoproteína recombinante, un péptido funcional u otro análogo de éstos.
- 25 6. La lipoproteína para ser utilizada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha HDL es HDL reconstituida.
7. La lipoproteína para ser utilizada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha HDL se administra en una dosis que varía de 0.1-200 mg/kg de peso corporal del paciente por tratamiento, preferentemente en una dosis que varía de 10-80 mg/kg de peso corporal por tratamiento.
- 30 8. La lipoproteína para ser utilizada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha administración es administración parenteral.
- 35 9. La lipoproteína para ser utilizada según la reivindicación 8, donde dicha administración parenteral se elige del grupo constituido por inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular o subcutánea o infusión.
10. La lipoproteína para ser utilizada según la reivindicación 8, donde dicha administración parenteral es inyección intravenosa o infusión.
- 40 11. El uso de lipoproteína de alta densidad (HDL) en la fabricación de un medicamento destinado a la administración en el tratamiento de la disfunción endotelial en un paciente diabético.

Figura 1

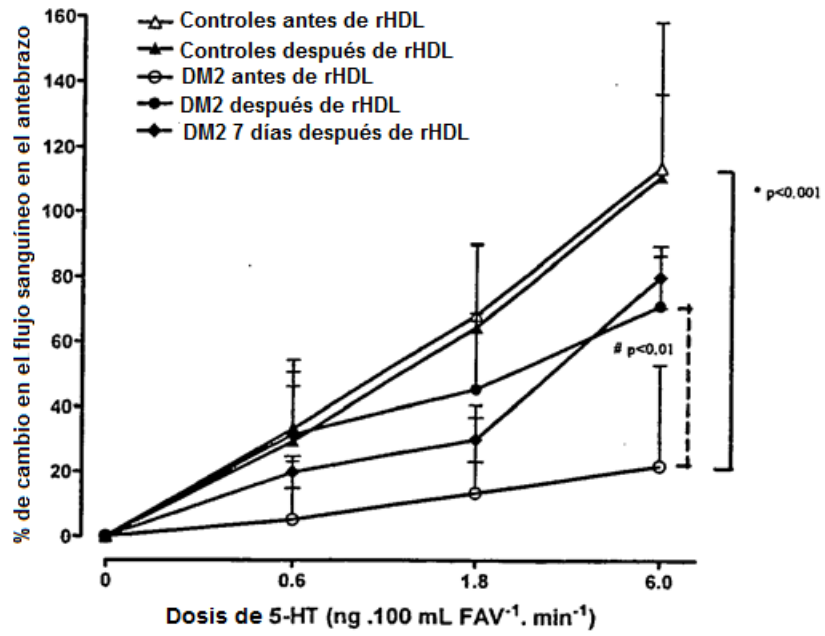


Figura 2

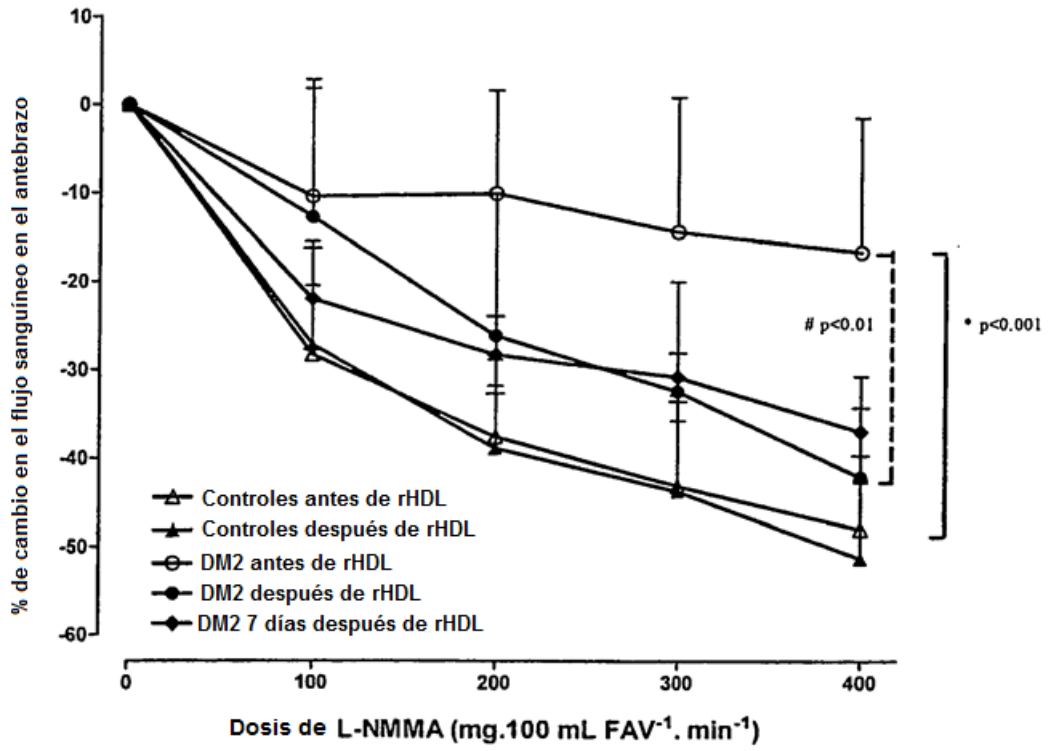


Figura 3

