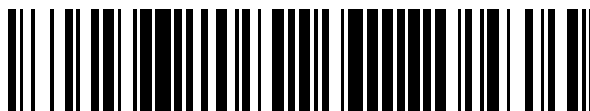


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 547**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

C07K 14/775 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2004** **E 10185381 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 2368565**

54 Título: **Enriquecimiento de lipoproteínas de alta densidad pre-beta**

30 Prioridad:

03.07.2003 US 484690 P

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

07.10.2015

73 Titular/es:

HDL THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

601 21st Street, Suite 300

Vero Beach, FL 32960, US

72 Inventor/es:

BELLOTTI, MARC;

BREWER, H. BRYAN, JR.;

AKEEFE, HASSIBULLAH;

CONNER, ADAM PAUL y

PERLMAN, TIMOTHY JON

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 547 547 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

Enriquecimiento de lipoproteínas de alta densidad pre-beta.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método in vitro para modificar una distribución de proteínas en un fluido. Además, la presente invención se refiere a un fluido que se puede obtener por este método in vitro para uso en la mejora de una ruta de ABCA1, que cambia la reología de la sangre de un paciente con circulación sanguínea deficiente y para uso en regresión de aterosclerosis.

Antecedentes

Introducción-Hiperlipidemia y arterioesclerosis.

10 Las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y vasculares periféricas son responsables de una serie significativa de muertes anualmente en muchos países industrializados. Uno de los procesos patológicos más comunes que subyacen estas enfermedades es la arterioesclerosis. La arterioesclerosis se caracteriza por lesiones, que empiezan como engrosamientos grasos localizados en los aspectos internos de los vasos sanguíneos que suministran sangre al corazón, cerebro y otros órganos y tejidos por todo el cuerpo. Con el tiempo, estas lesiones
15 ateroscleróticas pueden ulcerarse, exponiendo depósitos de placa grasos que pueden desprenderse y embolizarse en la circulación. Las lesiones ateroscleróticas obstruyen las luces de los vasos sanguíneos afectados y con frecuencia reducen el flujo sanguíneo dentro de los vasos sanguíneos, que puede dar como resultado isquemia del tejido suministrado por el vaso sanguíneo. La embolización de placas ateroscleróticas puede producir obstrucción aguda e isquemia en vasos sanguíneos distales. Dicha isquemia, prolongada o aguda, puede dar como resultado
20 infarto o apoplejía de la que el paciente puede o no recuperarse. La isquemia similar en una arteria que suministra a una extremidad puede dar como resultado gangrena requiriendo amputación de la extremidad.

Durante algún tiempo, la comunidad médica ha reconocido la relación entre la arterioesclerosis y los niveles de lípidos dietéticos, colesterol en suero y triglicéridos en suero en el torrente circulatorio de un paciente. Se han realizado muchos estudios epidemiológicos que revelan que la cantidad de colesterol en suero en el torrente
25 circulatorio de un paciente es un indicador significativo de enfermedad coronaria. De manera similar, la comunidad médica ha reconocido la relación entre hiperlipidemia y resistencia a la insulina, que puede conducir a diabetes sacarina. Además, se ha identificado que la hiperlipidemia y la arterioesclerosis están relacionadas con otros problemas de salud principales, tales como obesidad e hipertensión.

Transporte de colesterol.

30 El colesterol que circula en la sangre es soportado por lipoproteínas del plasma que transportan lípidos por toda la sangre. Las lipoproteínas del plasma se clasifican en cinco tipos de acuerdo con el tamaño: quilomicrones (que son las de mayor tamaño y densidad más baja), lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL, por sus siglas en inglés), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, por sus siglas en inglés), lipoproteínas de densidad baja (LDL, por sus siglas en inglés) y lipoproteínas de densidad alta (HDL, por sus siglas en inglés) (que son las menos y las más
35 densas). Estas lipoproteínas en plasma presentan diferencias de tamaño, densidad, diámetro, contenido en proteínas, contenido en fosfolípidos y contenido en triacilglicerol, conocido para un experto en la materia. De éstas, la lipoproteína de densidad baja (LDL) y la lipoproteína de densidad alta (HDL) son principalmente las proteínas portadoras de colesterol principales. El componente proteínico de LDL, la apolipoproteína-B (Apo B) y sus productos comprenden los elementos aterogénicos. Los niveles de LDL en plasma elevados y los niveles de HDL reducidos
40 son reconocidos como la causa principal de enfermedad coronaria debido a que Apo B está en la concentración más alta en las partículas de LDL y no está presente en partículas de HDL. La apolipoproteína A-1 (Apo A-1) y la apolipoproteína A-2 (Apo A-2) se encuentran en HDL. Otras apolipoproteínas, tales como Apo C y sus subtipos (C-1, C-2 y C-3), Apo D y Apo E también se encuentran en HDL. También se observan Apo C y Apo E en partículas de LDL.

45 Se han indicado numerosas clases principales de partículas de HDL incluyendo HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b} y HDL_{3c} (Segrest et al., Curr. Opin. Lipidol. 11: 105-115, 2.000). Se han descrito diversas formas de partículas de HDL sobre la base de la movilidad electroforética sobre agarosa como dos poblaciones principales, una fracción principal con movilidad de α -HDL y una fracción minoritaria con migración similar a VLDL (Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1.300; 73-85, 1.996). Esta última fracción se ha denominado pre- β HDL y se pensó que estas partículas eran la
50 subclase de partículas de HDL más eficaz para inducir eflujo de colesterol celular (Segrest et al., Curr. Opin. Lipidol. 11: 105-115, 2.000). Las partículas pre- β HDL se han separado además en pre- β_1 HDL, pre- β_2 HDL y pre- β_3 HDL. Estas partículas de lipoproteínas están constituidas por Apo A-1, fosfolípidos y colesterol libre. Se considera que las partículas pre- β HDL son los primeros aceptores de colesterol libre celular y son esenciales en la transferencia de manera eventual de colesterol libre y esterificado a α -HDL (Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1.996). Las partículas pre- β_3 HDL pueden transferir colesterol a α -HDL o se pueden convertir en α -HDL. Estas
55 partículas pre- β HDL se han caracterizado en términos de su carga, masa molecular (que oscila desde 40 kDa - 420 kDa), tamaño (radio de Stoke 4 nm - 15 nm), forma (elipsoidal, discoidal o esférica) y composición química (proteína

(incluyendo Apo A-1), colesterol libre, colesterol esterificado, fosfolípidos y la relación de colesterol libre a fosfolípidos (véase Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1.996 para detalles adicionales)). Los niveles de HDL se correlacionan inversamente con aterosclerosis y arteriopatía coronaria. De acuerdo con esto, lo que se requiere es un método para disminuir o eliminar el colesterol de estas diversas partículas de HDL, especialmente las partículas pre-β HDL, a fin de que estén disponibles para eliminar colesterol adicional de las células.

El colesterol se sintetiza por el hígado o se obtiene a partir de fuentes dietéticas. El LDL es responsable de la transferencia de colesterol del hígado a los tejidos en diferentes sitios en el cuerpo. Sin embargo, si el LDL se recoge en las paredes arteriales, experimenta oxidación producida por radicales libres de oxígeno liberados de los procesos químicos corporales e interactúa de manera perjudicial con los vasos sanguíneos. El LDL modificado produce glóbulos blancos en el sistema inmunitario para acumularse en las paredes arteriales, formando una sustancia grasa denominada placa y lesionando las capas celulares que revisten los vasos sanguíneos. El LDL modificado produce glóbulos blancos en el sistema inmunitario para recoger en las paredes arteriales, formando una sustancia grasa denominada placa y lesionando las capas celulares que revisten los vasos sanguíneos. El LDL oxidado modificado también reduce el nivel de óxido nítrico, que es responsable de relajar los vasos sanguíneos y que permite de ese modo que la sangre fluya libremente. A medida que este proceso continúa, las paredes arteriales se constriñen lentamente, dando como resultado un endurecimiento de las arterias y reduciendo de ese modo el flujo sanguíneo. La acumulación gradual de placa puede dar como resultado el bloqueo de un vaso coronario y por último un infarto.

Al contrario que LDL, los niveles de HDL en plasma altos son deseables debido a que desempeñan una función principal en el "transporte de colesterol inverso", donde el exceso de colesterol es transferido desde los sitios de los tejidos al hígado donde es catabolizado y eliminado. Los niveles de colesterol total óptimos son 200 mg/dl o por debajo con un nivel de colesterol LDL de 160 mg/dl o por debajo y un nivel de colesterol HDL de 45 mg/dl para hombres y 50 mg/dl para mujeres. Se recomiendan niveles de LDL inferiores para individuos con un historial de colesterol elevado, aterosclerosis o arteriopatía coronaria.

Métodos de tratamiento actuales.

La hiperlipidemia se puede tratar cambiando la dieta de un paciente. Sin embargo, la dieta como un modo principal de tratamiento requiere un esfuerzo importante por parte de pacientes, médicos, nutricionistas, dietistas y otros profesionales de asistencia sanitaria y así grava de manera indeseable los recursos de los profesionales sanitarios. Otro aspecto negativo de este tratamiento es que su éxito no descansa exclusivamente en la dieta. Más bien, el éxito del tratamiento dietético depende de una combinación de factores sociales, psicológicos, económicos y de comportamiento. Así, el tratamiento basado sólo en corregir deficiencias en la dieta de un paciente no siempre tiene éxito.

En los casos en que la modificación dietética no haya tenido éxito, se ha usado tratamiento farmacológico como una alternativa. Dicho tratamiento ha incluido usar fármacos lipolipidémicos comercialmente disponibles administrados solos o junto con otros tratamientos como suplemento a control dietético. Estos fármacos, denominados estatinas, incluyen estatinas naturales, lovastatina, pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina. Las estatinas son particularmente eficaces para reducir los niveles de LDL y también son eficaces en la reducción de triglicéridos, aparentemente en proporción directa a sus efectos de reducción de LDL. Las estatinas elevan los niveles de HDL, pero en menor extensión que otros fármacos anti-colesterol. Las estatinas también aumentan el óxido nítrico, que como se describió anteriormente, se reduce en presencia de LDL oxidado.

Las resinas de ácido biliar, otro tratamiento farmacológico, actúa por unión con ácido biliar, una sustancia fabricada por el hígado usando colesterol como uno de los componentes de fabricación principales. Debido a que los fármacos se unen con los ácidos biliares en el tubo digestivo, se excretan después con las heces en vez de ser absorbidos en el cuerpo. El hígado, como resultado, debe tomar más colesterol de la circulación para continuar construyendo ácidos biliares, dando como resultado una disminución total en los niveles de LDL.

El ácido nicotínico, o niacina, es también conocido como vitamina B₃. Es extremadamente eficaz en la reducción de niveles de triglicéridos y elevación de niveles de HDL mayores que cualquier otro fármaco anticolesterol. El ácido nicotínico también disminuye el colesterol LDL.

Los derivados de ácido fibríco, o fibratos, se usan para disminuir los niveles de triglicéridos y aumentar HDL cuando otros fármacos usados normalmente para estos fines, tales como niacina, no son eficaces.

El probucol disminuye los niveles de colesterol LDL, sin embargo, también disminuye los niveles de HDL. Generalmente se usa para ciertos trastornos genéticos que producen altos niveles de colesterol o en casos en que otros fármacos que reducen el colesterol son ineficaces o no se pueden usar.

Los fármacos hipolipidémicos han tenido grados variables de éxito en la reducción de lípidos en sangre; sin embargo, ninguno de los fármacos hipolipidémicos trata con éxito todos los tipos de hiperlipidemia. Mientras algunos fármacos hipolipidémicos han encontrado bastante éxito, la comunidad médica no ha encontrado pruebas concluyentes de que los fármacos hipolipidémicos produzcan regresión de la aterosclerosis. Además, todos los

fármacos hipolipidémicos presentan efectos secundarios no deseables. Como resultado de la ausencia de éxito del control dietético, el tratamiento farmacológico y otros tratamientos, la aterosclerosis sigue siendo una causa principal de muerte en muchas partes del mundo.

5 Se han usado nuevos tratamientos para reducir la cantidad de lípidos en pacientes para los cuales no fueron suficientemente eficaces los tratamientos con fármacos y dieta. Por ejemplo, los procedimientos extracorporales como plasmaféresis y aféresis de LDL se han empleado y se muestra que son eficaces en la disminución de LDL.

10 El tratamiento de plasmaféresis o tratamiento de intercambio de plasma, implica la sustitución del plasma de un paciente con plasma de donador o más normalmente una fracción de proteínas del plasma. La plasmaféresis es un procedimiento según el cual el plasma sanguíneo se elimina de las células sanguíneas mediante un separador de células. El separador actúa haciendo rotar la sangre a alta velocidad para separar las células del fluido o haciendo pasar la sangre a través de una membrana con poros tan pequeños que sólo el componente del fluido de la sangre puede pasar a su través. Las células se devuelven a la persona que experimenta tratamiento, mientras se desecha el plasma y se reemplaza con otros fluidos.

15 Este tratamiento ha dado lugar a complicaciones debido a la introducción de proteínas extrañas y a la transmisión de enfermedades infecciosas. Además, la plasmaféresis presenta la desventaja de eliminación no selectiva de todas las proteínas en suero, tales como VLDL, LDL y HDL. Por otra parte, la plasmaféresis puede dar como resultado diversos efectos secundarios incluyendo reacciones alérgicas en la forma de fiebre, enfriamientos y erupción cutánea y posiblemente incluso anafilaxis.

20 Como se describió anteriormente, no es deseable eliminar HDL, que se segrega de tanto el hígado como el intestino, como partículas en forma de disco, incipientes que contienen colesterol y fosfolípidos. Se cree que HDL desempeña una función en el transporte de colesterol inverso, que es el procedimiento por el cual se retira el exceso de colesterol de los tejidos y se transporta al hígado para reutilizar o eliminar en la bilis.

25 Al contrario que la plasmaféresis, el procedimiento de aféresis de LDL retira selectivamente colesterol que contiene Apo B, tal como LDL, al tiempo que se retiene HDL. Se han desarrollado diversos métodos para aféresis de LDL. Estas técnicas incluyen absorción de LDL en perlas de heparina-agarosa, el uso de anticuerpos de LDL inmovilizados, absorción de filtración en cascada para inmovilizar sulfato de dextrano y precipitación de LDL a pH bajo en presencia de heparina. Cada método descrito anteriormente es eficaz en la eliminación de LDL. Este procedimiento de tratamiento presenta desventajas, sin embargo, incluyendo el fracaso en afectar de manera positiva a HDL o producir un cambio metabólico que pueda potenciar la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares. La aféresis de LDL simplemente trata los pacientes con hiperlipidemia grave.

30 Otro método más de conseguir una reducción en colesterol en plasma en hipercolesterolemia familiar homocigótica, hipercolesterolemia familiar heterocigótica y pacientes con hiperlipidemia adquirida es un procedimiento de eliminación de lípidos extracorpórea, referido como aféresis de colesterol. En la aféresis de colesterol, se extrae sangre de un paciente, se separa el plasma de la sangre y se mezcla el plasma con una mezcla de disolvente. La mezcla de disolvente extrae lípidos del plasma. Después, el plasma deslipidado se recombina con las células sanguíneas del paciente y se devuelve al paciente.

35 Los procedimientos de deslipidación extracorpórea convencionales, sin embargo, se dirigen hacia la deslipidación concurrente de LDL y HDL. Este procedimiento puede presentar una serie de desventajas. Debido a que LDL es más difícil de deslipidar, se diseñan sistemas extracorpóreos para someter los volúmenes de fluidos corporales a tratamiento sustancial, posiblemente por etapas de exposición y extracción de disolvente de fases múltiples. La exposición y extracción de disolvente multi-fase vigorosa puede presentar varias desventajas. Puede ser difícil retirar una cantidad suficiente de disolventes del plasma deslipidado para que se devuelva con seguridad el plasma deslipidado a un paciente.

40 Köstner, K. (J. Kardiol. (2.002) 9 (7-8): 328-331) revisa tratamientos que elevan el colesterol HDL o potencian el transporte inverso de colesterol.

45 Por lo tanto, la aféresis y los sistemas extracorpóreos existentes para tratamiento de constituyentes del plasma adolecen de una serie de desventajas que limitan su capacidad para ser usados en aplicaciones clínicas. Existe una necesidad de sistemas, aparatos y métodos mejorados capaces de eliminar lípidos de los componentes sanguíneos para proporcionar tratamientos y medidas preventivas para enfermedades cardiovasculares. Lo que se necesita también es un método para retirar de manera selectiva lípido de partículas de HDL y crear de ese modo partículas de HDL modificadas con capacidad aumentada para aceptar colesterol. Lo que también se requiere es un método para retirar selectivamente lípido de partículas de HDL y de ese modo crear partículas de HDL modificadas con capacidad aumentada para aceptar colesterol, sin afectar sustancialmente a las partículas de LDL.

Sumario de la invención

55 La presente invención se refiere a un método in vitro para modificar una distribución de proteínas en un fluido en el que la distribución de proteínas presenta un primer estado, teniendo el primer estado lipoproteínas de alta densidad alfa y lipoproteínas de alta densidad pre-beta, que comprende las etapas de:

exponer el fluido a un disolvente en el que la exposición modifica la distribución de proteínas del primer estado en un segundo estado, teniendo el segundo estado una concentración aumentada de lipoproteínas de densidad alta pre-beta en relación con el primer estado y

retirar el disolvente del fluido,

5 en el que el disolvente comprende sevoflurano, trifluoroetano o isoflurano.

Además, la presente invención se refiere al fluido que se puede obtener por el método in vitro de la presente invención para uso en la mejora de una ruta de ABCA1, cambiando la reología de la sangre de un paciente con circulación sanguínea deficiente y en regresión de aterosclerosis.

10 La presente memoria descriptiva describe sistemas, aparatos y métodos in vitro para crear partículas de HDL modificadas sin afectar sustancialmente a LDL. Estas partículas de HDL modificadas son derivadas de HDL con contenido reducido en lípidos, en particular contenido reducido en colesterol. Estas partículas de HDL modificadas presentan la capacidad para unirse a colesterol y se pueden administrar a un paciente para mejorar el eflujo de colesterol celular y reducir los niveles de colesterol en células, tejidos, órganos y vasos sanguíneos.

15 La presente invención también proporciona un fluido que comprende una distribución de proteínas modificada en la que el fluido presentaba un primer estado, teniendo el primer estado lipoproteínas de alta densidad alfa y lipoproteínas de alta densidad pre-beta y en la que el fluido biológico presenta un segundo estado, teniendo el segundo estado una concentración aumentada de lipoproteína de densidad alta pre-beta en relación con el primer estado, después de ser expuesto a un disolvente.

20 La presente invención también proporciona un fluido capaz de mejorar una ruta de ABCA1 de un paciente en la que el fluido biológico se prepara por modificación de un fluido con una primera concentración de lipoproteínas de alta densidad pre-beta en relación a proteína total, en la que la modificación aumenta la concentración de lipoproteína de alta densidad pre-beta en relación a proteína total.

25 La presente invención proporciona además un método in vitro para mejorar una ruta ABCA1 de un paciente con una primera distribución de proteínas, teniendo la primera distribución de proteínas una concentración de lipoproteínas de alta densidad pre-beta en relación a proteína total, que comprende la etapa de modificar un fluido que contiene la primera distribución de proteínas por exposición del fluido a un disolvente, en el que la modificación aumenta la concentración de lipoproteína de alta densidad pre-beta en relación a proteína total e introduciendo el fluido en el paciente.

30 La presente invención proporciona además un método in vitro para modificar una distribución de proteínas en un fluido en el que la distribución de proteínas presenta un primer estado, teniendo dicho primer estado lipoproteínas de alta densidad alfa y lipoproteínas de alta densidad pre-beta, que comprende las etapas de: exponer dicho fluido a un disolvente en el que la exposición modifica la distribución de proteínas del primer estado a un segundo estado, teniendo dicho segundo estado una concentración aumentada de lipoproteína de alta densidad pre-beta en relación a dicho primer estado y eliminando dicho disolvente del fluido.

35 La presente memoria descriptiva describe un método in vitro para retirar lípidos de fluidos, tales como plasma sanguíneo y de partículas de HDL sin afectar sustancialmente a LDL por tratamiento del fluido con disolventes y adición de energía para mezclar los disolventes y el fluido. Retirar lípido de partículas de HDL crea una partícula de HDL modificada con contenido reducido en lípido, que es capaz de unir lípido adicional y mejorar el eflujo de colesterol celular. Más en particular, la presente invención se refiere a la eliminación de lípidos de partículas de HDL en plasma sanguíneo usando un único disolvente o múltiples disolventes, creando de ese modo nuevas partículas que son derivadas de HDL con contenido reducido en lípidos.

40 Se describe que las partículas de LDL y HDL se separan previamente a tratamiento del plasma que contiene las partículas de HDL. Se extrae LDL y se trata el plasma para reducir el contenido en lípidos de partículas de HDL. Después de la eliminación de LDL, el plasma que contiene partículas de HDL se expone a agentes de eliminación de lípidos usando los presentes métodos in vitro para reducir los niveles de lípidos y crear derivados de partículas de HDL con contenido reducido en lípidos. Estas partículas demuestran capacidad mejorada para unirse a colesterol. Estos derivados de partículas de HDL y el plasma con contenido reducido en lípidos se pueden administrar al paciente para mejorar el eflujo de colesterol celular y tratar enfermedades y afecciones asociadas a los lípidos.

45 Además, se describe que el LDL es retenido (no separado previamente a tratamiento) y se emplea un sistema de disolventes para retirar selectivamente lípido de HDL y crear partículas constituidas por derivados de HDL con contenido reducido en lípidos al tiempo que no se afecta sustancialmente a LDL. El plasma separado se mezcla con un sistema de disolventes diseñado para disminuir de manera selectiva lípido en partículas de HDL presentes en el plasma. Se tiene cuidado para asegurar que el disolvente empleado, el método de mezclado empleado, el procedimiento, tiempo de mezcla y la temperatura crean un sistema de disolventes óptimo que eliminará de manera selectiva lípido de HDL, crean partículas constituidas por derivados de HDL y dejan el LDL sustancialmente intacto. El plasma deslipidado al menos parcialmente o sustancialmente, que fue separado inicialmente, se trata después apropiadamente para administración a un paciente.

La presente invención se puede emplear para tratar plasma obtenido de un paciente para posterior administración al paciente o para administración a otro paciente. La presente invención también se puede usar para tratar sangre y plasma almacenados en bancos de sangre para crear plasma con contenido reducido en lípidos y conteniendo partículas constituidas por derivados de HDL con contenido reducido en lípidos. Este plasma tratado que contiene partículas constituidas por derivados de HDL con contenido reducido en lípidos se puede usar para administración heteróloga a otro individuo para mejorar el eflujo de colesterol en el paciente. La presente memoria descriptiva también describe crear partículas constituidas por derivados de HDL que se puedan recoger y almacenar.

El presente método in vitro modifica diversas formas de diferentes partículas de HDL. Tales partículas de HDL incluyen las partículas de HDL que se han descrito basándose en una variedad de métodos in vitro tales como métodos in vitro que miden la carga, densidad, tamaño e inmunoafinidad, incluyendo movilidad electroforética, ultracentrifugación, inmunorreactividad y otros métodos conocidos para un experto en la materia. Tales partículas de HDL incluyen lo siguiente: VLDL, α -HDL, pre- β HDL (incluyendo pre- β_1 HDL, pre- β_2 HDL y pre- β_3 HDL), β HDL, HDL₂ (incluyendo HDL_{2a} y HDL_{2b}), HDL₃, VHDL, LpA-I, LpA-II, LpA-I/LpA-II (para una revisión véase Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1.996). De acuerdo con esto, la práctica de los métodos in vitro de la presente invención crea partículas de HDL modificadas. Estas partículas de HDL modificadas se pueden modificar de numerosas formas, incluyendo cambios en una o más de las propiedades metabólicas y o físico-químicas siguientes: masa molecular (kDa); carga; diámetro; forma; densidad, densidad de hidratación; características de flotación, contenido de colesterol; contenido de colesterol libre; contenido de colesterol esterificado; relación molar de colesterol libre a fosfolípidos; inmunoafinidad; contenido, actividad o helicidad de una o más de las siguientes enzimas o proteínas (Apo A-1, Apo A-2, Apo D, Apo E, Apo J, Apo A-IV, proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP, por sus siglas en inglés), lecitina: colesterol aciltransferasa (LCAT, por sus siglas en inglés); capacidad y/o tasa para unión de colesterol, capacidad y/o tasa para transporte de colesterol. Las propiedades físico-químicas de partículas de HDL son conocidas para un experto en la materia. Por ejemplo, se han caracterizado partículas, pre- β HDL, en términos de su carga, masa molecular (que oscila de 40 kDa - 420 kDa), tamaño (radio de Stoke 4 nm -15 nm), forma (elipsoidal, discoidal o esférica) y composición química (proteína (incluyendo Apo A-1), colesterol libre, colesterol esterificado, fosfolípidos y la relación de colesterol libre a fosfolípidos (véase Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1.996 para detalles adicionales)).

La presente invención crea estas partículas de HDL modificadas sin afectar de manera sustancial a diversas propiedades metabólicas y o físico-químicas de partículas de LDL.

Se describe que las partículas derivadas de HDL modificadas preparadas con el método descrito se administran a un paciente para mejorar el eflujo de colesterol de las células. Estas partículas de HDL modificadas se pueden obtener del mismo paciente o un paciente diferente que recibirá las partículas de HDL modificadas. Estas partículas se pueden combinar con plasma tratado con los métodos in vitro de la presente invención y que contienen niveles sustancialmente reducidos de lípido y después se administran a un paciente.

Se describe además una proteína Apo A-1 modificada producida por tratamiento de plasma con el método in vitro de la presente memoria descriptiva, en la que la proteína Apo A-1 modificada presenta un contenido reducido en lípidos. La proteína Apo A-1 modificada se purifica y se puede administrar a un paciente sola o junto con las partículas de HDL modificadas con contenido reducido en lípidos para mejorar el eflujo de colesterol.

Estas partículas de HDL modificadas también se pueden combinar con plasma heterólogo tratado con los métodos in vitro de la presente invención y que contienen niveles sustancialmente reducidos de lípido y después se administran a un paciente. Estas partículas se pueden combinar con otros constituyentes del plasma y opcionalmente con glóbulos rojos antes de la administración al sistema vascular. La administración de estas partículas tiene lugar tan frecuentemente como sea necesario para efectuar eflujo de colesterol de las células.

En la presente memoria se describen partículas de HDL modificadas que se pueden administrar a pacientes para reducir los niveles celulares de colesterol y se indican para una variedad de enfermedades, incluyendo aterosclerosis, arteriosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, obesidad, hipertensión, apoplejía, neuroprotección después de apoplejía, inflamación, enfermedad de Alzheimer, diabetes, niveles de HDL endógeno bajos, niveles de LDL altos, enfermedad cardiovascular (incluyendo aterosclerosis de las arterias coronarias, arterias carótidas, subclavia, braquial, aorta, ilíaca, renal, femoral, poplítea, tibial o cualquier otra arteria en el sistema cardiovascular), enfermedad cerebrovascular (incluyendo aterosclerosis de las arterias carótida interna, cerebral media, cerebral anterior, cerebral posterior, basilar, cerebelar y/o espinal o cualquier rama de estas arterias, arterias del extremo cerebral cortical o cualquier otra arteria que suministre al sistema nervioso central).

Se describen además partículas de HDL modificadas que se pueden administrar a un paciente de acuerdo con cualquier programa que sea eficaz para mejorar el eflujo de colesterol celular. En un ejemplo, un litro de plasma es tratado con los métodos in vitro de la presente invención cada semana y el plasma tratado que contiene las partículas de HDL modificadas se devuelve al paciente cada semana durante cuatro a seis semanas. Alternativamente, las partículas de HDL modificadas se pueden separar del plasma tratado y se administran en un vehículo aceptable.

Se describen además partículas de HDL modificadas que se pueden administrar junto con otros regímenes y

tratamientos para el tratamiento de las enfermedades y afecciones mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las partículas de HDL modificadas descritas en la memoria descriptiva se pueden administrar junto con ejercicio y/o restricción dietética de ingesta de grasa y colesterol.

5 Se describen además partículas de HDL modificadas que se pueden usar junto con la administración de agentes para reducir el colesterol, reduciendo los niveles de LDL y aumentando los niveles de HDL. Estos agentes, tales como inhibidores de la HMG-CoA reductasa, o estatinas, se pueden administrar en dosis y de acuerdo con los programas de administración comúnmente conocidos para un experto en la materia. Las estatinas incluyen cerivastatina, atorvastatina, fluvastatina, simvastatina, pravastatina y lovastatina. Por ejemplo, se emplean comúnmente dosis de 10 mg, 20 mg, 40 mg u 80 mg de estatinas, tomadas una vez al día. Se describe que la
10 administración de las partículas de HDL modificadas puede eliminar la necesidad de tratamiento con estatinas en pacientes o reducir la dosis requerida de estatinas.

En otro aspecto descrito en la presente invención, las partículas de HDL modificadas se pueden usar junto con la administración de agentes diseñados para reducir la absorción de grasa y colesterol. Tales agentes, por ejemplo ezetimibe, y las dosis clínicamente apropiadas son conocidos para un experto en la materia.

15 Se describen en la presente memoria partículas de HDL modificadas que se pueden usar junto con la administración de uno o más agentes tales como derivados de ácido fibríco (gemfibrozil), ácido nicotínico (niacina) y resinas de unión de ácido biliar (colestiramina, colestipol).

20 Se describen en la presente memoria partículas de HDL modificadas que se pueden usar junto con la administración de fármacos antiinflamatorios conocidos para el experto en la materia, tales como aspirina. Los fármacos antiinflamatorios con frecuencia se prescriben a pacientes con enfermedad vascular puesto que se cree que la inflamación es un factor causante de aterosclerosis y otras enfermedades vasculares.

25 Se describen en la presente memoria partículas de HDL modificadas que se pueden usar junto con la administración de agentes tales como estatinas junto con agentes diseñados para reducir la absorción de grasa y colesterol. Esta combinación de tres tratamientos es eficaz para mejorar el flujo de colesterol de las células y permite la administración de dosis más bajas de estatinas. Se describen además partículas de HDL modificadas que se pueden usar junto con cualquiera de las propuestas terapéuticas descritas anteriormente.

30 Estas partículas de HDL modificadas se pueden almacenar antes de su uso. Se pueden preparar a partir del plasma de un paciente y devolverse a ese paciente. Alternativamente, las partículas de HDL modificadas se pueden preparar a partir del plasma obtenido de un primer paciente y administrarlas con posterioridad a un segundo paciente. La presente invención es útil en la creación de muestras de plasma que contienen partículas de HDL modificadas para almacenamiento en un banco de plasma y posterior administración a pacientes.

De acuerdo con esto, el método in vitro de la presente invención proporciona partículas que comprenden partículas de HDL modificadas.

35 Se describe además la provisión de partículas que comprende partículas de HDL modificadas sin afectar sustancialmente a LDL.

Otro objeto más de la presente invención es la provisión de partículas que comprende partículas de HDL modificadas, en la que la partícula presenta un contenido reducido en colesterol.

Se describe además la provisión de partículas que comprende derivados de al menos una forma de HDL con una relación reducida de colesterol libre a fosfolípido.

40 Otro objeto de la presente invención es proporcionar partículas que comprenden partículas de HDL modificadas, en el que las partículas son partículas de pre- β HDL.

45 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un fluido que comprende una distribución de proteínas modificadas en la que el fluido biológico presentaba un primer estado, teniendo el primer estado lipoproteínas de densidad alta alfa y lipoproteínas de densidad alta pre-beta y en la que el fluido biológico presenta un segundo estado, teniendo el segundo estado una concentración aumentada de lipoproteína de densidad alta pre-beta en relación con el primer estado, después de ser expuesto a un disolvente.

De acuerdo con esto, es un objeto de la presente invención proporcionar un método in vitro novedoso para la creación de partículas que comprenda partículas de HDL modificadas.

50 Además se describe la provisión de un método in vitro para la creación de partículas que comprende derivados de al menos una forma de HDL sin afectar sustancialmente a LDL.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método in vitro de modificación de una distribución de proteínas en un fluido en el que la distribución de proteínas presenta un primer estado, teniendo dicho primer estado lipoproteínas de densidad alta alfa y lipoproteínas de densidad alta pre-beta, que comprende las etapas de: exponer

dicho fluido a un disolvente en el que la exposición modifica la distribución de proteínas del primer estado a un segundo estado, teniendo dicho segundo estado una concentración aumentada de lipoproteína de densidad alta pre-beta en relación a dicho primer estado y retirar dicho disolvente del fluido.

5 Es otro objeto más de la presente invención proporcionar un fluido capaz de mejorar una ruta de ABCA1 de un paciente en el que el fluido se prepara por modificación de un fluido que tiene una primera concentración de lipoproteínas de densidad alta pre-beta en relación a proteína total, en el que la modificación aumenta la concentración de lipoproteína de densidad alta pre-beta en relación a proteína total.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método in vitro para obtener un fluido capaz de mejorar una ruta de ABCA1 de un paciente con una primera distribución de proteínas, teniendo la primera distribución de proteínas una concentración de lipoproteínas de densidad alta pre-beta en relación a proteína total, que comprende la etapa de modificar un fluido que contiene la primera distribución de proteínas por exposición del fluido a un agente de eliminación de lípidos, en el que la modificación aumenta la concentración de lipoproteína de densidad alta pre-beta en relación a proteína total e introduciendo el fluido en el paciente.

15 En la presente memoria se describe un método in vitro para tratar enfermedades asociadas a acumulación de lípidos por administración a un paciente de una composición que comprende partículas que pueden ser derivados de al menos una forma de HDL.

20 En la presente memoria se describe un método in vitro para tratar enfermedades asociadas a acumulación de lípidos por administración a un paciente de una composición que comprende partículas que pueden ser derivadas de al menos una forma de HDL junto con administración terapéutica de una estatina, un inhibidor de absorción de colesterol o lípidos, niacina, derivados de ácido fibrico, resinas de unión de ácido biliar o una combinación de los mismos.

En la presente memoria se describe un método in vitro para mejorar el eflujo de colesterol celular en un paciente que comprende la administración de una composición que comprende partículas que pueden ser derivados de al menos una forma de HDL.

25 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un nuevo método in vitro para tratar aterosclerosis por administración a un paciente de un fluido obtenido por dicho método in vitro que comprende partículas que son derivados de al menos una forma de HDL.

Se describe además un estuche útil para tratar un fluido biológico para reducir colesterol y lípido y crear partículas comprendiendo derivados de al menos una forma de HDL.

30 Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de las realizaciones y reivindicaciones descritas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo que delinea las etapas de la extracción de LDL y posterior creación de partículas de HDL modificadas.

35 La Figura 2 es un diagrama de flujo que delinea las etapas de la creación selectiva de partículas de HDL modificadas.

40 La Figura 3 es un esquema de un perfil de FPLC de una muestra de plasma de una mezcla de plasma normal. El colesterol total (CT) se representa con una línea continua; fosfolípido (FL) es la línea discontinua; apolipoproteína A1 (Apo A-1) es la línea discontinua con un símbolo y apolipoproteína B (Apo B) se representa por la línea con un triángulo. Se muestran las cantidades de estos compuestos (mg/dl) en cada fracción de FPLC.

45 La Figura 4 es un esquema de un perfil de FPLC de una alícuota de la mezcla de plasma normal que se sometió a un disolvente de 100% de diisopropil éter (DIPE) para eliminar lípido de HDL. El colesterol total (CT) en la muestra normal de la Figura 3 se representa aquí como una línea discontinua con triángulos. El CT en el plasma normal sometido a DIPE se muestra como una línea continua. Apo A-1 en la muestra normal de la Figura 3 se representa aquí como una línea continua con símbolos cuadrados. Apo A-1 en el plasma normal sometido a DIPE se muestra como una línea discontinua con un símbolo de punto.

50 La Figura 5 es un esquema de un perfil de FPLC de una alícuota de la mezcla de plasma normal que se sometió a un disolvente de 100% de DIPE para eliminar lípido de HDL. Apo A-1 en la muestra de plasma normal de la Figura 3 se representa aquí como una línea continua con símbolos cuadrados. Apo A-1 en la muestra de plasma normal sometida a DIPE se muestra como una línea discontinua con un símbolo de punto. Fosfolípido (FL) en la muestra de plasma normal de la Figura 3 se representa aquí con una línea discontinua. FL en el plasma normal sometido a DIPE se muestra como una línea continua.

La Figura 6 es un esquema de un perfil de FPLC de una alícuota de la mezcla de plasma normal que se sometió a

un disolvente de DIPE al 100% para eliminar lípido de HDL. Apo B en la muestra de plasma normal se representa por la línea con un símbolo de punto. Apo B en el plasma normal sometido a DIPE se muestra como línea discontinua con triángulos. Fosfolípido (FL) en la muestra normal de la Figura 3 se representa con la línea continua. FL en el plasma normal sometido a DIPE se muestra como una línea discontinua.

5 La Figura 7 es un esquema de un perfil de FPLC de una alícuota de la mezcla de plasma normal que se sometió a una relación de disolvente de sevoflurano a n-butanol 95:5. El colesterol total (CT) en la muestra de plasma normal de la Figura 3 se representa aquí como una línea discontinua. El CT en el plasma normal sometido a sevoflurano:n-butanol se muestra como una línea continua. Apo A-1 en la muestra de plasma normal de la Figura 3 se representa como una línea continua con símbolos cuadrados. Apo A-1 en el plasma normal sometido a sevoflurano:n-butanol se muestra como una línea discontinua con un símbolo de punto.

10 La Figura 8 es un esquema de un perfil de FPLC de una alícuota de la mezcla de plasma normal que se sometió a una relación de disolvente de sevoflurano a n-butanol 95:5. Apo A-1 en la muestra normal de la Figura 3 se representa como una línea continua con símbolos cuadrados. Apo A-1 en el plasma normal sometido a sevoflurano:n-butanol se muestra como una línea discontinua con un símbolo de punto. Fosfolípido (FL) en la muestra normal de la Figura 3 se representa aquí con la línea discontinua. FL en el plasma normal sometido a sevoflurano:n-butanol se muestra como una línea continua.

15 La Figura 9 es un esquema de un perfil de FPLC de una alícuota de la mezcla de plasma normal que se sometió a una relación de disolvente de sevoflurano a n-butanol 95:5. Apo B en la muestra normal de la Figura 3 se representa por la línea con un símbolo de punto. Apo B en el plasma normal sometido a sevoflurano:n-butanol se muestra como línea discontinua con triángulos. Fosfolípido (FL) en la muestra normal de la Figura 3 se representa aquí con la línea continua. FL en el plasma normal sometido a sevoflurano:n-butanol se muestra como una línea discontinua.

20 La Figura 10 es una representación esquemática del efecto del tratamiento de una muestra de plasma con DIPE o sevoflurano:butanol sobre alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina-T, sodio, potasio, fósforo, albúmina, globulina y la relación albúmina/globulina (A/G) fueron analizados en plasma no tratado normal y en plasma tratado con DIPE o con sevoflurano: n-butanol.

25 La Figura 11 es una representación esquemática de un perfil de FPLC de Superose de una muestra de plasma normal que actúa como control para comparación de los tratamientos en las Figuras 12-15. El colesterol total (CT) en la muestra de plasma normal se representa aquí como una línea continua. Fosfolípido (FL) se representa con la línea continua con círculos. Apo B se representa por la línea con cuadrados en blanco. Apo A-1 se representa como una línea continua con símbolos de triángulo en blanco. Apo A-2 se muestra como una línea discontinua con un símbolo de estrella.

30 La Figura 12 es una representación esquemática de un perfil de FPLC de Superose del efecto del tratamiento de una alícuota de muestra de plasma de control (Fig. 11) con DIPE (100%). El colesterol total (CT) se representa aquí como una línea continua. Fosfolípido (FL) se representa con la línea continua con círculos sólidos. Apo B se representa por la línea con cuadrados sólidos. Apo A-1 se representa como una línea sólida con símbolos de triángulos cerrados. Apo A-2 se muestra como una línea discontinua con un símbolo de estrella en un cuadrado sólido.

35 La Figura 13 es una representación esquemática de un perfil de FPLC de Superose del efecto del tratamiento de una alícuota de muestra de plasma de control (Fig. 11) con una relación de disolvente de sevoflurano a n-butanol 95:5. El colesterol total (CT) se representa aquí como una línea continua. Fosfolípido (FL) se representa con la línea continua con círculos sólidos. Apo B se representa por la línea con cuadrados sólidos. Apo A-1 se representa como una línea sólida con símbolos de triángulos cerrados. Apo A-2 se muestra como una línea discontinua con un símbolo de estrella en un cuadrado sólido.

40 La Figura 14 es una representación esquemática de un perfil de FPLC de Superose del efecto del tratamiento de una alícuota de muestra de plasma de control (Fig. 11) con una relación de disolvente de DIPE a n-butanol 75:25. El colesterol total (CT) se representa aquí como una línea continua. Fosfolípido (FL) se representa con la línea continua con círculos sólidos. Apo B se representa por la línea con cuadrados sólidos. Apo A-1 se representa como una línea sólida con símbolos de triángulos cerrados. Apo A-2 se muestra como una línea discontinua con un símbolo de estrella en un cuadrado sólido.

45 La Figura 15 es una representación esquemática de un perfil de FPLC de Superose del efecto del tratamiento de una alícuota de muestra de plasma de control (Fig. 11) con una relación de disolvente de DIPE a n-butanol 95:5. El colesterol total (CT) se representa aquí como una línea continua. Fosfolípido (FL) se representa con la línea continua con círculos sólidos. Apo B se representa por la línea con cuadrados sólidos. Apo A-1 se representa como una línea sólida con símbolos de triángulos cerrados. Apo A-2 se muestra como una línea discontinua con un símbolo de estrella en un cuadrado sólido.

50 La Figura 16 demuestra los efectos de diversos tratamientos con disolvente de plasma sobre la capacidad del plasma tratado para estimular el eflujo de colesterol en la ruta metabólica ABCA1 y la ruta metabólica SRB1 como se

representa en las estirpes celulares COS+ y FU5AH cuando se compara como muestras no tratadas o simulado tratadas.

5 La Figura 17 es una representación de subespecies de HDL que contienen Apo A-1 determinado por PAGE natural al 3-16%, análisis de inmunotransferencia e imagen de una muestra de plasma lipémico normal (panel izquierdo) y una alícuota de este plasma tratado con sevoflurano:n-butanol (95:5) (panel derecho). El panel izquierdo representa una distribución de proteínas de diversas especies de HDL con una distribución que comprende principalmente HDL alfa y el panel derecho representa una distribución de proteínas de HDL modificado con una distribución que comprende principalmente pre-β HDL.

10 La Figura 18 es una representación de subespecies de HDL que contienen Apo A-1 determinado por PAGE natural al 3-16%, análisis de inmunotransferencia e imagen de una muestra de plasma lipémico normal (panel izquierdo) y una alícuota de este plasma tratado con DIPE:n-butanol (95:5) (panel derecho). El panel izquierdo representa una distribución de proteína de diversas especies de HDL con una distribución que comprende principalmente HDL alfa y el panel derecho representa una distribución de proteína de HDL modificado con una distribución que comprende principalmente pre-β HDL.

15 La Figura 19 es una representación esquemática de una pluralidad de componentes usados en la presente invención para conseguir los procedimientos de deslipidación novedosos descritos en la presente memoria.

La Figura 20 es una realización de una configuración de una pluralidad de componentes usados en la presente invención para conseguir los procedimientos de deslipidación novedosos descritos en la presente memoria.

20 La Figura 21 es otra realización de una configuración de una pluralidad de componentes usados en la presente invención para conseguir los procedimientos de deslipidación novedosos descritos en la presente memoria.

Descripción detallada de la invención

25 En la presente memoria se describen sistemas, aparatos y métodos in vitro útiles para retirar lípido de partículas de HDL derivadas principalmente de plasma de pacientes creando de ese modo partículas de HDL modificadas con contenido reducido en lípidos, en particular contenido reducido en colesterol. Los métodos in vitro descritos crean estas partículas de HDL modificadas con contenido reducido en lípidos sin modificar sustancialmente las partículas de LDL.

30 La presente invención proporciona además un fluido que comprende una distribución de proteínas modificadas en la que el fluido biológico presentaba un primer estado, teniendo el primer estado lipoproteínas de densidad alta alfa y lipoproteínas de densidad alta pre-beta y en la que el fluido biológico presenta un segundo estado, teniendo el segundo estado una concentración aumentada de lipoproteína de densidad alta pre-beta en relación con el primer estado, después de ser expuesto a un disolvente. La presente invención proporciona un fluido capaz de mejorar una ruta de ABCA1 de un paciente en la que el fluido se prepara por modificación de un fluido que tiene una primera concentración de lipoproteínas de densidad alta pre-beta en relación con proteína total, en el que la modificación aumenta la concentración de lipoproteína de densidad alta pre-beta en relación a proteína total.

35 La presente invención proporciona un método in vitro para formar partículas modificadas que se pueden administrar a pacientes para mejorar el eflujo de colesterol celular y tratar enfermedades, en particular arteriosclerosis, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y otras asociadas a lípidos.

Definiciones

40 El término "fluido" se define como fluidos de animales o seres humanos que contienen lípidos o partículas que contienen lípidos, fluidos de cultivo de tejidos y células que contienen lípidos y fluidos mezclados con células que contienen lípidos. Para los fines de esta invención, disminuir la cantidad de lípidos en los fluidos incluye disminuir los lípidos en plasma y partículas contenidas en el plasma, incluyendo partículas de HDL. Los fluidos incluyen: fluidos biológicos; tales como sangre, plasma, suero, fluido linfático, fluido cerebroespinal, fluido peritoneal, fluido pléurico, fluido pericárdico, diversos fluidos del sistema reproductor incluyendo semen, fluidos de eyaculación, fluido folicular y fluido amniótico; reactivos de cultivo de células tales como sueros normales, suero fetal bovino o suero derivado de cualquier animal o ser humano y reactivos inmunológicos, tales como diversas preparaciones de anticuerpos y citocinas de cultivo de tejidos y células, fluidos mezclados con células que contienen lípidos y fluidos que contienen organismos que contienen lípidos, tales como organismos que contienen lípidos que contienen disolución salina. Un fluido preferido tratado con los métodos in vitro de la presente invención es el plasma.

50 El término "lípido" se define como uno o más cualesquiera de un grupo de grasas o sustancias similares a grasas que se encuentran en los seres humanos o los animales. Las grasas o sustancias similares a grasas se caracterizan por su insolubilidad en agua y solubilidad en disolventes orgánicos. El término "lípido" es conocido para los expertos en la materia e incluye lípido complejo, lípido simple, triglicéridos, ácidos grasos, glicerofosfolípidos (fosfolípidos), grasas verdaderas tales como ésteres de ácidos grasos, glicerol, cerebrósidos, ceras y esteroides tales como colesterol y ergosterol.

55

El término “disolvente de extracción” se define como uno o más disolventes usados para extraer lípidos de un fluido o de partículas dentro del fluido. Este disolvente entra en el fluido y permanece en el fluido hasta que es retirado por otros subsistemas. Los disolventes de extracción adecuados incluyen disolventes que extraen o disuelven lípidos, incluyendo fenoles, hidrocarburos, aminas, éteres, ésteres, alcoholes, halohidrocarburos, halocarburos y combinaciones de los mismos. Los disolventes de extracción preferidos son éteres, ésteres, alcoholes, halohidrocarburos o halocarburos que incluyen diisopropil éter (DIPE), que se refiere también como isopropil éter, dietil éter (DEE), que también se refiere como etil éter, alcoholes de orden inferior tales como butanol, especialmente n-butanol, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, isoflurano, sevoflurano (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(fluorometoxi) propano-d3), perfluorociclohexanos, trifluoroetano, cicloflurohexanol y combinaciones de los mismos.

El término “paciente” se refiere a animales y seres humanos, que pueden ser una fuente de fluidos que se tienen que tratar con los métodos in vitro de la presente invención o un receptor de derivados de partículas de HDL y o plasma con contenido reducido en lípidos.

El término “partículas de HDL” incluye diversos tipos de partículas definidos basados en una variedad de métodos tales como aquéllos que miden carga, densidad, tamaño e inmunoafinidad, incluyendo movilidad electroforética, ultracentrifugación, inmunoreactividad y otros métodos conocidos para un experto en la materia. Dichas partículas de HDL incluyen lo siguiente: VLDL, α HDL, pre- β HDL (incluyendo pre- β_1 HDL, pre- β_2 HDL y pre- β_3 HDL), β HDL, HDL₂ (incluyendo HDL_{2a} y HDL_{2b}) HDL₃, VHDL, LpA-I, LpA-II, LpA-I/LpA-II (para una revisión véase Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1.996). De acuerdo con esto, la práctica de los métodos in vitro de la presente invención crea partículas de HDL modificadas. Estos derivados modificados de partículas de HDL se pueden modificar de numerosas maneras incluyendo cambios en una o más de las siguientes propiedades metabólicas y o físico-químicas (para una revisión véase Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1.996): masa molecular (kDa); carga; diámetro; forma; densidad, densidad de hidratación, características de flotación; contenido de colesterol; contenido de colesterol libre; contenido de colesterol esterificado; relación molar de colesterol libre a fosfolípidos; inmunoafinidad; contenido, actividad o helicidad de una o más de las siguientes enzimas o proteínas (Apo A-1, Apo A-2, Apo D, Apo E, Apo J, Apo A-IV, proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP), lecitina: colesterol aciltransferasa (LCAT); capacidad y/o tasa de unión de colesterol, capacidad y/o tasa para transporte de colesterol.

Métodos in vitro

Los métodos descritos en la presente memoria pueden emplear técnicas para crear partículas de HDL con contenido reducido en lípidos. Estas partículas de HDL se obtienen de fluidos tales como plasma. El primer método comprende la eliminación de LDL de plasma antes de tratar el plasma para disminuir los lípidos y crear partículas de HDL con contenido reducido en lípidos. El segundo método no elimina LDL de plasma antes de la exposición a disolventes pero emplea diversos sistemas de disolventes para permitir la eliminación selectiva de lípidos de partículas de HDL sin afectar de manera sustancial a LDL. Las diversas etapas implicadas en los dos métodos se describen en general a continuación. A continuación de estas descripciones generales están descripciones de diversas realizaciones de los métodos descritos en la presente invención, incluyendo variantes tales como disolventes empleados, métodos de mezcla, tiempos de mezcla y opcionalmente temperatura.

La presente invención proporciona además un método de modificación de una distribución de proteínas en un fluido, en el que la distribución de proteínas presenta un primer estado, teniendo dicho primer estado lipoproteínas de densidad alta alfa y lipoproteínas de densidad alta pre-beta, que comprende las etapas de: exponer dicho fluido a un disolvente en el que la exposición modifica la distribución de proteínas del primer estado a un segundo estado, teniendo dicho segundo estado una concentración aumentada de lipoproteína de densidad alta pre-beta en relación a dicho primer estado y retirar dicho disolvente del fluido.

La presente invención también proporciona un método para mejorar una ruta de ABCA1 de un paciente con una primera distribución de proteínas, teniendo dicha primera distribución de proteínas una concentración de lipoproteínas de densidad alta pre-beta en relación con proteína total, que comprende la etapa de modificación de un fluido que contiene la primera distribución de proteínas por exposición del fluido a un disolvente, en el que la modificación aumenta la concentración de lipoproteína de densidad alta pre-beta en relación a proteína total e introducción del fluido en el paciente.

Como se discutió anteriormente, los métodos de la presente invención pueden estar constituidos por numerosas configuraciones. A continuación se explican numerosos componentes que se pueden combinar para crear numerosas realizaciones que pueden conseguir los objetivos y ventajas descritos anteriormente.

Cada realización es una de muchas posibles configuraciones que se pueden usar para cumplir los objetivos descritos anteriormente.

Extracción de LDL y eliminación de lípidos de partículas de HDL.

La Figura 1 ilustra que las partículas de HDL y LDL se separan previamente a tratamiento. La Figura 1 es un diagrama de flujo del procedimiento para extracción de LDL y eliminación de lípidos de partículas de HDL.

En la etapa 100 del procedimiento para extracción de LDL y eliminación de lípidos de partículas de HDL, el plasma se separa de la sangre. En una realización preferida, esto se consigue por filtración. En otra realización preferida, los componentes del plasma y la sangre se separan vía centrifugación. La sangre se puede combinar opcionalmente con un anticoagulante, tal como citrato de sodio y centrifugar a fuerzas aproximadamente iguales a 2.000 veces la gravedad. Los glóbulos rojos son aspirados después del plasma. En la etapa 102, las células se devuelven al paciente. En esta realización, el LDL se separa del plasma en la etapa 104. Esto se consigue por el uso de una columna de afinidad, ultracentrifugación o cualquier otro método conocido por un experto en la materia. Un método ejemplar es el uso de ultracentrifugación, en el que se hace pasar plasma por el separador de ultracentrífuga, analizándose de ese modo las partículas de LDL y HDL. El separador de ultracentrífuga usa ultracentrifugación de gradiente de densidad - un procedimiento sofisticado y muy preciso que separa porciones más ligeras de lipoproteína de porciones más pesadas por la fuerza centrífuga. Se desecha el LDL en la etapa 106.

En la etapa 108, se añaden disolventes al plasma que aún contiene HDL para eliminar lípidos. Los tipos de disolvente, relaciones y concentraciones pueden variar. El plasma y el disolvente se introducen en al menos un aparato para mezcla, agitación, puesta en contacto de otro modo del plasma con el disolvente. El plasma se puede transportar usando un procedimiento continuo o discontinuo. Además pueden incluirse diversos medios sensibles para controlar presiones, temperaturas, caudales y niveles de disolvente (discutido con más detalle a continuación).

En la etapa 110, se introduce energía al sistema. Las diversas formas de energía empleadas implican métodos de mezcla, tiempo y velocidad (variantes de las que se discute con más detalle a continuación). Se emplea centrifugación en la etapa 112 para eliminar el disolvente volumétrico residual. El disolvente soluble restante se elimina en la etapa 114. Esto se consigue por absorción sobre carbón vegetal, evaporación o pervaporación de HFC, como se discute a continuación. En la etapa opcional 116, se ensaya la mezcla para disolvente residual vía cromatografía de gases (GC) o cualquier otro medio similar. Opcionalmente, esta etapa se elimina con validación estadística. En la etapa 118, el plasma con contenido reducido en lípido se devuelve al paciente. Este plasma con niveles de lípido al menos parcialmente o sustancialmente reducidos, que se separó inicialmente, se trata después apropiadamente y con posterioridad se vuelve a introducir en el cuerpo.

Eliminación selectiva de lípido de HDL y formación de partículas de HDL modificadas.

La Figura 2 presenta un diagrama de flujo que delinea las etapas de la otra realización preferida. En la etapa 200, se separa plasma de la sangre por filtración, centrifugación o cualquier otro medio conocido para un experto en la materia. En una realización preferida, se hace pasar la sangre a través de un separador de centrífuga, que separa la sangre en células sanguíneas y plasma. En la etapa 202, se devuelven las células al paciente. Se añaden disolventes al plasma separado en la etapa 204 para extraer lípidos. El sistema de disolventes se diseña óptimamente de manera que sólo se tratan las partículas de HDL para reducir sus niveles de lípidos y LDL permanece al menos sustancialmente intacto. El sistema de disolventes incluye factorizar en variables tales como disolvente empleado, método de mezcla, tiempo y temperatura. El tipo de disolvente, las relaciones y concentraciones pueden variar en esta etapa. El plasma y el disolvente son introducidos en al menos un aparato para mezcla, agitación o puesta en contacto de otro modo del plasma con el disolvente. El plasma puede ser transportado usando un procedimiento continuo o discontinuo. Además pueden incluirse diversos medios sensibles para controlar presiones, temperaturas, caudales y niveles de disolvente (discutido con más detalle a continuación).

En la etapa 206, se introduce energía en el sistema en la forma de variados métodos de mezcla, tiempo y velocidad. Se retiran los disolventes volumétricos en la etapa 208 por centrifugación. En la etapa 210 se elimina el disolvente soluble restante por adsorción sobre carbón vegetal, evaporación o pervaporación de HFC. En la etapa 212, la mezcla se ensaya opcionalmente para disolvente residual por uso de GC o medio similar. El ensayo para disolvente residual se puede eliminar opcionalmente basándose en validación estadística. En la etapa 214, el plasma tratado (preferiblemente conteniendo partículas de HDL modificadas con contenido reducido en lípidos), que se separó inicialmente, se trata de manera apropiada y con posterioridad se devuelve al paciente.

Un experto en la materia apreciaría que aunque los procedimientos mostrados en las Figuras 1 y 2 representan sólo las etapas principales de los procedimientos y se refieren a los elementos principales de los sistemas, pueden contener opcionalmente otros elementos tales como una bomba de sangre para mantener el volumen de sangre apropiado, un medidor de la presión sanguínea, un dispositivo de inyección de agente anticoagulante de la sangre, una cámara de goteo para eliminación de burbujas de aire en la sangre y un calentador o refrigerador para mantener una temperatura apropiada para la sangre mientras se encuentra fuera del cuerpo.

Variables que se tienen que considerar en el empleo de los métodos in vitro de la presente invención.

La presente invención emplea uno de muchos sistemas de disolventes óptimamente configurados diseñados para eliminar lípidos de partículas de HDL al tiempo que no se afecte de manera sustancial a LDL. En la primera realización, se retira LDL del plasma antes de tratar el plasma con disolvente o disolventes para crear partículas de HDL con contenido reducido en lípidos al tiempo que se retiene la composición de las proteínas del plasma. En la segunda realización, se tiene que tener cuidado en retirar de manera selectiva lípidos de partículas de HDL sin afectar sustancialmente a partículas de LDL. Estas variables incluyen elección de disolvente, métodos de mezcla, tiempo y temperatura.

Procedimientos de separación de plasma

Los procedimientos de separación de plasma típicos son conocidos para los expertos en la materia e incluyen preferiblemente filtración, centrifugación y aspiración.

Extracción de LDL.

- 5 Los métodos in vitro de extracción de LDL son conocidos para los expertos en la materia. Dos métodos preferidos son uso de una columna de afinidad y ultracentrifugación. El separador de ultracentrífuga usa ultracentrifugación de gradiente de densidad - un procedimiento sofisticado y muy preciso que separa porciones más ligeras de lipoproteína de porciones más pesadas por fuerza centrífuga.

Disolventes empleados en el procedimiento de eliminación de lípidos.

- 10 Se pueden usar numerosos disolventes orgánicos en el método in vitro de esta invención para eliminación de lípido de fluidos y partículas de HDL, siempre que los disolventes sean eficaces en las solubilización de lípidos. Los disolventes adecuados comprenden mezclas de hidrocarburos aromáticos, alifáticos o alicíclicos, éteres, fenoles, ésteres, alcoholes, halohidrocarburos y halocarburos. Los disolventes preferidos son éteres, por ejemplo diisopropil éter (DIPE). Se pueden usar éteres asimétricos y éteres halogenados. Son particularmente preferidos, como al
- 15 menos un componente, los éteres que contienen C₄-C₈, incluyendo dietil éter y propil éteres, incluyendo DIPE. También se describen en la presente memoria combinaciones de éteres tales como DIPE y dietil éter. También se describen en la presente memoria combinaciones de éteres y alcoholes, tales como DIPE y butanol. También se prefieren en la presente invención combinaciones de fluoroéteres y alcoholes, tales como sevoflurano y butanol, en particular sevoflurano y n-butanol.
- 20 Los hidrocarburos en su forma líquida disuelven compuestos de baja polaridad tales como los lípidos en fluidos. De acuerdo con esto, los hidrocarburos comprenden cualquier hidrocarburo sustancialmente inmiscible en agua, que sea líquido a aproximadamente 37°C. Los hidrocarburos adecuados incluyen lo siguiente: hidrocarburos alifáticos C₅ a C₂₀ tales como éter de petróleo, hexano, heptano y octano; hidrocarburos haloalifáticos tales como cloroformo, 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano, 1,1,1-tricloroetano, tricloroetileno, tetracloroetileno diclorometano y tetracloruro de
- 25 carbono; hidrocarburos tioalifáticos, perfluorocarbonos, tales como perfluorociclohexano, perfluorometilciclohexano y perfluorodimetilciclohexano; fluoroéteres tales como sevoflurano; cada uno de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado; hidrocarburos aromáticos tales como benceno; alquilarenos tales como tolueno, haloarenos, haloalquilarenos y tioarenos. Otros disolventes adecuados también pueden incluir: compuestos heterocíclicos saturados o insaturados tales como derivados insolubles en agua de piridina y derivados alifáticos, tioderivados o haloderivados de los mismos y bromuro de perfluorooctilo. Otro disolvente adecuado es perfluorodecalina.
- 30

Los ésteres adecuados que se pueden usar incluyen: acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de butilo y propionato de etilo. Cetonas ejemplares adecuadas que se pueden usar incluyen metil etil cetona.

- 35 Tensioactivos adecuados que se pueden usar, incluyen lo siguiente: sulfatos, sulfonatos, fosfatos (incluyendo fosfolípidos), carboxilatos y sulfosuccinatos. Algunos materiales anfifílicos aniónicos útiles con la presente invención incluyen lo siguiente: dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés), decilsulfato de sodio, sulfosuccinato de bis-(2-etil-hexil) sodio (AOT), sulfato de colesterol y laurato de sodio.

- 40 Los alcoholes que son preferidos para uso en la presente invención, cuando se usan solos, incluyen los alcoholes que no son apreciablemente miscibles con plasma u otros fluidos biológicos. Cuando se usan alcoholes junto con otro disolvente, por ejemplo, éter, un hidrocarburo, una amina o una combinación de los mismos, se pueden usar alcoholes que contienen C₁-C₈. Alcoholes preferidos para uso junto con otro disolvente incluyen alcoholes inferiores tales como alcoholes que contienen C₄-C₈. De acuerdo con esto, los alcoholes preferidos que se encuentran dentro del alcance de la presente invención son preferiblemente: butanoles, pentanoles, hexanoles, heptanoles y octanoles, e isoformas de los mismos. Son preferidos en particular los butanoles (1-butanol y 2-butanol), también referidos como n-butanol. Como se indicó anteriormente, el alcohol más preferido es el alcohol C₄, butanol. La elección específica del alcohol dependerá del segundo disolvente empleado. Se describen en la presente memoria alcoholes inferiores combinados con éteres inferiores.
- 45

- Los éteres, o junto con otros disolventes, preferiblemente alcoholes, son otro disolvente preferido para uso en el método de la presente invención. Se prefieren en particular los éteres C₄-C₈, incluyendo etil éter, dietil éter y propil éteres, incluyendo di-isopropil éter (DIPE). También son útiles en la presente invención combinaciones de éteres, tales como di-isopropil éter y dietil éter. Cuando se usan éteres y alcoholes junto con un primer disolvente para eliminar lípido, se puede usar cualquier combinación de alcohol y éter siempre que la combinación sea eficaz para eliminar parcialmente o completamente lípido. Cuando se combinan los alcoholes y el éter como un disolvente para eliminar lípido de un fluido, son relaciones aceptables de alcohol a éter en este disolvente aproximadamente 0,01 partes a 99,99 partes de alcohol a aproximadamente 99,99 partes a 0,01 partes de éter, incluyendo una relación de aproximadamente 1 parte a 25 partes de alcohol con aproximadamente 75 partes a 99 partes de éter, una relación de aproximadamente 3 partes a 10 partes de alcohol con aproximadamente 90 partes a 97 partes de éter y una
- 50
- 55

relación preferida de 5 partes de alcohol con 95 partes de éter. Una combinación especialmente preferida de alcohol y éter es la combinación de butanol y di-isopropil éter.

5 En resumen, los disolventes preferidos en particular incluyen una combinación de 95 partes de sevoflurano por 5 partes de n-butanol. Los intervalos aceptables de sevoflurano y n-butanol también incluyen aproximadamente 0,01 partes a 99,99 partes de sevoflurano por aproximadamente 99,99 partes a 0,01 partes de n-butanol, 0,1 partes a 99,9 partes de sevoflurano por aproximadamente 99,9 partes a 0,1 partes de n-butanol; 1,0 parte a 99,0 partes de sevoflurano por aproximadamente 99,0 partes a 1,0 partes de n-butanol, 10,0 partes a 90,0 partes de sevoflurano por aproximadamente 90,0 partes a 10,0 partes de n-butanol, 15,0 partes a 85,0 partes de sevoflurano por aproximadamente 85,0 partes a 15,0 partes de n-butanol. Las combinaciones preferidas incluyen aproximadamente 95 partes de sevoflurano por aproximadamente 5,0 partes de n-butanol, aproximadamente 90 partes de sevoflurano por aproximadamente 10 partes de n-butanol, aproximadamente 85 partes de sevoflurano por aproximadamente 15 partes de n-butanol, y, más en particular, 97,5 partes de sevoflurano por 2,5 partes de n-butanol.

15 Las relaciones aceptables de disolvente a plasma incluyen cualquier combinación de disolvente y plasma. Las relaciones más preferidas son 2 partes de plasma a 1 parte de disolvente, 1 parte de plasma a 1 parte de disolvente y 1 parte de plasma a 2 partes de disolvente. Por ejemplo, cuando se usa un disolvente que comprende 95 partes de sevoflurano a 5 partes de n-butanol, se prefiere usar dos partes de disolvente por una parte de plasma.

20 Adicionalmente, cuando se emplea un disolvente que contiene n-butanol, la presente invención también puede usar una relación de disolvente a plasma que proporcione al menos 3% de n-butanol en la mezcla de disolvente/plasma final. Una concentración final particularmente preferida de n-butanol en la mezcla de disolvente/plasma final es 3,33%.

Procedimientos para retirar lípidos de fluidos y partículas de HDL.

25 Los procedimientos empleados en los métodos in vitro de la presente invención se refieren directamente a entrada de energía. El procedimiento empleado se debe diseñar de manera que las partículas de HDL se traten para reducir sus niveles de lípidos sin destrucción de proteínas del plasma o afectando sustancialmente a partículas de LDL. Obsérvese que los métodos in vitro descritos a continuación se pueden usar para conseguir las etapas de ambas de las realizaciones preferidas de la presente invención como se describió anteriormente.

Métodos de mezcla

30 El plasma y el disolvente se someten a al menos un método de mezcla para mezcla, agitación o puesta en contacto de otro modo del fluido biológico con el disolvente. El método de mezclamiento empleado en la presente invención puede ser uno de un mezclador estático en línea, un matraz de rotación, un agitador vorticial, una centrífuga, un matraz sometido a ultrasonidos, un tubo de alta cizalla, un homogeneizadora, un mezclador, un contactor de fibra hueca, una bomba centrífuga, una tabla agitadora, un procedimiento de distribución, un procedimiento de agitación, una rotación de una forma continua de un contenedor sellado u otros dispositivos adecuados o cualquier combinación de estos dispositivos o procedimientos.

35 Duración de mezclamiento

40 La cantidad de tiempo requerida para mezclamiento adecuado del disolvente con el fluido se relaciona con el método de mezclamiento empleado. Se mezclan fluidos durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el contacto íntimo entre las fases orgánica y acuosa y para que el disolvente solubilice al menos parcialmente o completamente el lípido. Otra consideración es la temperatura. El equilibrio entre el tiempo de mezcla y la temperatura se debe diseñar de manera que no se fomente la contaminación de o el deterioro de la muestra de sangre. El sistema tiempo y temperatura se equilibra de manera ideal de manera que la muestra de sangre sea aún viable y no se deteriore.

45 Típicamente, el mezclamiento tendrá lugar durante un periodo de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 24 horas, posiblemente aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 horas, posiblemente aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 minutos o posiblemente aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 hora, dependiendo del método de mezclamiento empleado. Ejemplos de duraciones de mezclamiento asociadas a diferentes métodos incluyen: 1) agitación cuidadosa y rotación de una manera continua durante un periodo de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 24 horas, 2) agitación vigorosa y agitación vorticial durante un periodo de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 30 minutos 3) remover durante un periodo de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 horas o 4) homogeneización durante un periodo de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 minutos.

Temperatura

55 Como se describió anteriormente, la temperatura es también una consideración importante. La temperatura se ajusta normalmente a menos de 37°C a fin de que no se desnaturalice el plasma. Opcionalmente, también se pueden emplear temperaturas más frías. Hay diversos métodos para conseguir la regulación de la temperatura en este sistema.

Métodos de extracción de disolvente

Eliminación de disolvente volumétrico residual

En una realización de la presente invención, el disolvente volumétrico residual se elimina por centrifugación.

Eliminación de disolvente soluble restante.

- 5 Otro método para separar disolvente es a través del uso de carbón vegetal, preferiblemente carbón activado. Este carbón vegetal está contenido opcionalmente en una columna. Alternativamente, el carbón vegetal puede estar en forma de suspensión. Se pueden usar diversas formas biocompatibles de carbón vegetal en estas columnas.

Pervaporación HFC

- 10 Los contactores de fibra hueca (los HFC, por sus siglas en inglés) pueden reducir con éxito las concentraciones totales de disolventes, tales como diisopropil éter y dietil éter, en agua y plasma, usando diferentes HFC, presiones y caudales. Los HFC pueden presentar una superficie total de membrana permeable formada por las fibras huecas entre aproximadamente 4.200 centímetros cuadrados y aproximadamente 18.000 centímetros cuadrados, dependiendo del tipo de HFC usado. Además, el caudal de gas se varió en estos experimentos desde entre aproximadamente 2 litros por minuto a aproximadamente 10 litros por minuto y se varió el caudal de plasma desde entre aproximadamente 10 ml por minuto y aproximadamente 60 ml por minuto. La operación de esta manera puede reducir las concentraciones iniciales de disolventes de entre aproximadamente 28.000 partes por millón (ppm) y 9.000 ppm a entre aproximadamente 1.327 ppm y aproximadamente 0,99 ppm dentro de entre aproximadamente 14 minutos y 30 minutos.

- 20 En una realización del sistema de eliminación de disolvente, el plasma tratado con disolvente conteniendo disolvente soluble residual se introduce primero típicamente en un bucle de circulación incluyendo, por ejemplo, un vaso de recirculación, un medio de transporte de fluido tal como tubos, válvulas, una bomba y un dispositivo de extracción de disolvente, tal como un HFC. En este bucle de circulación, el HFC funciona como un dispositivo de extracción de disolvente de recirculación. El plasma/disolvente se hace circular por la fibra hueca del HFC, poniendo en contacto de ese modo el disolvente de extracción con un gas o un segundo disolvente de extracción, circulando por la carcasa del HFC. Si se usa un disolvente volátil como el primer disolvente de extracción, cualquier gas capaz de extraer el primer disolvente de extracción del plasma deslipidado puede ser usado, incluyendo, pero no limitándose a, nitrógeno y aire.

Realizaciones no inventivas para llevar a cabo el método in vitro de la presente invención.

- 30 Los componentes descritos anteriormente se pueden integrar en una pluralidad de diferentes realizaciones para permitir el método in vitro de la presente invención. Algunas realizaciones específicas se describirán en la presente memoria para destacar en particular propuestas definidas para poner en práctica la presente invención. Las realizaciones enumeradas a continuación describen realizaciones no inventivas para llevar a cabo el método in vitro de la presente invención y se diseñan para ejemplificar la presente invención.

- 35 Haciendo referencia a las Figuras 19 a 21, se muestra una pluralidad de realizaciones que representan diferentes sistemas capaces de poner en práctica la presente invención. Se debería entender que cada realización presenta diferentes ventajas y desventajas, desde una perspectiva de coste y utilización, y que ninguna de las realizaciones son específicamente preferidas en relación a otras realizaciones. La Figura 19 representa un diagrama de flujo de componentes básicos que define elementos del sistema 1.900 de modificación de HDL. Se proporciona una entrada de fluido 1.905 y se conecta mediante tubos a un dispositivo 1.920 de mezcla. Se proporciona una entrada de disolvente 1.910 y también se conecta mediante tubos a un dispositivo 1.920 de mezcla. Preferiblemente, se usan válvulas 1.915 para controlar el flujo de fluido desde la entrada 1.905 de fluido y disolvente de la entrada 1.910 de disolvente. Se debería apreciar que la entrada 1.905 de fluido contiene preferiblemente cualquier fluido que incluya partículas de HDL, incluyendo plasma con partículas de LDL o desprovisto de partículas de LDL, como se discutía anteriormente. Se debería apreciar además que la entrada 1.910 de disolvente puede incluir un disolvente solo, una mezcla de disolventes, o una pluralidad de diferentes disolventes que se mezclan en el punto de entrada 1.910 de disolvente. Mientras se representa como un contenedor de un solo disolvente, la entrada 1.910 de disolvente puede comprender una pluralidad de contenedores de disolvente separados. Los tipos de disolventes que se usan y se prefieren se discutieron anteriormente.

- 50 El mezclador 1.920 mezcla fluido de la entrada 1.905 de fluido y disolvente de la entrada 1.910 de disolvente para proporcionar una mezcla fluido-disolvente. Preferiblemente, el mezclador 1.920 es capaz de usar un método de mezcla de bolsa agitadora con el fluido de entrada y disolvente de entrada en una pluralidad de lotes, tales como 1, 2, 3 o más lotes. Un mezclador ejemplar es una mesa agitadora orbital Barnstead Labline. Una vez formada, la mezcla fluido-disolvente se dirige, a través de tubos y se controla mediante al menos una válvula, a un separador 1.925. En una realización preferida, el separador 1.925 es capaz de realizar separación de disolvente volumétrico a través de separación por gravedad en una bolsa con forma de embudo.

El separador 1.925, la mezcla fluido-disolvente se separa en una primera capa y segunda capa. La primera capa

comprende una mezcla de disolvente y lípido que se ha eliminado de las partículas de HDL. La segunda capa comprende una mezcla de disolvente residual, partículas de HDL modificadas y otros elementos del fluido de entrada. Un experto en la materia apreciaría que la composición de la primera capa y la segunda capa diferiría basándose en la naturaleza del fluido de entrada. Una vez que se separan las capas primera y segunda en el separador 1.925, la segunda capa es transportada por tubos a un dispositivo 1.940 de extracción de disolvente. Preferiblemente, se coloca un sensor 1.930 de presión y válvula en la corriente de flujo para controlar el flujo de la segunda capa al dispositivo 1.940 de extracción de disolvente.

Las válvulas de apertura y cierre para permitir el flujo de fluido desde los contenedores 1.905, 1.910 de entrada se sincronizan preferiblemente usando cálculos de equilibrio de masa derivados de determinaciones de peso de las entradas 1.905, 1.910 de fluido y el separador 1.925. Por ejemplo, las válvulas entre el separador 1.925 y el contenedor 1.935 de desechos y entre el separador 1.925 y el dispositivo 1.940 de extracción de disolvente se abren después de que las masas de entrada (fluido y disolvente) se equilibran sustancialmente con la masa del separador 1.925 y ha transcurrido un periodo de tiempo suficiente para permitir la separación entre la primera y la segunda capas, como se discutió anteriormente. Dependiendo de en qué se usa disolvente, y por lo tanto que capa se sedimenta en el fondo del separador 1.925, se abre la válvula entre el separador 1.925 y el contenedor 1.935 de desecho o se abre entre los separadores 1.925 y el dispositivo 1.940 de extracción de disolvente. Un experto en la materia apreciaría que la sincronización de la apertura depende de cuánto fluido esté en la primera y la segunda capa y apreciaría además que se prefiere mantener la válvula entre el separador 1.925 y el contenedor 1.935 de desecho abierta justo el tiempo suficiente para eliminar toda la primera capa y algo de la segunda etapa, asegurando de ese modo que se ha eliminado tanto disolvente como es posible del fluido que se está enviando al dispositivo 1.940 de extracción de disolvente.

Preferiblemente, una entrada 1.955 de glucosa y entrada 1.960 de disolución salina está en comunicación de fluido con la ruta de fluido que conduce del separador 1.925 al dispositivo 1.940 de extracción de disolvente. También se incorpora preferiblemente una pluralidad de válvulas en la corriente de flujo desde la entrada 1.955 de glucosa y la entrada 1.960 de disolución salina a los tubos que proporcionan la ruta de flujo del separador 1.925 al dispositivo 1.940 de extracción de disolvente. Se incorporan glucosa y disolución salina en la presente invención para cebar el dispositivo 1.940 de extracción de disolvente previamente a la operación del sistema. En el caso de que no se requiera tal cebado, no se requieren las entradas de glucosa y disolución salina. También, un experto en la materia apreciaría que las entradas de glucosa y disolución salina pueden ser reemplazadas con otros cebadores si el dispositivo 1.940 de extracción de disolvente lo requiere.

El dispositivo 1.940 de extracción de disolvente es preferiblemente una columna de carbón vegetal diseñada para eliminar el disolvente específico usado en la entrada 1.910 de disolvente. Un dispositivo 1.940 de extracción de disolvente ejemplar es una columna de carbón vegetal Asahi Hemosorber. Se usa una bomba 1.950 para mover la segunda capa del separador 1.925, a través del dispositivo 1.940 de extracción de disolvente, y a un contenedor 1.945 de salida. La bomba es preferiblemente una bomba peristáltica tal como una Masterflex Modelo 77201-62.

La primera capa se dirige a un contenedor 1.935 de desecho que está en comunicación de fluido con el separador 1.925 a través de tubos y al menos una válvula. Adicionalmente, se puede dirigir otro desecho, si es generado, de la ruta de fluido que conecta el dispositivo 1.940 de extracción de disolvente y el contenedor 1.945 de salida al contenedor 1.935 de desecho.

Preferiblemente, una realización de la presente invención usa la gravedad, siempre que sea práctico, para mover el fluido por cada uno de la pluralidad de componentes. Por ejemplo, se usa preferiblemente la gravedad para drenar el plasma 1.905 de entrada y el disolvente 1.910 de entrada al mezclador 1.920. En el caso de que el mezclador 1.920 comprenda una bolsa agitadora y el separador 1.925 comprenda una bolsa de embudo, el fluido se mueve desde la bolsa agitadora a la bolsa de embudo y, con posterioridad, al contenedor 1.935 de desecho, si es apropiado, usando la gravedad.

En una etapa adicional, no mostrada en la Figura 19, el fluido de salida en el contenedor 1.945 de salida se sometería a un sistema de detección de disolvente, o sistema de detección de agente de eliminación de lípido, para determinar si algo de disolvente, u otro componente no deseable, está en el fluido de salida. En una realización, el fluido de salida se somete a sensores que pueden determinar las concentraciones de disolventes introducidas en la entrada de disolvente, tal como n-butanol o diisopropil éter. Esta es una medición importante debido a que el fluido de salida se devuelve al torrente circulatorio del paciente y las concentraciones de disolvente deben estar por debajo de un nivel predeterminado para llevar a cabo esta operación con seguridad. Los sensores pueden proporcionar preferiblemente dicha información de la concentración sobre una base de tiempo real y sin tener que transportar físicamente una muestra del fluido de salida, o aire en la cámara de aire, o un dispositivo remoto.

En una realización, se usa tecnología de polímeros molecularmente impresos para permitir sensores de ondas acústicas superficiales. Un sensor de onda acústica superficial recibe una entrada, por alguna interacción de su superficie con el entorno circundante, y proporciona una respuesta eléctrica, generada por las propiedades piezoeléctricas del sustrato sensor. Para permitir la interacción, se usa tecnología de polímeros molecularmente impresos. Los polímeros molecularmente impresos son plásticos programados para reconocer moléculas diana, como productos farmacéuticos, toxinas o contaminantes medioambientales, en muestras biológicas complejas. La

tecnología de impresión molecular se permite por la polimerización de uno o más monómeros funcionales con un exceso de monómero de reticulación en presencia de una molécula plantilla diana que presenta una estructura similar a la molécula diana que se tiene que reconocer, es decir, el disolvente diana.

5 Se prefiere el uso de tecnología de polímeros molecularmente impresos para permitir sensores de ondas acústicas superficiales en relación a otras propuestas tecnológicas debido a que se pueden hacer más específicas para las concentraciones de disolventes fijados como objetivo y son capaces de diferenciar dichos disolventes fijados como objetivo de otros interferentes posibles. Como resultado, la presencia de interferentes aceptables que pueden presentar estructuras y/o propiedades similares a los disolventes fijados como objetivo no evitaría que el sensor indicará con precisión concentraciones de disolvente respectivas existentes.

10 Alternativamente, si el disolvente de entrada comprende algunos disolventes, tales como n-butanol, se podía usar oxidación electroquímica para medir la concentración de disolvente. Las mediciones electroquímicas presentan varias ventajas. Son simples, sensibles, rápidas y presentan un amplio intervalo dinámico. La instrumentación es simple y no se ve afectada por la humedad. En una realización, el disolvente diana, tal como n-butanol, se oxida en un electrodo de platino usando voltametría cíclica. Esta técnica se basa en la variación del potencial aplicado en un electrodo de trabajo en las direcciones tanto hacia delante como inversa, a una velocidad de barrido predefinida, al tiempo que se controla la corriente. Se puede realizar un ciclo completo, un ciclo parcial o una serie de ciclos. Mientras el platino es el material de electrodo preferido, se podían usar otros electrodos, tales como oro, plata, iridio o grafito. Aunque se usan técnicas voltamétricas cíclicas, otras técnicas de pulso tales como voltametría de pulso diferencial o voltametría de onda cuadrada pueden aumentar la velocidad y la sensibilidad de las mediciones. La alternativa, un sensor Taguchi, no se prefiere debido a que no opera de manera eficaz en condiciones de humedad.

Las realizaciones descritas en la presente memoria cubren de manera expresa cualquier forma y todas las formas de muestreo y medición, detección y análisis, de manera automática, de un fluido de salida o la cámara de aire por encima del fluido de salida. Por ejemplo, se puede conseguir dicha detección automatizada por integración de un dispositivo de medición de cromatografía de mini-gas (GC) que muestrea de manera automática el aire en el contenedor de salida, lo transmite a un dispositivo de GC optimizado para los disolventes específicos usados en el procedimiento de deslipidación y usando técnicas de GC conocidas, analiza en la muestra la presencia de los disolventes.

Haciendo referencia de nuevo la Figura 19, los materiales adecuados para uso en cualquiera de los componentes del aparato como se describe en la presente memoria incluyen materiales que son biocompatibles, homologados para aplicaciones médicas que implican el contacto con fluidos corporales internos y conforme a los estándares PV1 o ISO 10993 de EE.UU. Además, los materiales no se deberían degradar sustancialmente a partir de, por ejemplo, la exposición a los disolventes usados en la presente invención, durante al menos un solo uso. Los materiales deberían ser típicamente esterilizables por radiación o esterilización con óxido de etileno (EtO). Tales materiales adecuados deberían poderse conformar en objetos usando procedimientos convencionales, tales como extrusión, moldeado por inyección y otros. Los materiales que satisfacen estos requerimientos incluyen, pero no se limitan a, nailón, polipropileno, policarbonato, acrílico, polisulfona, poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF, por sus siglas en inglés), fluoroelastómeros tales como VITON, disponibles en DuPont Dow Elastomers L.L.C., elastómeros termoplásticos tales como SANTOPRENE, disponible en Monsanto, poliuretano, poli(cloruro de vinilo) (PVC), politetrafluoroetileno (PTFE), polifenilén éter (PFE), copolímero de perfluoroalcoxi (PFA), que está disponible como TEFLON PFA de E. I. du Pont de Nemours and Company, y combinaciones de los mismos.

Las válvulas usadas en cada realización pueden estar constituidas por válvulas de tracción, de globo, de bola, de compuerta u otras válvulas convencionales. Preferiblemente, las válvulas son válvulas de oclusión tales como la válvula de Acro Associates' Modelo 955. Sin embargo, la realización puede ser una válvula sin un estilo particular. Además, los componentes de cada sistema descritos a continuación pueden estar acoplados físicamente entre sí o acoplados entre sí usando conductos que pueden estar constituidos por tubería flexible o rígida, tubos u otros dispositivos conocidos por los expertos en la materia.

Haciendo referencia la Figura 20, se muestra una configuración 2.000 específica. Una configuración 2.000 preferida comprende una caja 2.005 cerrada capaz de contener con seguridad fluidos volátiles, tales como disolventes. En una realización preferida, la caja 2.005 cerrada comprende una puerta 2.015 con una puerta transparente para observar el procedimiento de deslipidación en funcionamiento, una base 2.025 móvil, un indicador 2.020 de control, una parte superior 2.010 transparente y un filtro y sistema de circulación de aire [no mostrado]. La pantalla de interfase del indicador 2.020 de control es preferiblemente funcional cuando se abre la puerta 2.015 para permitir que el sistema se establezca e imprima un dispositivo de extracción de disolvente pero no permita que el sistema deslipide un fluido de entrada hasta que se cierre la puerta 2.015 y, preferiblemente, se cierre. También se prefiere tener una bandeja de desecho o desagüe capaz de atrapar cualquier fuga de fluido, desagües, u otros derrames en la base de la caja 2.005 cerrada de una manera que permita que la bandeja se vuelva mover fácilmente sin apertura de la caja 2.005.

Haciendo referencia la Figura 21, se muestra una configuración de componentes básicos del sistema 2.100 de modificación de HDL. Se proporciona 2.105 una entrada de fluido y se conecta mediante tubos a un dispositivo 2.120 de mezcla. Se proporciona una entrada de disolvente 2.110 y también se conecta mediante tubos a un dispositivo

2.120 de mezcla. Se usan válvulas preferiblemente para controlar el flujo de fluido de la entrada 2.105 de fluido y disolvente de la entrada 2.110 de disolvente. Se debería apreciar que la entrada 2.105 de fluido contiene preferiblemente cualquier fluido que incluya partículas de HDL, incluyendo plasma que contiene partículas de LDL o está desprovisto de partículas de LDL, como se discutió anteriormente. Se debería apreciar que la entrada 2.150 de fluido contiene preferiblemente cualquier fluido que incluya partículas de HDL, incluyendo plasma que contiene partículas de LDL o está desprovisto de partículas de LDL, como se discutió anteriormente. Se debería apreciar que la entrada 2.110 de disolvente puede incluir un solo disolvente, una mezcla de disolventes, o una pluralidad de diferentes disolventes que se mezclan en el punto de entrada 2.110 de disolvente. Aunque se representa como un contenedor de un solo disolvente, la entrada 2.110 de disolvente puede comprender una pluralidad de contenedores de disolvente separados. Los tipos de disolventes que se usan y se prefieren se discutieron anteriormente.

El mezclador 2.120 mezcla fluido de la entrada 2.105 de fluido y disolvente de la entrada 2.110 de disolvente para proporcionar una mezcla fluido-disolvente. Preferiblemente, el mezclador 2.120 es capaz de usar un método de mezclamiento de bolsa mezcladora con el fluido de entrada y el disolvente de entrada en una pluralidad de lotes, tales como 1, 2, 3 o más lotes. Una vez formada, se dirige la mezcla fluido-disolvente, a través de tubos y se controla mediante al menos una válvula, a un separador 2.125. En una realización preferida, el separador 2.125 es capaz de realizar separación de disolvente volumétrica por separación por gravedad en una bolsa con forma de embudo.

En el separador 2.125, la mezcla fluido-disolvente se separa en una primera capa y segunda capa. La primera capa comprende una mezcla de disolvente y lípido que ha sido retirado de las partículas de HDL. La segunda capa comprende una mezcla de disolvente residual, partículas de HDL modificadas y otros elementos del fluido de entrada. Un experto en la materia apreciaría que la composición de la primera capa y la segunda capa diferiría basándose en la naturaleza del fluido de entrada: Una vez que se separan la primera y la segunda capa en el separador 2.125, la segunda capa es transportada por tubos a un dispositivo 2.140 de extracción de disolvente. Preferiblemente, se coloca un sensor de presión y válvula en la corriente de flujo para controlar el flujo de la segunda capa al dispositivo 2.140 de extracción de disolvente.

Preferiblemente, una entrada 2.130 de glucosa y entrada 2.150 de disolución salina está en comunicación de fluido con la ruta de fluido que conduce del separador 2.125 al dispositivo 2.140 de extracción de disolvente. También se incorpora preferiblemente una pluralidad de válvulas en la corriente de flujo desde la entrada 2.130 de glucosa y la entrada 2.150 de disolución salina a los tubos que proporcionan la ruta de flujo desde el separador 2.125 al dispositivo 2.140 de extracción de disolvente. Se incorporan glucosa y disolución salina en la presente invención para cebar el dispositivo 2.140 de extracción de disolvente previamente a la operación del sistema. En el caso de que no se requiera dicho cebado, no se requieren las entradas de glucosa y disolución salina. También, un experto en la materia apreciaría que las entradas de glucosa y disolución salina con otros cebadores se pueden reemplazar si lo requiere el dispositivo 2.140 de extracción de disolvente.

El dispositivo 2.140 de extracción de disolvente es preferiblemente una columna de carbón vegetal diseñada para eliminar el disolvente específico usado en la entrada 2.110 de disolvente. Un dispositivo 2.140 de extracción de disolvente ejemplar es una columna de carbón vegetal Asahi Hemosorber. Se usa una bomba 2.135 para mover la segunda capa desde el separador 2.125, por el dispositivo 2.140 de extracción de disolvente y a un contenedor 2.115 de salida. La bomba es preferiblemente una bomba peristáltica, tal como una Masterflex Modelo 77201-62.

La primera capa se dirige a un contenedor 2.155 de desecho que está en comunicación de fluido con el separador 2.125 a través de tubos y al menos una válvula. Adicionalmente, se puede dirigir otro desecho, si se genera, desde la ruta de fluido que conecta el dispositivo 2.140 de extracción de disolvente y el contenedor 2.115 de salida al contenedor 2.155 de desecho.

Preferiblemente, una realización usa la gravedad, siempre que sea práctico, para mover fluido a través de cada uno de la pluralidad de componentes. Por ejemplo, se usa preferiblemente gravedad para drenar el plasma 2.105 de entrada y el disolvente 2.110 de entrada al mezclador 2.120. En el caso de que el mezclador 2.120 comprenda una bolsa mezcladora y el separador 2.125 comprenda una bolsa de embudo, el fluido se mueve desde la bolsa mezcladora a la bolsa de embudo y, con posterioridad, al contenedor 2.155 de desecho, si es apropiado, usando la gravedad.

En general, se describen en la presente memoria configuraciones en las que todas las entradas, tales como plasma de entrada y disolventes de entrada, elementos desechables, tales como bolsas de mezclamiento, bolsas separadoras, bolsas de desecho, dispositivos de extracción de disolvente y dispositivos de detección de disolvente y contenedores de salida están en posiciones fácilmente accesibles y se pueden retirar fácilmente y sustituir por un técnico.

Para permitir la operación de las realizaciones descritas anteriormente, es preferible suministrar a un usuario de dicha realizaciones un conjunto de componentes empaquetado, en forma de estuche, que comprenda cada componente requerido para poner en práctica el método in vitro de la presente invención. Dicho estuche incluiría preferiblemente un contenedor de fluido de entrada (es decir, un contenedor de fuente de lipoproteínas de alta densidad), un contenedor de fuente de agente de eliminación de lípidos (es decir, un contenedor de disolvente), componentes desechables de un mezclador, tales como una bolsa u otro contenedor, componentes desechables de

un separador, tales como una bolsa u otro contenedor, componentes desechables de un dispositivo de extracción de disolvente (es decir, una columna de carbón vegetal), un contenedor de salida, componentes desechables de un contenedor de desecho, tal como una bolsa u otro contenedor, dispositivos de detección de disolvente y una pluralidad de tubos y una pluralidad de válvulas para controlar el flujo de fluido de entrada (lipoproteína de alta densidad) del contenedor de entrada y agente de eliminación de lípidos (disolvente) del contenedor de disolventes al mezclador, para controlar el flujo de la mezcla de agente de eliminación de lípidos, lípido y derivado de partículas al separador, para controlar el flujo de lípido y agente eliminador de lípidos a un contenedor de desecho, para controlar el flujo de agente de eliminación de lípidos residual, lípido residual y derivado de partículas al dispositivo de extracción y para controlar el flujo de derivado de partículas al contenedor de salida.

Se describe en la presente memoria un estuche que puede comprender un contenedor de plástico con componentes desechables de un mezclador, tal como una bolsa u otro contenedor, componentes desechables de un separador, tales como una bolsa u otro contenedor, componentes desechables de un contenedor de desecho, tales como una bolsa u otro contenedor y una pluralidad de tubos y una pluralidad de válvulas para controlar el flujo de fluido de entrada (lipoproteína de alta densidad) del contenedor de entrada y agente de eliminación de lípido (disolvente) del contenedor de disolventes al mezclador, para controlar el flujo de la mezcla de agente eliminador de lípidos, lípido y derivado de partículas al separador, para controlar el flujo de lípido y agente de eliminación de lípidos a un contenedor de desecho, para controlar el flujo de agente de eliminación de lípidos residual, lípido residual y derivado de partículas al dispositivo de extracción y para controlar el flujo de derivados de partículas al contenedor de salida. Los componentes desechables de un dispositivo de extracción de disolvente (es decir, una columna de carbón vegetal), el fluido de entrada, el disolvente de entrada y dispositivos de extracción de disolvente se proporcionan por separado.

Programa de administración

Las partículas de HDL modificadas descritas en la presente memoria se pueden administrar según cualquier programa que sea eficaz para promover el eflujo de colesterol celular.

En una realización, se extrae sangre de un paciente en un volumen suficiente para producir aproximadamente 1 litro de plasma. La sangre se separa en plasma y glóbulos rojos usando métodos comúnmente conocidos para un experto en la materia, tal como plasmaféresis, y se almacenan los glóbulos rojos en una disolución de almacenamiento apropiada o se devuelve al paciente durante la plasmaféresis. Los glóbulos rojos son devueltos preferiblemente al paciente durante la plasmaféresis. También se administra opcionalmente disolución salina fisiológica al paciente para reponer el volumen. El 1 litro de plasma se trata con cualquiera de los métodos de la presente invención para crear partículas de HDL con contenido reducido en lípidos aunque no afectando sustancialmente a LDL. El plasma tratado resultante que contiene las partículas de HDL con lípido reducido y contenido en LDL sustancialmente no afectado se combina opcionalmente con los glóbulos rojos del paciente, sino si no se hubieran devuelto ya los glóbulos rojos durante la plasmaféresis, y se administra al paciente. Una vía de administración es a través del sistema vascular, preferiblemente por vía intravenosa. Este tratamiento se repite semanalmente durante aproximadamente 5 a 6 semanas. Se observa eflujo de colesterol aumentado en el paciente después del tratamiento.

En otra realización, se retira sangre de un paciente en un volumen suficiente para producir aproximadamente 1 litro de plasma. La sangre se separa en plasma y glóbulos rojos usando métodos conocidos para un experto en la materia, tal como plasmaféresis, y se almacenan los glóbulos rojos en una disolución de almacenamiento apropiada o se devuelven al paciente durante la plasmaféresis. El 1 litro de plasma es tratado para eliminar el componente de LDL antes de tratamiento adicional del plasma. El 1 litro de plasma es tratado con el método in vitro de la presente invención para crear partículas de HDL con contenido reducido en lípidos. El plasma tratado resultante que contiene las partículas de HDL con lípidos reducidos se combina opcionalmente con los glóbulos rojos del paciente, si no se han devuelto ya los glóbulos rojos durante la plasmaféresis, y se administran al paciente. Una vía de administración es a través del sistema vascular, preferiblemente por vía intravenosa. Este tratamiento se repite semanalmente durante aproximadamente 5 a 6 semanas.

Se tiene que entender que se pueden tratar otros volúmenes de plasma con el método in vitro de la presente invención y administrarlos a un paciente en diversos programas de administración. Para un procedimiento discontinuo, los volúmenes de 100 ml a 3.500 ml de plasma se pueden tratar con el método in vitro presente. La frecuencia de tratamiento puede variar también desde entre varias veces por semana a una vez al mes o menos, dependiendo del volumen que se tiene que tratar y la gravedad de la afección del paciente.

En otra propuesta de la presente invención, después de eliminación de un volumen deseado de una sangre del paciente, la separación de la sangre en plasma y glóbulos rojos y el tratamiento del plasma para reducir los niveles de lípidos, las partículas de HDL con contenido reducido en lípidos se aíslan del plasma y se administran al paciente en un vehículo aceptable.

En otra realización más, se puede obtener plasma heterólogo, tratado con método in vitro de la presente invención y el plasma tratado que contiene partículas de HDL con contenido reducido en lípidos es administrado a un paciente que no fue la fuente del plasma. En una realización más, se puede obtener plasma heterólogo, tratado con el método

in vitro de la presente invención y las partículas de HDL con contenido reducido en lípidos se separan del plasma tratado. Estas partículas de HDL con contenido reducido en lípidos se pueden administrar en un vehículo aceptable a un paciente que no fue la fuente del plasma.

- 5 En otra realización más, después de eliminación de un volumen deseado de sangre del paciente, se permite que el paciente se recupere durante 1 a 4 días en términos de producir nueva sangre y alcanzar niveles de HDL en plasma endógenos sustancialmente similares a los niveles de HDL en plasma antes de retirar la sangre. La sangre retirada se separa en plasma y glóbulos rojos y se trata el plasma para reducir los niveles de lípidos. Las partículas de HDL con contenido reducido en lípidos se aíslan del plasma y se administran al paciente. Alternativamente, las partículas de HDL con contenido reducido en lípidos no se aíslan del plasma y se administra el plasma tratado al paciente.
- 10 En otra realización se trata plasma con los métodos in vitro de la presente invención para reducir los niveles de lípidos. A continuación, se purifica proteína Apo A-1 de este plasma tratado usando técnicas tales como cromatografía de afinidad. La proteína Apo A-1 modificada, purificada resultante, se administra en un vehículo aceptable a un paciente junto con las partículas de HDL modificadas con contenido reducido en lípidos. Estas partículas de HDL modificadas con contenido reducido en lípidos se pueden proporcionar al paciente como
- 15 partículas de HDL aisladas en un vehículo aceptable o incluidas con el plasma tratado.

Administración con otros tratamientos

En la presente memoria se describen partículas de HDL modificadas que se pueden administrar junto con una o más propuestas terapéuticas adicionales. Las partículas de HDL modificadas se pueden administrar junto con ejercicio y restricción dietética de ingesta de grasa y colesterol.

- 20 Además se describen en la presente memoria partículas de HDL modificadas que se pueden administrar junto con la administración de agentes para reducir el colesterol, reducir los niveles de LDL y mejorar los niveles de HDL. Estos agentes, tales como inhibidores de la HMG-CoA reductasa, o estatinas, se pueden administrar en dosis y de acuerdo con programas de administración comúnmente conocidos para un experto en la materia. Las estatinas incluyen cerivastatina, atorvastatina, fluvastatina, simvastatina, pravastatina y lovastatina. Por ejemplo, dosis de 10 mg, 20
- 25 mg, 40 mg u 80 mg de estatinas, tomadas una vez al día, se emplean comúnmente. Se describe además la administración de las partículas de HDL modificadas que puede eliminar la necesidad de tratamiento con estatinas en pacientes o reducir la dosis requerida de estatinas.

- En otro aspecto, se describen en la presente memoria las partículas de HDL modificadas que se pueden usar junto con administración de agentes diseñados para reducir la absorción de grasa y colesterol. Tales agentes, por ejemplo ezetimibe, y las dosis clínicamente apropiadas son conocidas para un experto en la materia.
- 30

En otro aspecto más, se describen en la presente memoria las partículas de HDL modificadas que se pueden usar junto con administración de uno o más agentes tales como derivados de ácido fibríco (gemfibrozil), ácido nicotínico (niacina) y resinas de unión de ácido biliar (colestiramina, colestipol) y las dosis clínicamente apropiadas son conocidas para un experto en la materia.

- 35 En otro aspecto más, se describen en la presente memoria las partículas de HDL modificadas que se pueden usar junto con administración de fármacos antiinflamatorios, tales como aspirina, conocidos para un experto en la materia. Las dosis clínicamente apropiadas de fármacos antiinflamatorios son conocidas para un experto en la materia. Los fármacos antiinflamatorios con frecuencia se prescriben a pacientes con enfermedad vascular puesto que se cree que la inflamación es un factor causante de aterosclerosis y otras enfermedades vasculares.

- 40 Se describen además partículas de HDL modificadas que se pueden usar junto con administración de agentes tales como estatinas y con agentes diseñados para reducir la absorción de grasa y colesterol. Esta combinación de tres tratamientos es eficaz para mejorar el eflujo de colesterol de las células y permite la administración de dosis inferiores de estatinas. También se describen partículas de HDL modificadas que se pueden usar también junto con cualquiera de las propuestas terapéuticas descritas anteriormente.

- 45 Los siguientes ejemplos servirán para ilustrar más la presente invención si en, al mismo tiempo, sin embargo, constituir ninguna limitación de los mismos. Por el contrario, se debe entender claramente que se puede recurrir a diversas realizaciones, modificaciones y equivalentes de los mismos, después de la lectura de la descripción en la presente memoria, que pueden ser sugeridos a los expertos en la materia sin apartarse del espíritu de la invención.

Ejemplo no inventivo 1

- 50 Separación y caracterización de colesterol total, Apolipoproteína A1 (Apo A-1), Apolipoproteína B (Apo B) y fosfolípidos en plasma normal.

- Se caracterizó una mezcla de 25 ml de plasma en términos de colesterol total, apolipoproteína A1 (Apo A-1), apolipoproteína B (Apo B) y fosfolípidos. Se cargó una alícuota de 1 ml del plasma mezclado en una columna Sephacryl S-300 26/60 (FPLC). Se aplicó un tampón de elución de disolución salina tamponada con fosfato
- 55 conteniendo AEDT 1 mM a la columna y se eluyó a 2 ml/min. Se recogieron aproximadamente 96 fracciones, una

cada 43 segundos empezando 41 minutos después de la aplicación de la muestra de plasma. Cada fracción se caracterizó en términos de colesterol total, Apo A-1, Apo B y fosfolípidos.

5 Las partículas conteniendo Apo B constituidas por partículas de lipoproteína de densidad muy baja (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL) y lipoproteína de densidad baja (LDL) eluyeron en fracciones 10 - 40. Las partículas conteniendo Apo A-1 constituidas por partículas de lipoproteína de densidad alta (HDL), eluyeron en las fracciones restantes. Los resultados se presentan en la Figura 3. Un análisis de colesterol en plasma total indicó una separación clara de las partículas de LDL de las partículas de HDL. La distribución de Apo A-1 y Apo B en las fracciones correspondientes confirmó la separación de estas partículas.

Ejemplo no inventivo 2

10 Creación selectiva de partículas de HDL asociadas a Apo A-1 con colesterol reducido o con colesterol y fosfolípidos reducidos usando DIPE.

15 Este método de tratamiento de plasma selectivo emplea una relación de DIPE:plasma 1:1. Se sometió la muestra a agitación vorticial durante 15 segundos y después se permitió que se separara por la gravedad. Se usó carbón vegetal activado para eliminar el DIPE residual después de que se midiera el procedimiento y diversos parámetros hematológicos diferentes.

Después se aplicó la muestra deslipidada a una columna y se trató como se explica en el Ejemplo 1. Este método retiró aproximadamente 10% de colesterol total, 12% de Apo B, 17% de Apo A-1 y aproximadamente 11% de fosfolípidos.

20 Se presenta una comparación de la elución de la muestra deslipidada con la elución de plasma no deslipidado, normal, en las Figuras 4 y 5. Los resultados muestran un cambio a la derecha de las partículas de HDL asociadas a Apo A-1, que indica una partícula más pequeña no asociada a colesterol (Figura 4) y tampoco asociada a fosfolípido (Figura 5). De acuerdo con esto, este método de deslipidación creó partículas de HDL asociadas a Apo A-1 que fueron bajas o sustancialmente desprovistas de colesterol y fosfolípido y, por lo tanto, presentaron nueva capacidad para unirse con colesterol y fosfolípido. Se retiró lípido sólo ligeramente de las partículas de LDL (Apo B) con este método (Figura 6).

En resumen, se observaron dos tipos de partículas de HDL. Hubo un amplio intervalo de tamaños de partículas de HDL conteniendo Apo A-1 y fosfolípidos pero no colesterol. Se observó un intervalo de tamaño relativamente estrecho de partículas de HDL conteniendo Apo A-1 pero no fosfolípidos o colesterol.

Ejemplo 3

30 Creación selectiva de partículas de HDL asociadas a Apo A-1 con colesterol reducido o con colesterol y fosfolípidos reducidos usando una mezcla de sevoflurano: n-butanol.

35 Se emplea una mezcla de sevoflurano y n-butanol como un disolvente en una concentración de 95% de sevoflurano y 5% de n-butanol. Se añadió la mezcla a plasma en una relación de disolvente a plasma 2:1. Se sometió a agitación vorticial la muestra durante 15 segundos y después se centrifugó. Se añadió carbón vegetal activado para eliminar disolvente residual. Se pasó la muestra exenta de disolvente resultante sobre una columna de FPLC como se describe en el Ejemplo 1. Los datos relativos a la reducción en porcentaje de colesterol, fosfolípido y Apo A-1 se obtuvieron de mediciones cuantitativas y no de los perfiles de elución de FPLC.

40 Este método redujo el colesterol total por 9% y fosfolípidos por 9%. Se observó una disminución de aproximadamente 14% en Apo A-1. La Figura 7 muestra que este método dio como resultado partículas de HDL asociadas a Apo A-1 de peso inferior que no estaban asociadas a colesterol cuando se comparó con plasma que no fue sometido a dicho tratamiento. Sin embargo, estas partículas de HDL asociadas a Apo A-1 se asociaron a fosfolípido (Figura 8). Hubo poco efecto sobre partículas de LDL asociadas a Apo B como se muestra en la Figura 9. En resumen, este procedimiento dio como resultado una partícula de HDL modificada que contenía Apo A-1 y fosfolípidos, pero poco o nada de colesterol.

45 Ejemplo 4

Análisis de parámetros clínicos en plasma normal y plasma tratado con DIPE o sevoflurano: n-butanol.

Se analizaron alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (AP), bilirrubina-T, sodio, potasio, fósforo, albúmina, globulina y la relación albúmina/globulina (A/G) en plasma no tratado normal y en plasma tratado con DIPE al 100% o con sevoflurano: n-butanol. Los resultados se presentan en la Figura 10.

50 El tratamiento con DIPE no cambió los parámetros en ningún grado clínicamente significativo. El tratamiento con sevoflurano: n-butanol no cambió los parámetros a ningún grado clínicamente significativo. Estos tratamientos, por lo tanto, no afectan sustancialmente a los componentes constituyentes del plasma no HDL.

Ejemplo 5

Resumen de la eficacia de diferentes disolventes sobre la eliminación de colesterol de HDL y efectos sobre LDL.

Las Figuras 11-15 muestran un perfil de Superose FPLC de plasma tratado con nada, DIPE (100%), sevoflurano:n-butanol (95:5), sevoflurano:n-butanol (75:25) y DIPE:n-butanol (95:5), respectivamente, para una variedad de parámetros. Se muestran colesterol total, fosfolípido, Apo B, Apo A-1 y Apo A2. Los datos indican que el colesterol se reduce después de tratamiento de disolvente en las áreas asociadas a Apo A-1 y Apo A2 (el pico en el lado derecho de cada figura) mientras el Apo B asociado a LDL (pico medio) permanece sustancialmente sin cambio. Sin embargo, un tratamiento de disolvente severo con una relación de disolvente de DIPE:n-butanol 75:25 (Fig. 14) redujo drásticamente el colesterol total y los fosfolípidos cuando se compara con plasma no tratado (Fig. 11).

Ejemplo 6

Estudios de eflujo de colesterol de plasma tratado con diversos disolventes.

Se emplearon todas las condiciones de disolvente anteriores para ensayar los efectos de plasma tratado sobre eflujo de colesterol en la ruta ABCA1 y la ruta SRB1 cuando se mide en células COS y Fu5AH. Los ensayos in vitro empleados fueron los descritos por Rothblatt y colaboradores (de la Llera Moya et al., *Arteriosclerosis. & Thrombosis* 14:1.056-1.065, 1.994).

Los métodos in vitro empleados se describen en general en los siguientes párrafos. El sistema de células de cultivo de tejido se diseñó para cuantificar la contribución de receptor de eliminador BI (SR-BI) o transportador 1 de la casete de unión de ATP (ABCA1) al eflujo de colesterol celular cuando las células se exponen a suero o lipoproteínas aisladas. La propuesta general es medir la liberación de colesterol celular radiomarcado para aceptores aislados o suero total. Las contribuciones de SR-BI o ABCA1 a este procedimiento de eflujo se determina por comparación de la liberación obtenida de las células que carecen del receptor específico al observado en cultivos de células paralelos expresando el receptor. Así, para cuantificar la contribución de ABCA1 a eflujo de colesterol celular, se cultivan células de macrófago de ratón transformadas en monocapas y se marcaron previamente con colesterol ³H. Una serie de monocapas se trata con cAMP que se ha demostrado que regula hacia arriba el receptor de ABCA1, mientras se deja sin tratar una serie replicada de monocapas y sirven como células de control que carecen de ABC1. Los sueros que se tienen que ensayar se diluyen a una concentración apropiada y se incuban con monocapas tanto positivas como negativas de ABCA1. La liberación del colesterol radiomarcado se determina después de un tiempo de incubación apropiado que oscila de 1 a 12 horas. La contribución de ABCA1 al eflujo se determina por sustracción del eflujo obtenido en cultivos negativos de ABCA1 del obtenido de los cultivos positivos de ABCA1.

Un ensayo general para determinar la contribución de SRBI a eflujo de colesterol usa la misma propuesta que se describió anteriormente. Las estirpes celulares que sirven como donadores de colesterol se tratan de manera que carezcan de SRBI o expresen altos niveles del receptor. En el protocolo general las células COS-7 usadas en el momento presente se transfectan de manera transitoria cuando SRBI. Estas células se marcan previamente con colesterol ³H y después se exponen al suero de ensayo durante periodos apropiados de tiempo. Después de este periodo se retira el medio y se realiza una determinación de la cantidad de colesterol celular radiomarcado que se ha liberado. El eflujo de colesterol de células negativas de SR-BI, de control, se sustrae del observado con células que expresan SR-BI. La diferencia obtenida para este cálculo refleja la contribución de SR-BI a eflujo de colesterol. Un sistema de células alternativo que se puede usar para determinar el eflujo mediado por SR-BI es la célula de hepatoma de rata Fu5AH. Estas células expresan niveles muy altos de SR-BI y el eflujo de colesterol radiomarcado de Fu5AH es una medida muy confiable de la contribución de SR-BI al procedimiento de eflujo.

Los resultados se muestran en la Figura 16 y demuestran que el plasma tratado con los diversos disolventes estimulaba el eflujo de colesterol 20 a 25 veces más eficazmente que el plasma no tratado o simulado tratado, tomado de la misma mezcla de plasma de partida. Este efecto se observó en células ABCA1, que poseen una ruta metabólica que se cree que es representativa de egreso de colesterol de las paredes arteriales, pero no en células COS+ o FU5AH que se cree que son representativas de la ruta SRB1 en el hígado. Un ensayo adicional de sevoflurano: n-butanol de tres muestras de plasma diferentes obtenidas de diferentes individuos produjo resultados similares (Figura 16, serie de histogramas). Por creación de una partícula de HDL modificada, la presente invención afecta de manera positiva por lo tanto a la eficacia de las rutas SRB1 y ABCA1. La presente invención también incluye la modificación de las rutas SRB1 y ABCA1 por modificación de la relación relativa de fosfolípido a Apo A-1 en partículas de HDL por los procedimientos de deslipidación descritos anteriormente.

Ejemplo 7

Análisis de tratamiento de disolvente en niveles de partículas de pre B-2 HDL y pre B-1 HDL asociadas a Apo A-1.

Los efectos individuales de sevoflurano: n-butanol y DIPE: n-butanol (95:5) en subespecies de HDL que contienen Apo A-1 se examinaron usando geles PAGE naturales al 3-16%, seguido por análisis de inmunotransferencia e imagen. Las técnicas empleadas se describen en Asztalos et al., *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; 15: 1.419-1.423, 1.995 y Asztalos et al., *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; 17: 1.885-1.893, 1.997.

El lado izquierdo de las Figuras 17 y 18 muestra cada uno subespecies de HDL que contienen Apo A-1, es decir partículas pre β -2, pre β -1, α y pre- α en plasma lipémico normal, mientras el panel derecho de cada figura muestra plasma normal tratado con sevoflurano:n-butanol y DIPE:n-butanol (95:5).

5 La Figura 17 demuestra que el plasma tratado con sevoflurano:n-butanol mostró un incremento en las subespecies de HDL pre β -2, pre β -1, que contienen Apo A-1 y una disminución en las subespecies de HDL α . Se observó un patrón similar después de tratamiento con DIPE:n-butanol (Figura 18). Estos resultados demuestran que estos tratamientos de disolvente de plasma aumentaron las subespecies de HDL pre β -2, pre β -1, que contienen Apo A-1, mejorando de ese modo su disponibilidad para aceptar nuevo colesterol y facilitar eflujo de colesterol celular.

10 Una comparación similar del plasma normal no tratado mostrado en el panel izquierdo de las Figuras 17 y 18 y otra muestra de plasma no tratado con niveles de colesterol ligeramente elevados produjo un patrón similar (datos no mostrados) con la mayor parte de las especies de HDL inmunorreactivas que aparecen en la forma α HDL con densidad relativamente minoritaria asociada a partículas de HDL prep-2 y pre β -1. Estos resultados proporcionan un control metodológico interno.

Ejemplo 8

15 Administración de derivados de HDL a un paciente con colesterol elevado y arteriopatía coronaria.

Un paciente masculino de 51 años presenta síndrome coronario agudo y se determina que tiene aterosclerosis por angiografía. Se retira una unidad de sangre a la semana del paciente. Se recupera el plasma y se trata con el método in vitro de la presente invención para producir derivados de HDL que son partículas con contenido reducido en colesterol mientras se devuelven al paciente los glóbulos rojos. Estas partículas de HDL con contenido reducido en colesterol en el plasma tratado se administran al paciente por vía intravascular en intervalos semanales durante 5-10 semanas. Otro ensayo de angiografía después de la terminación del tratamiento muestra cantidades menores de placa aterogénica en los vasos coronarios comparado con el primer ensayo de angiografía.

Ejemplo 9

25 Administración de derivados de HDL junto con atorvastatina y ezetimibe a un paciente con colesterol elevado y arteriopatía coronaria.

Una mujer de 58 años presenta síndrome coronario agudo y se determina que tiene aterosclerosis por angiografía. Se retira una unidad de sangre a la semana del paciente. Se recupera el plasma y se trata con el método in vitro de la presente invención para producir derivados de HDL que son partículas con contenido reducido en colesterol mientras se devuelven al paciente los glóbulos rojos. Estas partículas de HDL con contenido reducido en colesterol en el plasma tratado se administran al paciente por vía intravascular en intervalos semanales durante 5-10 semanas. El paciente había recibido previamente 80 mg de atorvastatina a diario contiene miligramos de ezetimibe. Estos fármacos son continuados a diario junto con la administración semanal de partículas de HDL con contenido reducido en colesterol. Otro ensayo de angiografía después de la terminación del tratamiento muestra cantidades menores de placa aterogénica en los vasos coronarios comparado con el primer ensayo de angiografía.

35 Ejemplo 10

Administración de derivados de HDL junto con simvastatina y ezetimibe a un paciente obeso con colesterol elevado y arteriopatía coronaria.

Un paciente femenino obeso de 48 años presenta niveles elevados de LDL y colesterol y un resultado de ensayo angiográfico que indica aterosclerosis en tres arterias coronarias. Se retira una unidad de sangre a la semana del paciente. Se recupera el plasma y se trata con el método in vitro de la presente invención para producir derivados de HDL que son partículas con contenido reducido en colesterol mientras se devuelven al paciente los glóbulos rojos. Estas partículas de HDL con contenido reducido en colesterol se combinan con el plasma tratado y se administran al paciente por vía intravascular en intervalos semanales durante 5-10 semanas. El paciente había recibido previamente 80 mg de simvastatina a diario con 10 mg de ezetimibe. Estos fármacos se continuaron a diario junto con la administración semanal de partículas de HDL con contenido reducido en colesterol. Se puso al paciente en un programa de ejercicio moderado.

El nuevo trabajo de la sangre indica una reducción en el colesterol circulante, una reducción en LDL y un aumento en HDL circulante. El paciente pierde 6,8 kg (15 libras) durante el periodo de cinco meses. Un nuevo procedimiento angiográfico muestra cantidades menores de placa aterogénica en los vasos coronarios comparado con el primer procedimiento angiográfico.

Ejemplo 11

Administración de derivados de HDL a un paciente diabético con colesterol elevado y arteriopatía coronaria.

Un paciente femenino diabético de 44 años presenta niveles elevados de LDL y colesterol y un resultado de ensayo

angiográfico que indica aterosclerosis en dos arterias coronarias. Se retira una unidad de sangre a la semana del paciente. Se recupera el plasma y se trata con el método in vitro de la presente invención para producir derivados de HDL que son partículas con contenido reducido en colesterol mientras se devuelven al paciente los glóbulos rojos. Estas partículas de HDL con contenido reducido en colesterol se combinan con el plasma tratado y se administran al paciente por vía intravascular en intervalos semanales durante 5-10 semanas. El paciente había recibido previamente inyecciones de insulina a diario. Estas inyecciones se continuaron a diario junto con la administración semanal de partículas de HDL con contenido reducido en colesterol.

El nuevo trabajo de la sangre indica una reducción en el colesterol circulante, una reducción en LDL y un aumento en HDL circulante. Un nuevo procedimiento angiográfico muestra cantidades menores de placa aterogénica en los vasos coronarios comparado con el primer procedimiento angiográfico.

Ejemplo 12

Administración de derivados de HDL a un paciente con colesterol elevado y enfermedad vascular periférica que causa claudicación intermitente.

Un paciente masculino de 66 años presenta niveles elevados de LDL y colesterol e indica dolor en la extremidad inferior derecha. Un ensayo angiográfico que indica aterosclerosis en las arterias poplítea derecha y tibial posterior, conduce a un diagnóstico de claudicación intermitente. Se retira una unidad de sangre a la semana del paciente. Se recupera el plasma y se trata con el método in vitro de la presente invención para producir derivados de HDL que son partículas con contenido reducido en colesterol mientras se devuelven al paciente los glóbulos rojos. Estas partículas de HDL con contenido reducido en colesterol se combinan con el plasma tratado y se administran al paciente por vía intravascular en intervalos semanales durante 5-10 semanas.

El nuevo trabajo de la sangre indica una reducción en el colesterol circulante, una reducción en LDL y un aumento en HDL circulante. Un nuevo procedimiento angiográfico muestra cantidades menores de placa aterogénica en las arterias poplítea derecha y tibial posterior, comparado con el primer procedimiento angiográfico. El paciente indica niveles disminuidos de dolor de la extremidad inferior derecha.

Los términos y las expresiones que se han empleado en la presente memoria se usan como términos de prescripción y no de limitación, y no hay intención, en el uso de tales términos y expresiones, de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas. Se debería entender que lo anterior se refiere sólo a realizaciones preferidas de la presente invención y que se pueden realizar numerosas modificaciones o alteraciones de la misma sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención como se define en las siguientes reivindicaciones.

La presente invención se caracteriza además por los siguientes artículos:

1. Un derivado de partícula de al menos una forma de lipoproteína de alta densidad que comprende apolipoproteína A-1 y fosfolípidos en el que el derivado de la partícula se forma por exposición de una mezcla de la lipoproteína de alta densidad y lipoproteína de baja densidad a un agente de eliminación de lípidos en el que la exposición no modifica sustancialmente la lipoproteína de baja densidad.

2. El derivado de partícula del artículo 1, en el que la exposición se consigue por un procedimiento de exposición que comprende las etapas de:

a. mezclar el agente eliminador de lípidos con una mezcla de la lipoproteína de alta densidad y la lipoproteína de baja densidad para crear una mezcla del derivado de partículas, lípidos, el agente de eliminación de lípidos y la lipoproteína de baja densidad;

b. separar el agente eliminador de lípidos y los lípidos de la mezcla del derivado de partículas, los lípidos, el agente de eliminación de lípido y la lipoproteína de baja densidad y

c. recoger el derivado de partículas y la lipoproteína de baja densidad.

3. El derivado de partícula del artículo 2, que comprende además las etapas de:

a. conectar un paciente a un dispositivo para extracción de sangre;

b. extraer sangre conteniendo células sanguíneas del paciente;

c. separar células sanguíneas de la sangre para proporcionar una fracción en la que la fracción contiene una mezcla de la lipoproteína de alta densidad y la lipoproteína de baja densidad y

d. mezclar el agente eliminador de lípido con la fracción.

4. Un derivado de partícula de al menos una forma de lipoproteína de alta densidad que comprende apolipoproteína A-1 y fosfolípidos, en el que el derivado de partícula se forma por eliminación primero de lipoproteína de baja

densidad de una mezcla de la lipoproteína de alta densidad y la lipoproteína de baja densidad y exponiendo con posterioridad la mezcla a un agente eliminador de lípidos.

5. El derivado de partículas del artículo 4, en el que la exposición se consigue por un procedimiento de exposición que comprende las etapas de:

5 a. separar la lipoproteína de baja densidad de una mezcla de la lipoproteína de alta densidad y la lipoproteína de baja densidad;

b. mezclar el agente eliminador de lípidos con la lipoproteína de alta densidad para crear una mezcla del derivado de partículas, lípidos y el agente eliminador de lípido;

10 c. separar el agente eliminador de lípido y los lípidos de la mezcla del derivado de partículas, los lípidos y el agente eliminador de lípido y

d. recoger el derivado de partículas.

6. El derivado de partículas del artículo 5, que comprende además las etapas de:

a. conectar un paciente a un dispositivo para extracción de sangre;

b. extracción de sangre conteniendo células sanguíneas del paciente y

15 c. separar células sanguíneas de la sangre para proporcionar una fracción en la que la fracción contiene una mezcla de lipoproteína de alta densidad y la lipoproteína de baja densidad.

7. Un derivado de partículas de una forma pre-beta de lipoproteína de alta densidad que comprende una envoltura de proteína y una bicapa de lípido sustancialmente desprovista de colesterol en la que el derivado de partículas es de forma discoidal y se forma eliminando primero lipoproteína de baja densidad de una mezcla de la lipoproteína de alta densidad y la lipoproteína de baja densidad y exponiendo con posterioridad la mezcla a un agente eliminador de lípidos.

20 8. El derivado de partícula del artículo 7, en el que la exposición se consigue por un procedimiento de exposición que comprende las etapas de:

25 a. mezclar el agente eliminador de lípidos con una mezcla de la lipoproteína de alta densidad y la lipoproteína de baja densidad para crear una mezcla del derivado de partículas, lípidos, el agente de eliminación de lípidos y la lipoproteína de baja densidad;

b. separar el agente eliminador de lípidos y los lípidos de la mezcla del derivado de partículas, los lípidos, el agente de eliminación de lípido y la lipoproteína de baja densidad y

c. recoger el derivado de partículas y la lipoproteína de baja densidad.

30 9. El derivado de partículas del artículo 8, que comprende además las etapas de:

a. conectar un paciente a un dispositivo para extracción de sangre;

b. extraer sangre conteniendo células sanguíneas del paciente,

c. separar las células sanguíneas de la sangre para proporcionar una fracción en la que la fracción contiene una mezcla de la lipoproteína de alta densidad y la lipoproteína de baja densidad y

35 d. mezclar el agente eliminador de lípido con la fracción.

10. Un derivado de partículas de una forma pre-beta de lipoproteína de alta densidad que comprende una envoltura de proteína y una bicapa de lípido sustancialmente desprovista de colesterol en la que dicho derivado de partículas es de forma discoidal y se forma exponiendo una mezcla de la lipoproteína de alta densidad y lipoproteína de baja densidad a un agente de eliminación de lípidos en el que la exposición no modifica sustancialmente la lipoproteína de baja densidad.

40 11. Un método para preparar un derivado de partículas de al menos una forma de lipoproteína de alta densidad en el que el derivado de partículas comprende una envoltura de proteína y una bicapa de lípido que comprende las etapas de:

a. conectar un paciente a un dispositivo para extracción de sangre;

45 b. extraer sangre que contiene células sanguíneas del paciente;

c. separar las células sanguíneas de la sangre para proporcionar una fracción de sangre que contiene lipoproteína

de alta densidad y lipoproteína de baja densidad;

d. separar la lipoproteína de baja densidad de la fracción de sangre;

5 e. mezclar la fracción de sangre con un agente eliminador de lípidos que elimina lípidos asociados a la bicapa de lípidos de la lipoproteína de alta densidad para proporcionar una mezcla de lípido, el agente eliminador de lípido y el derivado de partículas;

f. separar el derivado de partículas del lípido y el agente eliminador de lípido y

g. suministrar el derivado de partículas al paciente.

10 12. Un método para preparar un derivado de partículas de al menos una forma de lipoproteína de alta densidad en el que el derivado de partículas comprende una envoltura de proteína y una bicapa de lípido que comprende las etapas de:

a. conectar un paciente a un dispositivo para extracción de sangre;

b. extraer sangre que contiene células sanguíneas del paciente;

c. separar las células sanguíneas de la sangre para proporcionar una fracción de sangre que contiene lipoproteína de alta densidad y lipoproteína de baja densidad;

15 d. mezclar la fracción de sangre con un agente eliminador de lípidos que elimina lípidos asociados a una bicapa de lípidos de la lipoproteína de alta densidad sin modificar sustancialmente la lipoproteína de baja densidad para proporcionar una mezcla de lípido, el agente eliminador de lípido, el derivado de partículas y la lipoproteína de baja densidad;

e. separar el derivado de partículas y la lipoproteína de baja densidad del lípido y el agente eliminador de lípido y

20 f. suministrar el derivado de partículas y la lipoproteína de baja densidad al paciente.

13. El método según el artículo 12, en el que las etapas c a e tienen lugar lejos del individuo.

14. Un método para modificar al menos una forma de lipoproteína de alta densidad contenida en plasma, suero u otra fracción de sangre adecuada de un paciente, que comprende las etapas de:

25 a. obtener una fracción de sangre que contenga lipoproteína de densidad alta y lipoproteína de baja densidad del paciente;

b. separar la lipoproteína de baja densidad de la fracción de sangre;

c. mezclar la fracción de sangre con un agente eliminador de lípidos que elimine lípidos de la lipoproteína de alta densidad para proporcionar una mezcla de lípido, agente eliminador de lípido y lipoproteína de alta densidad modificada;

30 d. separar la lipoproteína de alta densidad modificada del lípido y el agente eliminador de lípido y

e. suministrar la lipoproteína de alta densidad modificada al paciente.

15. Un método para modificar al menos una forma de lipoproteína de alta densidad contenida en plasma, suero u otra fracción de la sangre adecuada de un paciente, que comprende las etapas de:

35 a. obtener una fracción de la sangre que contenga lipoproteína de densidad alta y lipoproteína de baja densidad del paciente;

b. mezclar la fracción de la sangre con un agente eliminador de lípidos que elimine lípidos asociados a la lipoproteína de alta densidad sin modificar sustancialmente la lipoproteína de baja densidad para proporcionar una mezcla de lípido, el agente eliminador de lípido, lipoproteína de alta densidad modificada y la lipoproteína de baja densidad;

40 c. separar la lipoproteína de alta densidad modificada y la lipoproteína de baja densidad del lípido y el agente eliminador de lípido y

d. suministrar la lipoproteína de alta densidad modificada y la lipoproteína de baja densidad al paciente.

45 16. Un método para modificar una distribución de proteínas en un fluido en el que la distribución de proteínas presenta un primer estado, teniendo el primer estado lipoproteínas de alta densidad alfa y lipoproteínas de alta densidad pre-beta, que comprende las etapas de: exponer el fluido a un agente eliminador de lípidos en el que la exposición modifica la distribución de proteínas del primer estado a un segundo estado, teniendo el segundo estado

- una concentración aumentada de lipoproteína de alta densidad pre-beta en relación al primer estado y eliminar el agente eliminador de lípidos del fluido biológico.
- 5 17. Un método para mejorar una ruta de ABCA1 de un paciente con una primera distribución de proteínas, teniendo la primera distribución de proteínas una concentración de lipoproteínas de alta densidad pre-beta en relación a proteína total, que comprende la etapa de modificar un fluido que contiene la primera distribución de proteínas por exposición del fluido a un agente eliminador de lípidos, en el que la modificación aumenta la concentración de lipoproteína de alta densidad pre-beta en relación a la proteína total e introducir el fluido en el paciente.
- 10 18. Un método para modificar una distribución de proteínas en un fluido en el que la distribución de proteínas presenta un primer estado, teniendo el primer estado más lipoproteína de alta densidad alfa que lipoproteína de alta densidad pre-beta, que comprende las etapas de:
- a. exponer el fluido a un agente eliminador de lípidos en el que la exposición modifica la distribución de proteínas del primer estado a un segundo estado, teniendo el segundo estado más lipoproteína de alta densidad pre-beta que lipoproteína de alta densidad alfa y
- b. eliminar el agente eliminador de lípidos del fluido biológico.
- 15 19. Un método para cambiar la reología de la sangre de un paciente con circulación sanguínea deficiente según el cual el plasma, suero u otra fracción de la sangre adecuada del paciente ha sido tratada por un método según se reivindica en el artículo 14 ó 15.
- 20 20. Un método para regresión de aterosclerosis en un paciente según lo cual el plasma, suero u otra fracción de la sangre adecuada del paciente se trata por un método según se reivindica en el artículo 14 ó 15.
- 20 21. Un estuche para realizar cualquiera de los métodos de los artículos 1 a 18 que comprende:
- a. un contenedor de fuente de lipoproteínas de alta densidad;
- b. un contenedor de fuente de agente de eliminación de lípidos;
- c. un mezclador que comprende al menos uno de un mezclador estático, un agitador vorticial o centrífuga;
- 25 d. un separador que comprende al menos uno de un absorbente, separador, centrífuga o columna de carbón vegetal;
- e. un contenedor de salida para almacenar un derivado de partículas de la lipoproteína de alta densidad y
- f. una pluralidad de tubos y una pluralidad de válvulas para controlar el flujo de lipoproteína de alta densidad del contenedor de la fuente de lipoproteína de alta densidad y agente eliminador de lípido del contenedor de la fuente de agente eliminador de lípido al mezclador, para controlar el flujo de la mezcla de agente eliminador de lípido, lípido y derivado al separador y para controlar el flujo del derivado de partícula al contenedor de salida.
- 30 22. Un estuche para realizar cualquiera de los métodos de los artículos 1 a 18 que comprende:
- a. un contenedor de fuente de lipoproteínas de alta densidad;
- b. un contenedor de fuente de agente de eliminación de lípidos;
- c. un mezclador que comprende al menos uno de un mezclador estático, un agitador vorticial o centrífuga;
- 35 d. un separador que comprende al menos uno de un absorbente, separador, centrífuga o columna de carbón vegetal;
- e. un contenedor de salida para almacenar lipoproteína de alta densidad modificada y
- f. una pluralidad de tubos y una pluralidad de válvulas para controlar el flujo de lipoproteína de alta densidad del contenedor de la fuente de lipoproteína de alta densidad y agente eliminador de lípido del contenedor de la fuente de agente eliminador de lípido al mezclador, para controlar el flujo de la mezcla de agente eliminador de lípido, lípido y lipoproteína de alta densidad modificada al separador y para controlar el flujo de lipoproteína de alta densidad modificada al contenedor de salida.
- 40 23. Un método para mejorar el eflujo de colesterol celular que comprende administración de una partícula de HDL modificada a un paciente.
- 45 24. El método del artículo 23, que comprende además administración de una estatina, un inhibidor de absorción de colesterol, un derivado de ácido fibríco, ácido nicotínico, una resina de unión de ácido biliar o una combinación de los mismos.

25. Una partícula que comprende una partícula de HDL modificada, en la que la partícula de HDL modificada presenta un complemento relativamente normal de Apo A-1 y fosfolípido y colesterol sustancialmente reducido.
26. Una partícula que comprende una partícula de HDL modificada, en la que la partícula de HDL modificada presenta un complemento relativamente normal de Apo A-1 y colesterol y fosfolípido sustancialmente reducidos.
- 5 27. El método o el estuche según cualquiera de los artículos 1 a 21, en el que el agente eliminador de lípido es un éter o una combinación de un alcohol y un éter.
28. El método o el estuche según cualquiera de los artículos 1 a 21, en el que el agente eliminador de lípido es al menos uno de un éter, diisopropil éter, sevoflurano, una combinación de un éter y un alcohol o una combinación de sevoflurano y un alcohol.
- 10 29. El método o el estuche según el artículo 28, en el que el éter es diisopropil éter.
30. El método o el estuche según el artículo 29, en el que el alcohol es n-butanol.
31. El método o el estuche según cualquiera de los artículos 1 a 21, en el que el agente eliminador de lípidos es una mezcla de sevoflurano y n-butanol.
- 15 32. El derivado de partículas según cualquiera de los artículos precedentes, en el que el derivado de partículas presenta un contenido en colesterol menor que la lipoproteína de alta densidad.
33. El derivado de partículas según cualquiera de los artículos precedentes, en el que el derivado de partículas presenta propiedades físicas, químicas o biológicas sustancialmente similares a al menos uno de: lipoproteína de alta densidad pre-beta₁, lipoproteína de alta densidad pre-beta₂ o lipoproteína de alta densidad pre-beta₃, formada de manera natural.
- 20 34. Un fluido biológico capaz de mejorar una ruta de ABCA1 de un paciente, en el que dicho fluido biológico se prepara por modificación de un fluido que tiene una primera concentración de lipoproteína de alta densidad pre-beta en relación a proteína total, en el que la modificación aumenta la concentración de lipoproteína de alta densidad pre-beta en relación a proteína total.
- 25 35. Un fluido biológico que comprende una distribución de proteínas modificada, en el que el fluido biológico presentó un primer estado, teniendo el primer estado lipoproteínas de alta densidad alfa y lipoproteínas de alta densidad pre-beta y en el que el fluido biológico presenta un segundo estado después de ser expuesto a un agente de eliminación de lípido, teniendo el segundo estado una concentración aumentada de lipoproteína de alta densidad pre-beta en relación al primer estado.
- 30 36. Uso de un derivado de partículas que comprende una partícula de HDL modificada, en el que la partícula de HDL modificada presenta un complemento relativamente normal de Apo A-1 y fosfolípido y colesterol sustancialmente reducido, en la preparación de un medicamento para administración a un paciente para mejorar el eflujo de colesterol celular en el paciente.
37. El uso según el artículo 36, en el que el paciente presenta aterosclerosis.
- 35 38. Uso del derivado de partícula según cualquiera de los artículos precedentes, en la preparación de un medicamento para administración a un paciente para mejorar el eflujo de colesterol celular en el paciente.
39. El uso según el artículo 38, que comprende además administración de una estatina, un inhibidor de absorción de colesterol, un derivado de ácido fíbrico, ácido nicotínico, una resina de unión de ácido biliar o una combinación de los mismos.
- 40 40. Uso del fluido biológico según el artículo 34 ó 35, en la preparación de un medicamento para administración a un paciente para mejorar el eflujo de colesterol celular en el paciente.
41. El uso según el artículo 40, en el que el paciente presenta aterosclerosis.
42. El fluido biológico según cualquiera de los artículos precedentes, en el que el fluido biológico es plasma.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para modificar una distribución de proteínas en un fluido, en el que la distribución de proteínas presenta un primer estado, teniendo el primer estado lipoproteínas de densidad alta alfa y lipoproteínas de densidad alta pre-beta, que comprende las etapas de:
- 5 exponer el fluido a un disolvente en el que la exposición modifica la distribución de proteínas del primer estado a un segundo estado, teniendo el segundo estado una concentración aumentada de lipoproteínas de densidad alta pre-beta en relación al primer estado y
retirar el disolvente del fluido,
en el que el disolvente comprende sevoflurano, trifluoroetano o isoflurano.
- 10 2. El método in vitro según la reivindicación 1, en el que el disolvente comprende al menos uno de un éter o un alcohol, en particular diisopropil éter o n-butanol.
3. El método in vitro según la reivindicación 1, en el que el disolvente es una mezcla de sevoflurano y n-butanol.
4. El método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la exposición del fluido al disolvente aumenta la concentración de lipoproteína de alta densidad pre-beta en relación a proteína total.
- 15 5. El método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la exposición del fluido al disolvente crea partículas de lipoproteína de alta densidad modificadas con contenido reducido en colesterol.
6. El método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fluido es sangre, plasma, suero u otra fracción de sangre adecuada.
- 20 7. El fluido que se puede obtener por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en la mejora de una ruta de ABCA1.
8. El fluido que se puede obtener por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en cambiar la reología de la sangre de un paciente con circulación sanguínea deficiente.
9. El fluido que se puede obtener por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en la regresión de aterosclerosis.
- 25 10. El fluido para uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el fluido se obtiene del mismo paciente o un paciente diferente.
11. El método in vitro según la reivindicación 2, en el que el éter es un éter que contiene C₄-C₈ o el alcohol es un alcohol que contiene C₄-C₈.
- 30 12. El método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 11, en el que la mezcla del fluido con un disolvente elimina lípidos asociados a las lipoproteínas de alta densidad sin modificar sustancialmente las lipoproteínas de densidad baja.

FIGURA 1

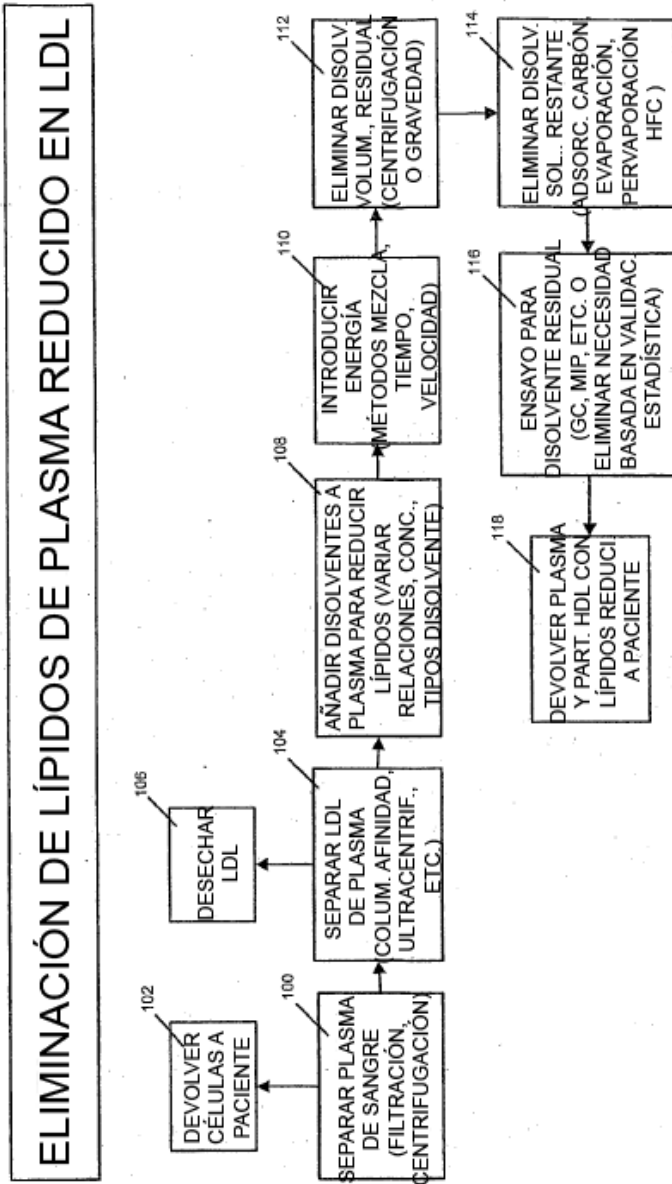


FIGURA 2

ELIMINACIÓN SELECTIVA DE LÍPIDOS DE PARTÍCULAS HDL EN PLASMA

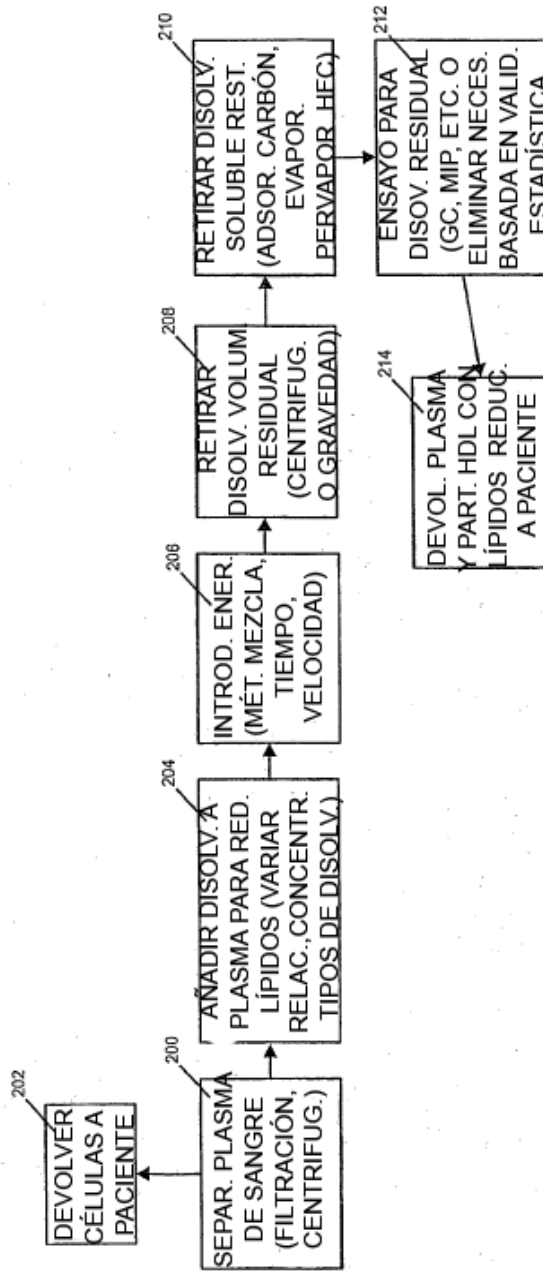


FIGURA 3

Perfil FPLC de Plasma Normal

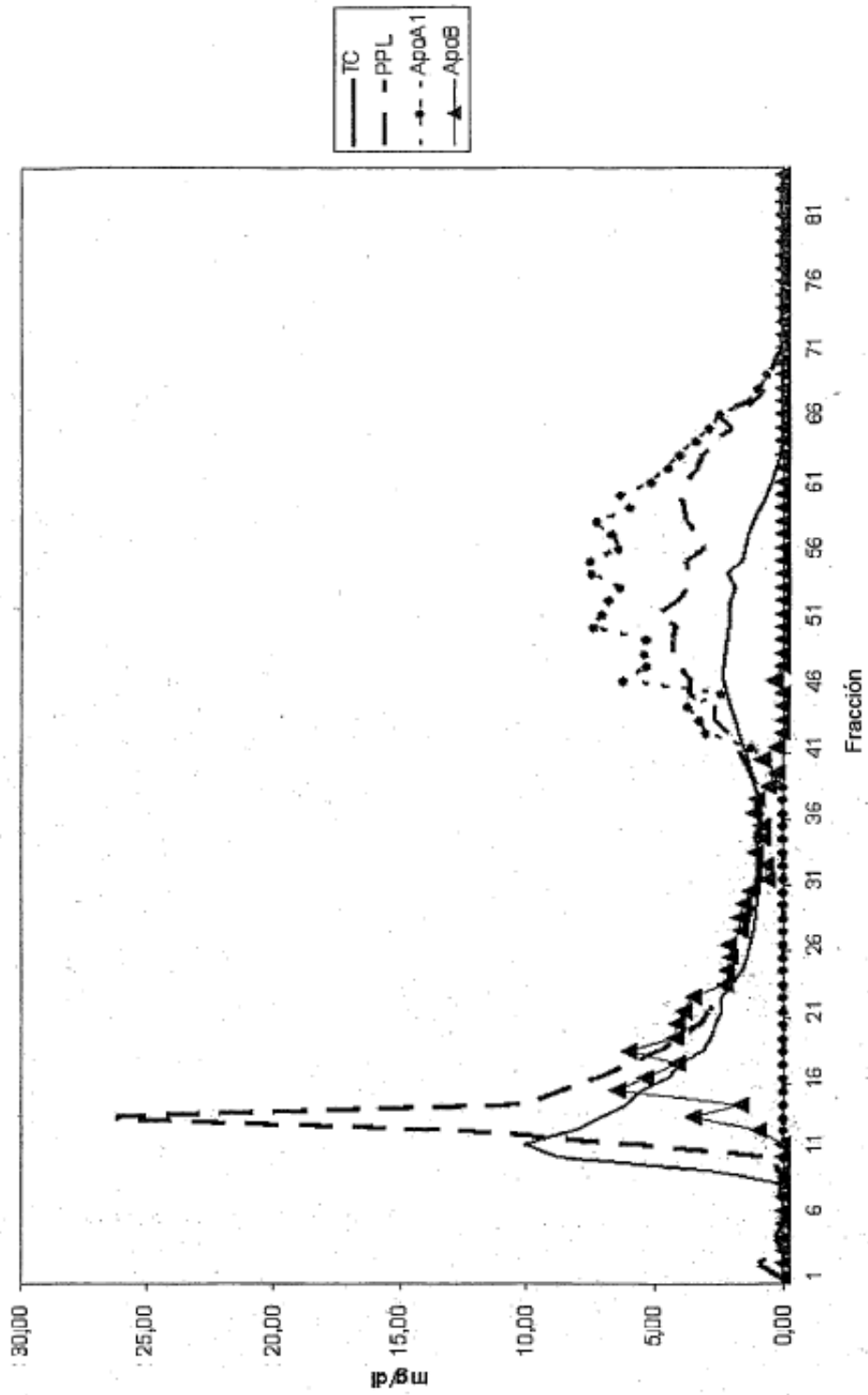


FIGURA 4

Perfil FPLC ApoA1 frente a Colesterol Total para Método de Deslipidación DIPE 100%
para Tratamiento de la Mezcla de Plasma Normal

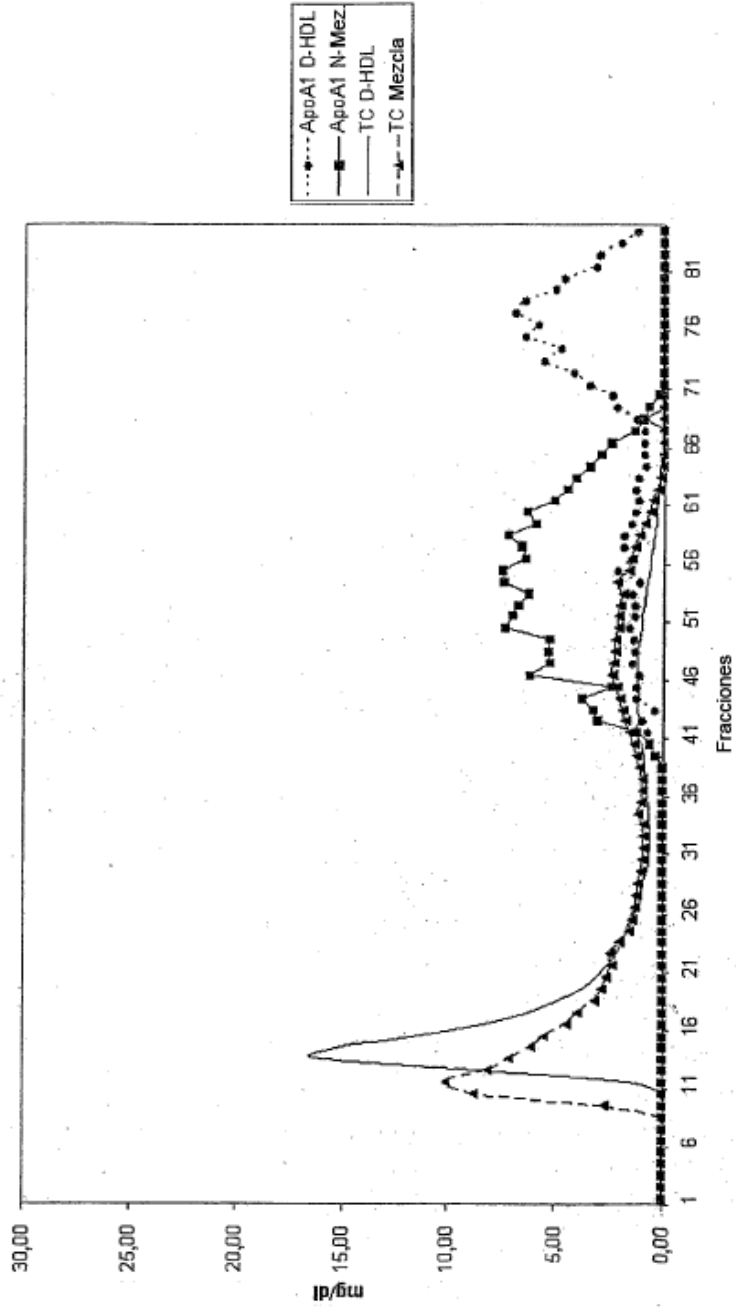


FIGURA 5

Perfil FPLC ApoA1 frente a Fosfolipido para Método de Deslipidación DIPE 100%
para Tratamiento de la Mezcla de Plasma Normal

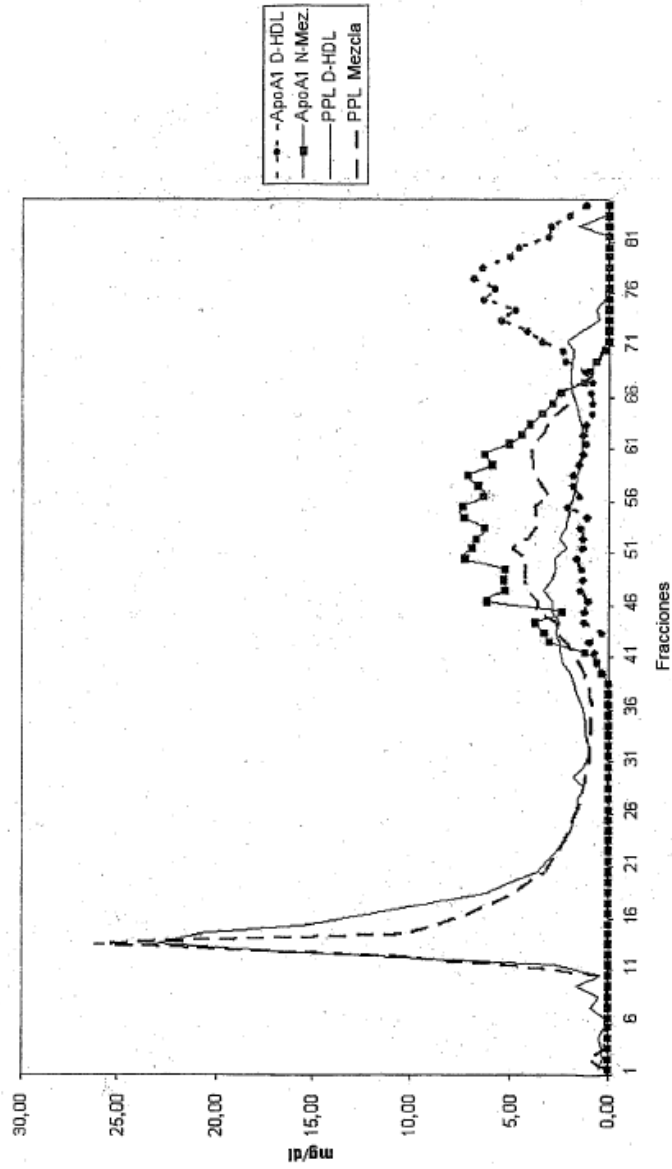


FIGURA 6

Perfil FPLC de ApoB frente a Fosfolípido para Método de Deslipidación de DIPE al 100%
para Tratamiento de la Mezcla de Plasma Normal

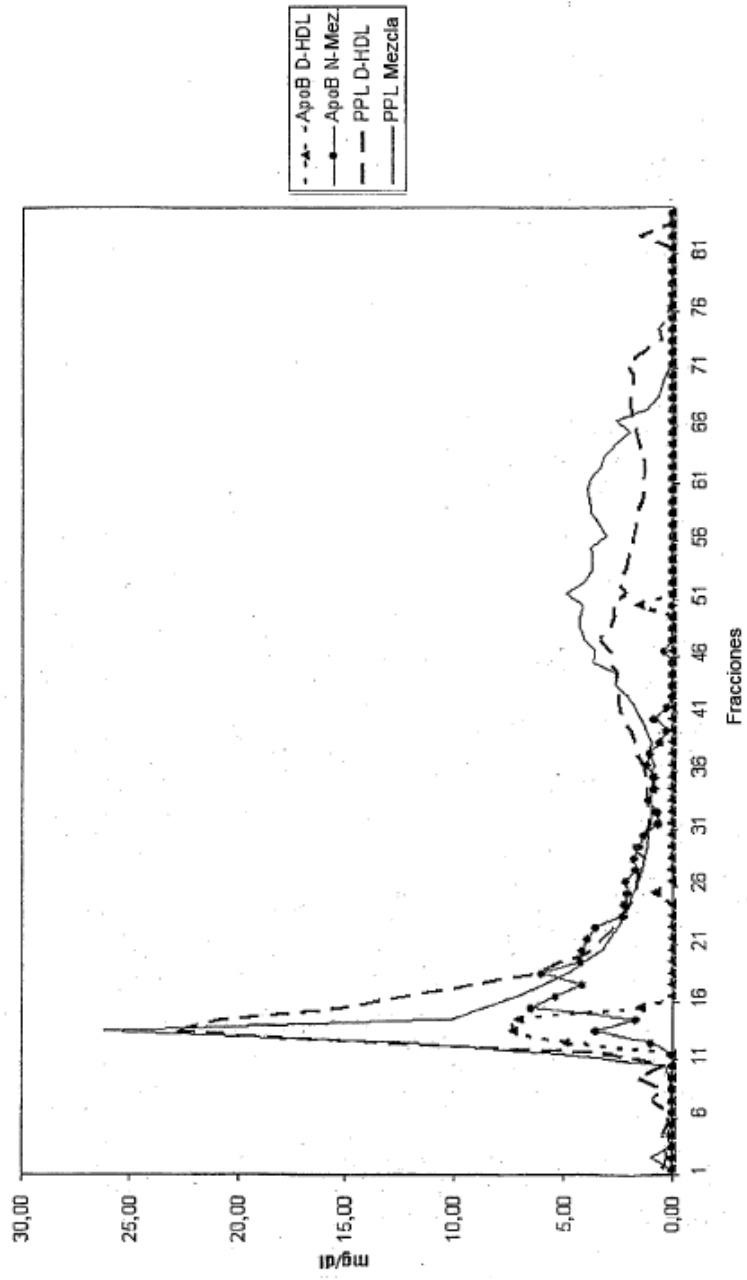


FIGURA 7

Perfil FPLC de ApoA1 frente a Colesterol Total para una Relación de Disolvente de Sevoflurano a n-butanol 95:5 Método de Deslipidación para Tratamiento de la Mezcla de Plasma Normal

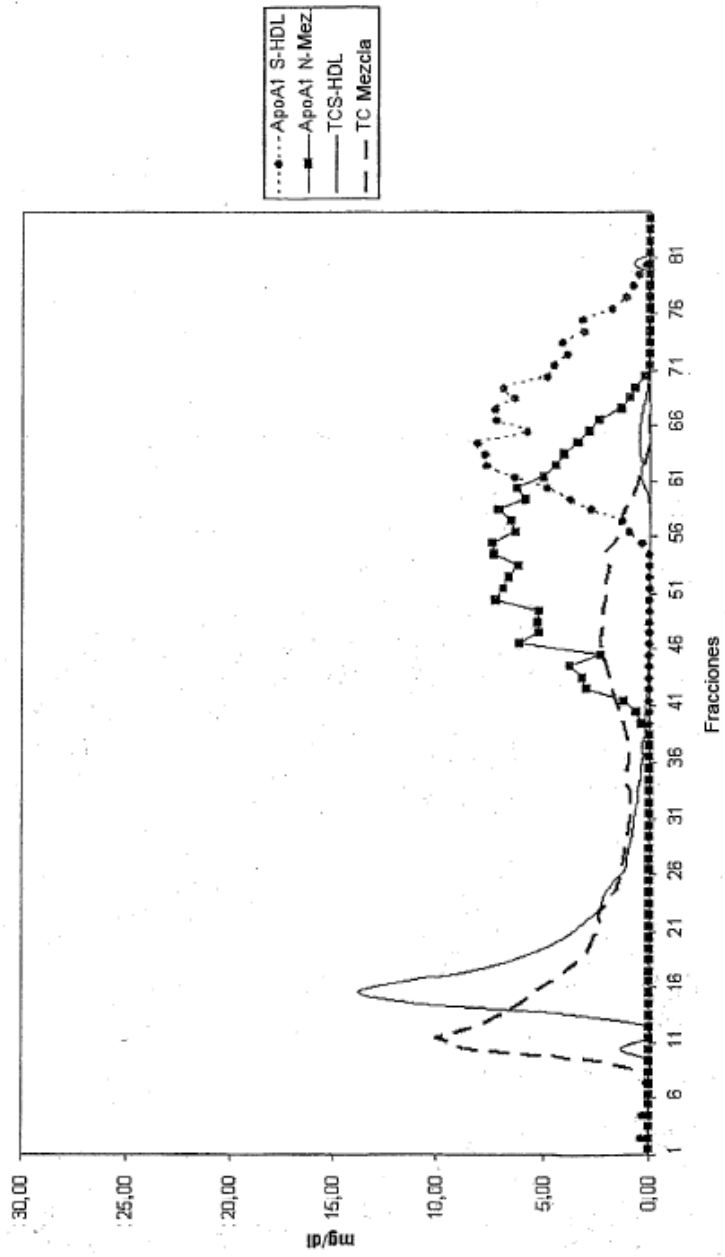


FIGURA 8

Perfil de FPLC de ApoA1 frente a Fosfolípido para una Relación de Disolvente de Sevoflurano a n-butanol 95:5
Método de Deslipidación para Tratamiento de la Mezcla de Plasma Normal

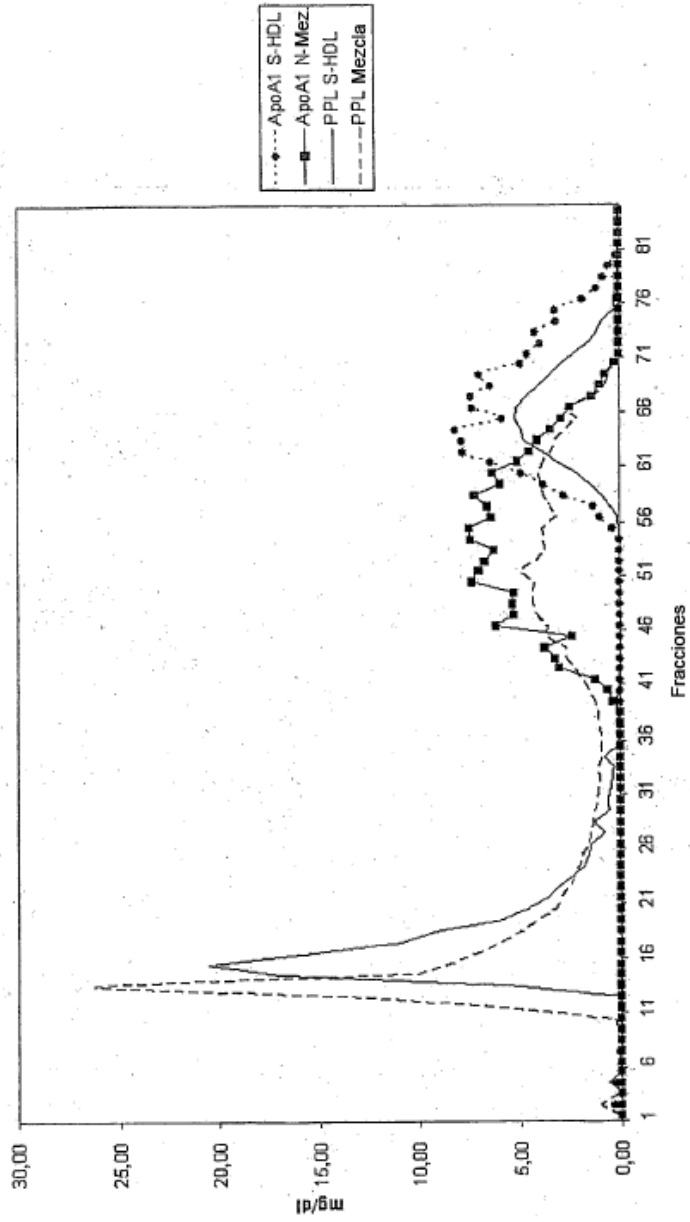


FIGURA 9

Perfil FPLC de ApoB frente a Fosfolípido para una Relación de Disolvente de Sevoflurano a n-butanol 95:5
Método de Deslipidación para Tratamiento de la Mezcla de Plasma Normal

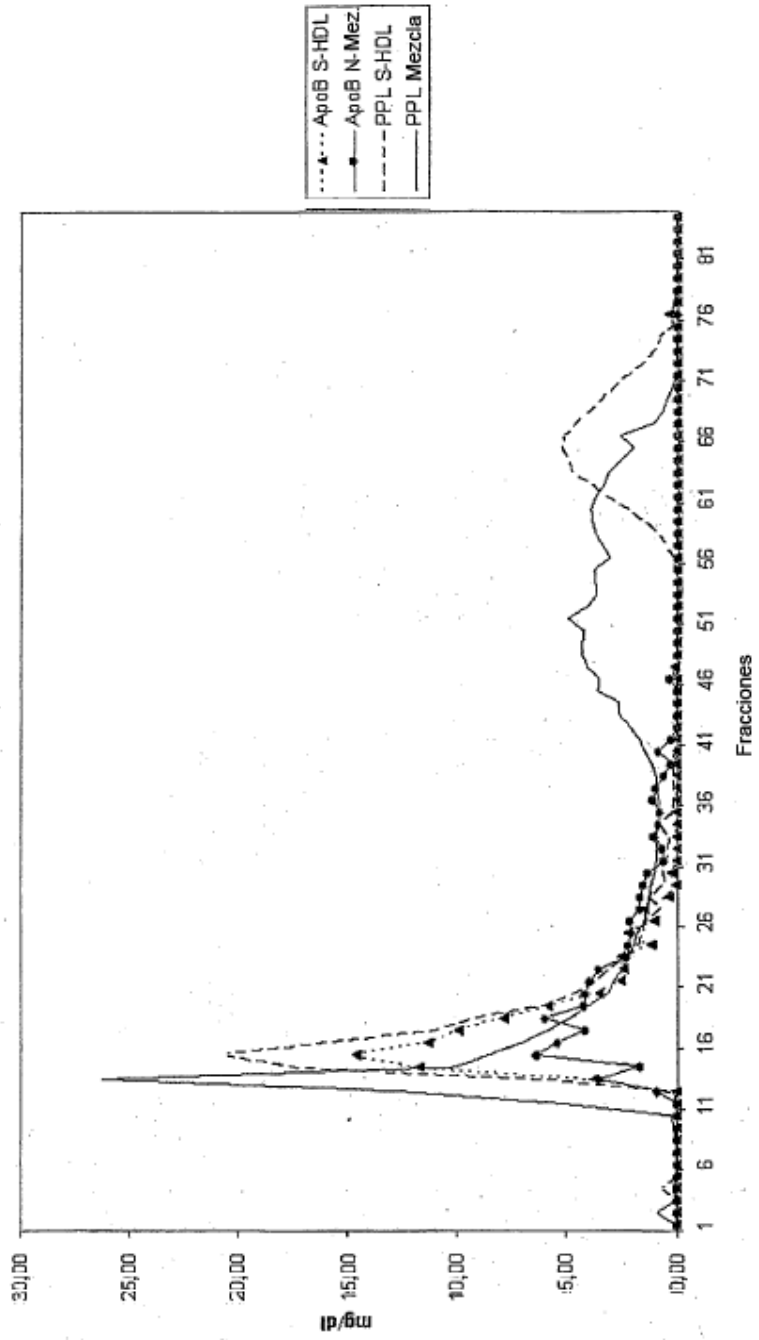


FIGURA 10

Efecto de Tratamiento de Disolvente sobre Parámetros Clínicos

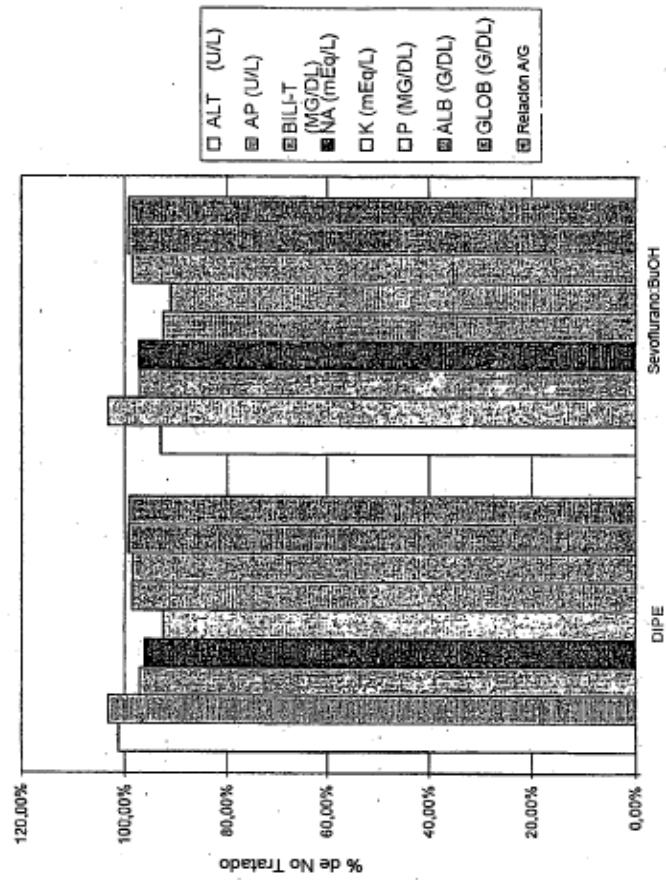


FIGURA 11
Perfil FPLC de Superose 6 de
Plasma Normal

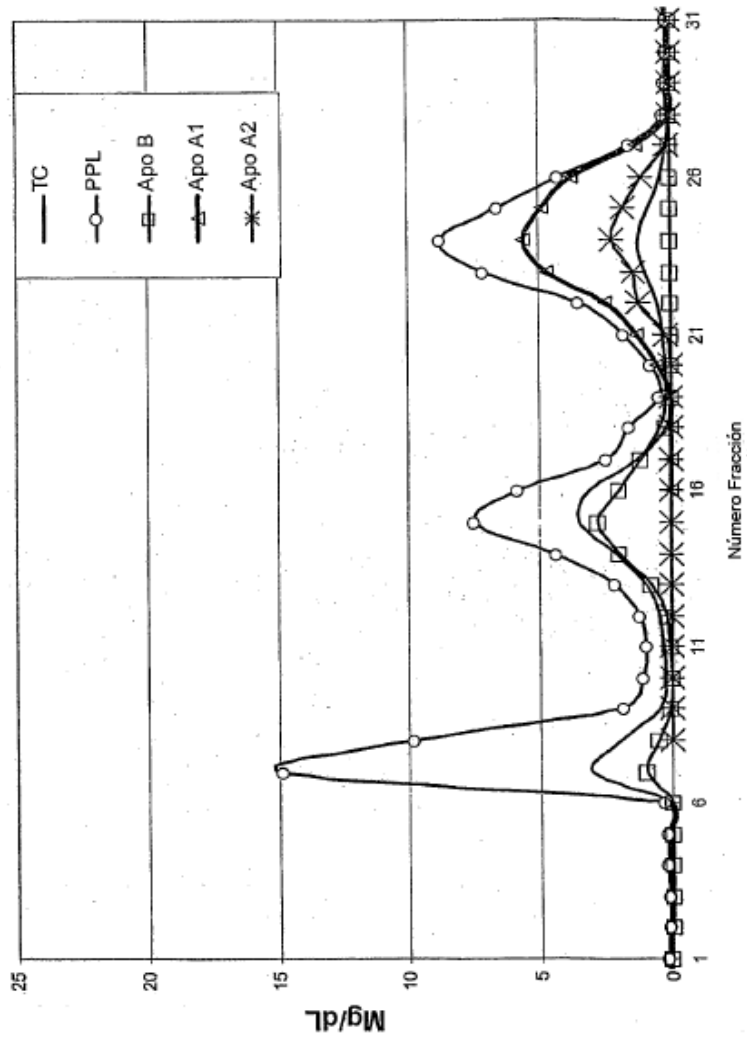


FIGURA 12
Perfil de FPLC Superose 6 de Plasma Normal
Tratado con DIPE al 100%

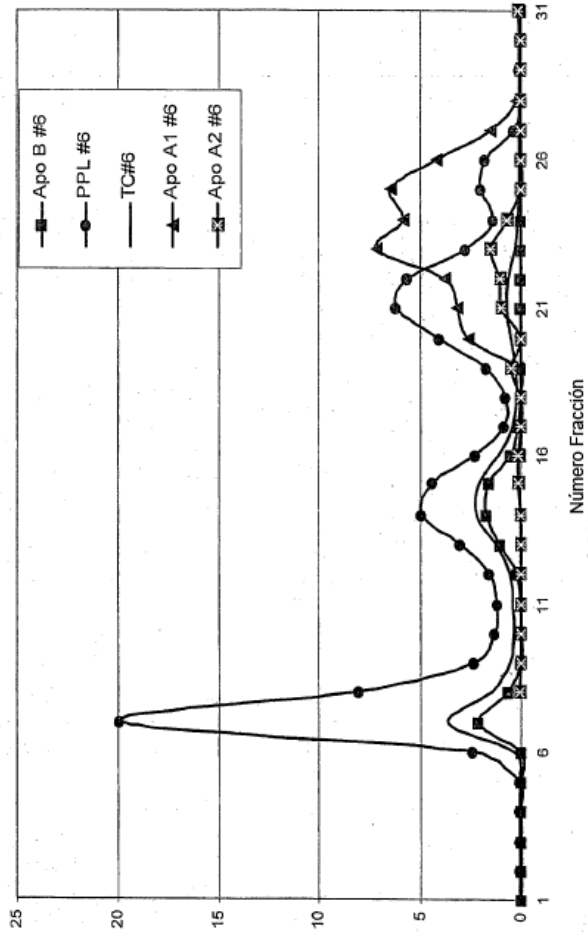


FIGURA 13
Perfil FPLC Superose 6 de Plasma Normal Tratado con una Relación de Disolvente de
Sevoflurano a n-Butanol 95:5

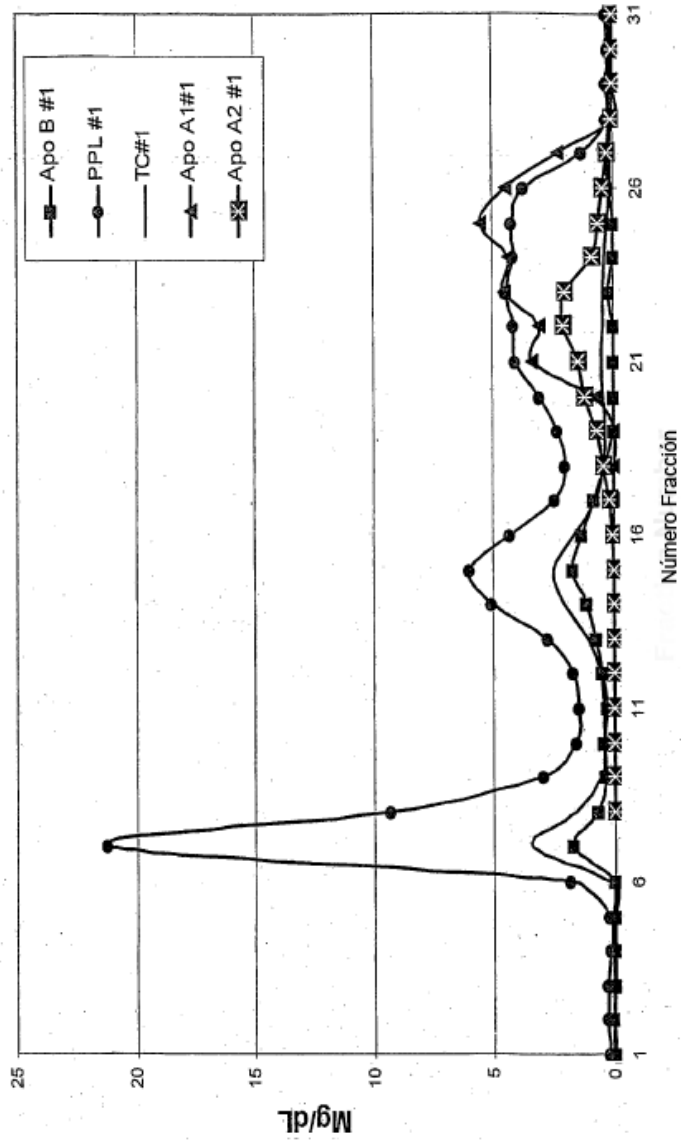


FIGURA 14
Perfil FPLC Superose 6 de Plasma Normal Tratado con una
Relación de Disolvente de DIPE a n-Butanol 75:25

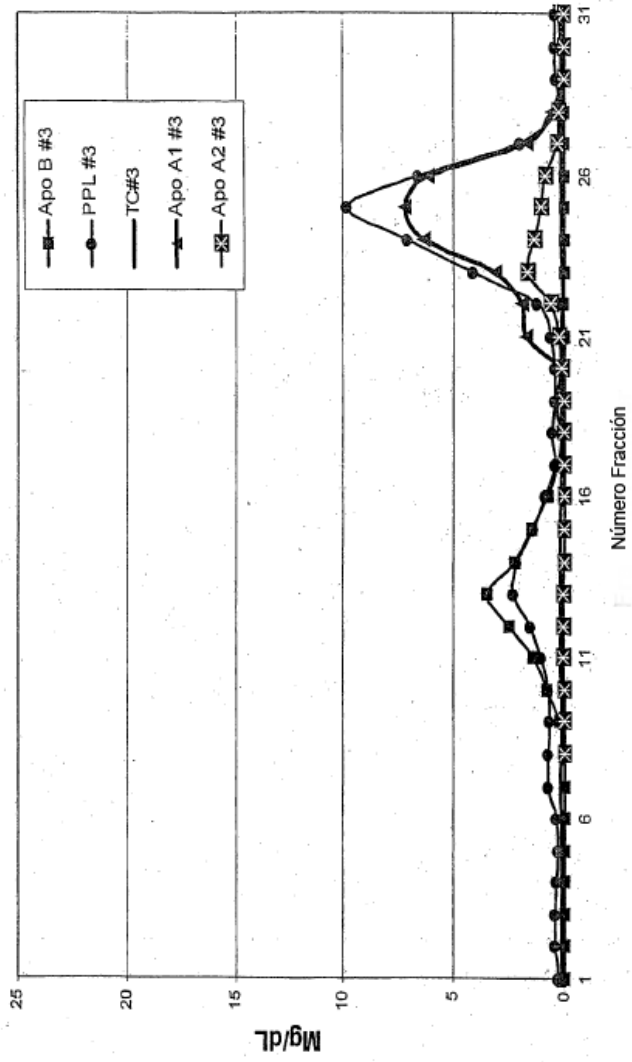


FIGURA 15
Perfil FPLC Superose 6 de Plasma Normal Tratado con una
Relación de Disolvente de DIPE a n-Butanol 95:5

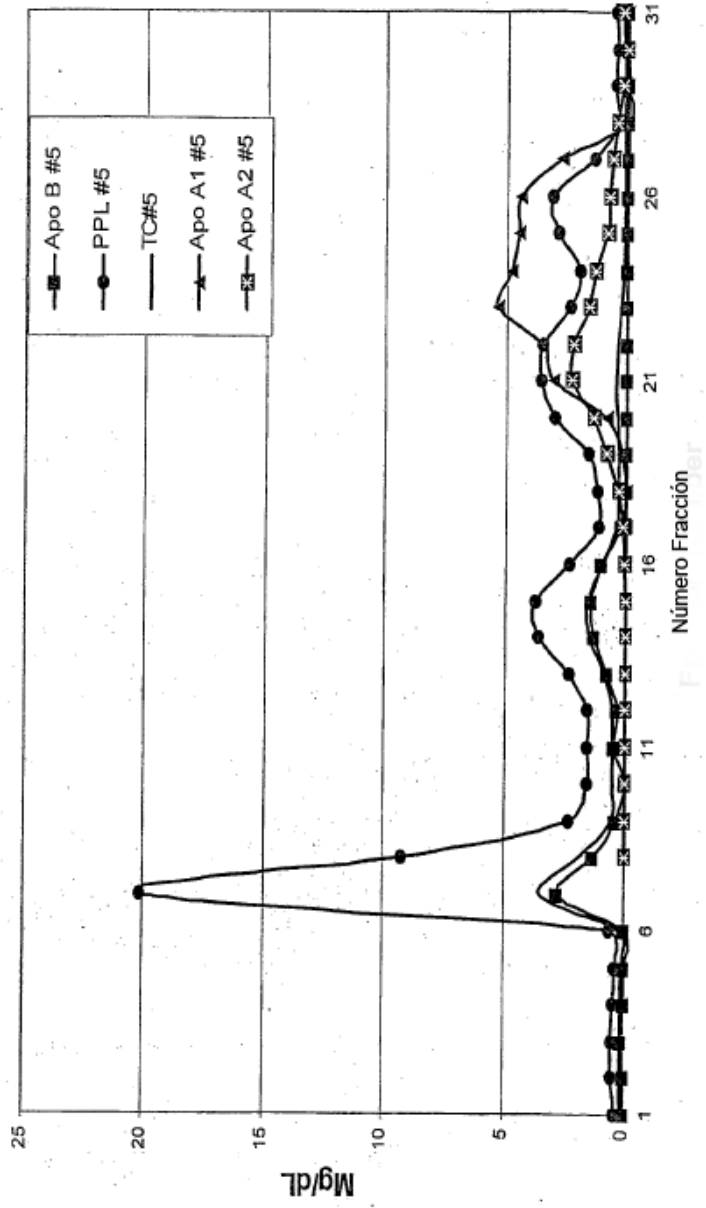


FIGURA 16
Eflujo de Colesterol de Plasma Normalizado para Control Interno

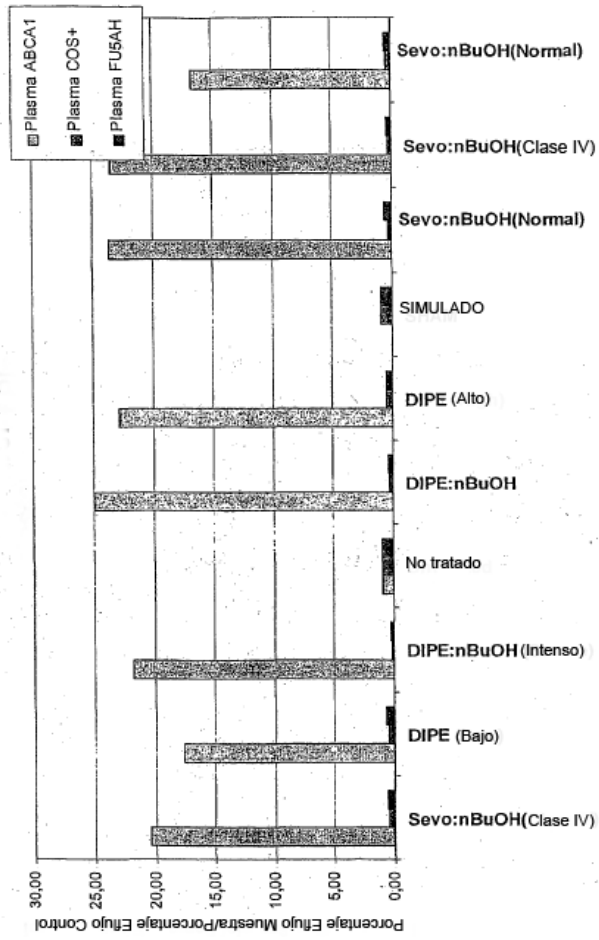


FIGURA 17

Subespecies HDL que contienen ApoA-1 determinadas por PAGE natural al 3-16%, análisis de inmunotransferencia e imagen.

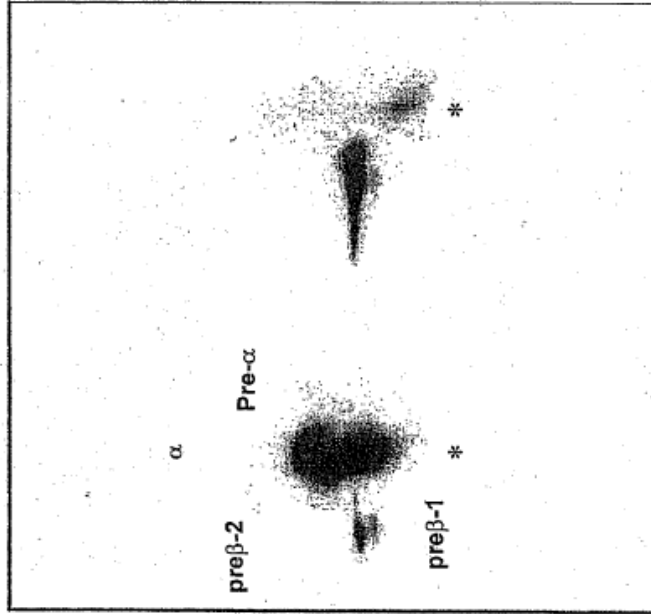


FIGURA 18

Subespecies HDL que contienen ApoA-1 determinadas por PAGE natural al 3-16%, análisis de inmunotransferencia e imagen

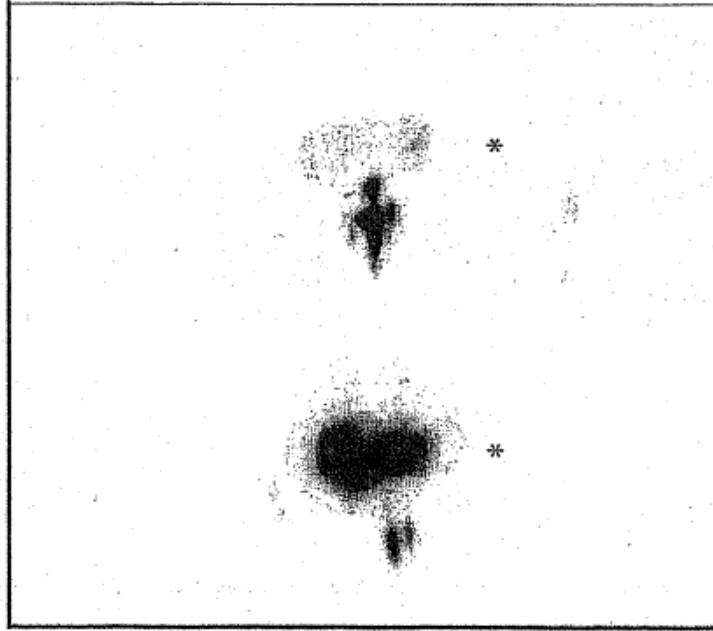
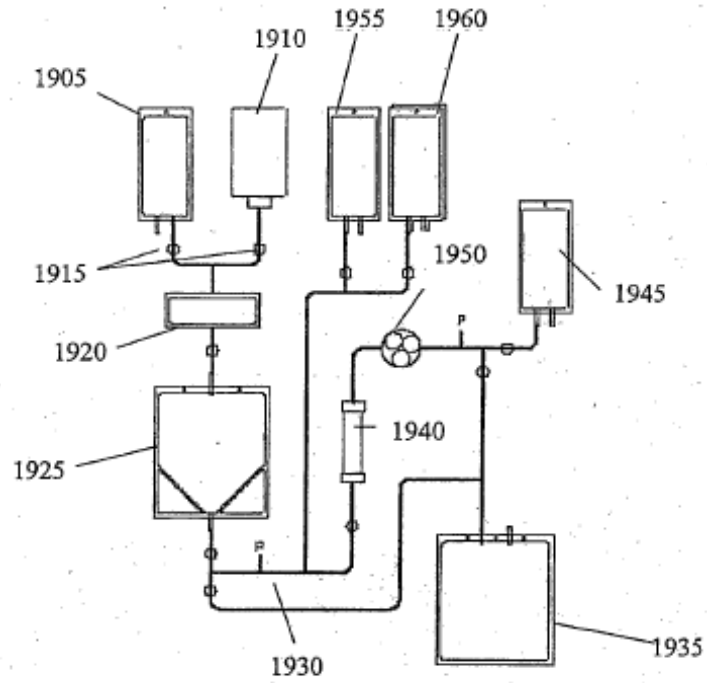
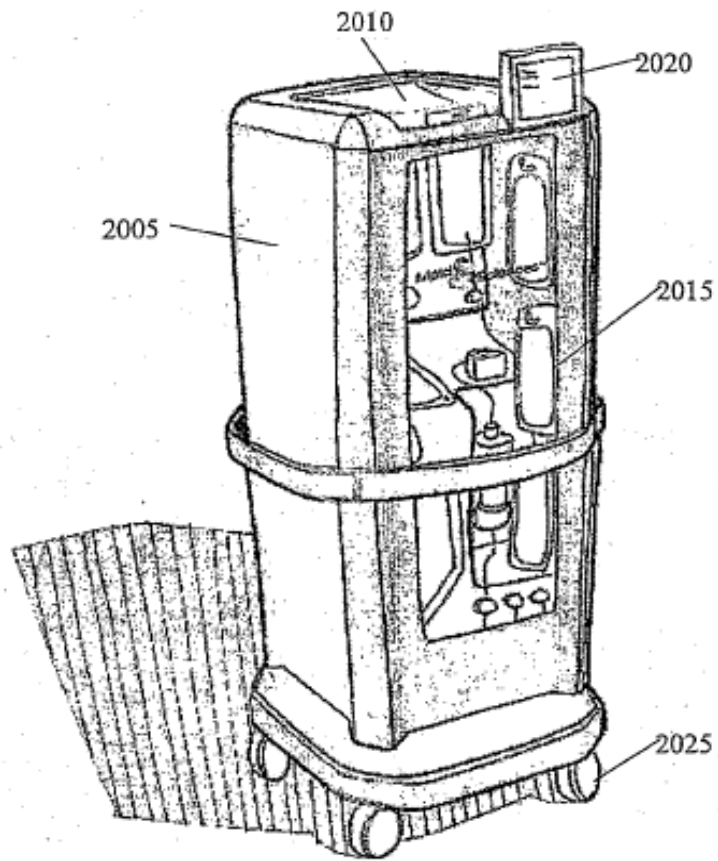


FIGURA 19



1900

FIGURA 20



2000

FIGURA 21

