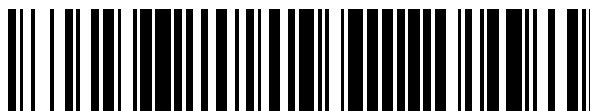


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 977**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/685 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2011** **PCT/AU2011/000819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012** **WO2012000048**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2011** **E 11799979 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016** **EP 2588113**

54 Título: **Una formulación de lipoproteína de alta densidad reconstituida y método de producción de la misma**

30 Prioridad:

30.06.2010 US 359925 P

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

20.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WRIGHT, SAMUEL;
IMBODEN, MARTIN;
BOLLI, REINHARD y
WAEELCHLI, MARCEL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 617 977 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

Una formulación de lipoproteína de alta densidad reconstituida y método de producción de la misma

CAMPO TÉCNICO

- 5 LA PRESENTE INVENCION se refiere a formulaciones de lipoproteína de alta densidad reconstituidas. Más particularmente, la presente invención se refiere a formulaciones de lipoproteína de alta densidad reconstituidas que tienen toxicidad reducida.

ANTECEDENTES

- 10 La lipoproteína de alta densidad (HDL) es una clase de lipoproteínas heterogéneas que contienen lípido y proteína caracterizadas por densidad alta ($>1,063$ g/ml) y tamaño pequeño (diámetro de Stoke = 5 a 17 nm). Las diversas subclases de HDL varían en contenido cuantitativo y cualitativo de lípidos, apolipoproteínas, enzimas y proteínas de transferencia de lípido, produciendo diferencias en la forma, densidad, tamaño, carga y antigenicidad. La apolipoproteína A-I (Apo-AI) es la proteína de HDL predominante, aunque pueden estar presentes otras apolipoproteínas tales como Apo-AII y Apo-V.

- 15 Estudios epidemiológicos y clínicos han establecido una asociación inversa entre los niveles de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL-C) y el riesgo de enfermedad cardiovascular (revisado en Assmann et al., 2004, Circulation 109 III-8). Más particularmente, la administración clínica de formulaciones de HDL reconstituidas ha mostrado conferir efectos beneficiosos a pacientes hipercolesterolémicos que sufren síndromes coronarios agudos (SCA) recientes.

- 20 Normalmente, tales formulaciones de HDL reconstituidas comprenden una proteína tal como Apo-AI, un lípido tal como fosfatidilcolina y un detergente tal como colato o desoxicolato. Además, puede incluirse colesterol. Como se trata en la patente de EE.UU. 5.652.339, puede ser ventajoso producir formulaciones de HDL reconstituidas sin usar disolventes orgánicos, que en algunos casos se usan para disolver el componente de lípido (por ejemplo, fosfatidilcolina) cuando se produce la formulación de HDL reconstituida. Una formulación de HDL reconstituida de este tipo, designada CSL-111, fue clínicamente probada, pero se interrumpió pronto el tratamiento de dosificación más alta tras anomalías de la prueba de la función hepática. Los pacientes tratados con CSL111 mostraron tendencias beneficiosas en indicios de carga de placas. Sin embargo, no se obtuvo significación estadística en el cambio de porcentaje en volumen de ateroma o cambio nominal en volumen de placa cuando se compararon con placebo (Tardif et al., 2007, JAMA-Exp. 297 E1).

SUMARIO

- 30 Es un objetivo de la invención proporcionar una formulación de HDL reconstituida que alivie o evite una o más de las deficiencias de formulaciones de HDL reconstituidas del estado de la técnica.

Es un objetivo preferido de la invención proporcionar una formulación de HDL reconstituida con toxicidad reducida o mínima.

- 35 Es otro objetivo preferido de la invención proporcionar una formulación de HDL reconstituida que sea eficaz en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades o afecciones que incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis coronaria.

- 40 La invención se refiere ampliamente a una formulación de lipoproteína que comprende una apolipoproteína, un fosfolípido y un detergente a un nivel que no es tóxico, o al menos muestra toxicidad relativamente baja. En realizaciones particulares, el nivel de detergente y lípido está a un nivel menor de aquél que causa, produce o está asociado a toxicidad hepática.

En un aspecto, la invención proporciona una formulación de lipoproteína de alta densidad reconstituida (HDLr) que comprende una apolipoproteína o fragmento de la misma; un lípido; y un detergente a un nivel que es aproximadamente el 5-50 % de aquél presente en una formulación de HDLr que muestra toxicidad hepática tras la administración a un ser humano.

- 45 En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una formulación de HDLr que comprende una apolipoproteína; un lípido; y un detergente, incluyendo dicho método la etapa de proporcionar dicho detergente a un nivel que es aproximadamente el 5-50 % de aquél en una formulación de HDLr que muestra toxicidad hepática tras la administración a un ser humano.

- 50 La formulación de la invención se define en la reivindicación 1. En otro aspecto más, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un humano que incluye la etapa de administrar al ser humano una HDLr según el primer aspecto o producida según el método del segundo aspecto, para así tratar dicha enfermedad, trastorno o afección en el ser humano.

En todavía otro aspecto más la invención proporciona una formulación de HDLr según el primer aspecto o producida según el método del segundo aspecto, para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un ser humano.

- 5 Preferentemente, el nivel de detergente es aproximadamente el 5-10 % de aquél que muestra toxicidad hepática. En ciertas realizaciones, esto es equivalente a aproximadamente 0,03 g/g de apolipoproteína.

El detergente es una sal biliar o ácido biliar. Más preferentemente, el detergente es colato de sodio.

La apolipoproteína puede ser cualquier apolipoproteína que sea un constituyente normal y/o funcional de la lipoproteína de alta densidad (HDL). La apolipoproteína está preferentemente a una concentración de aproximadamente 20-50 g/l. Preferentemente, la apolipoproteína es Apo-AI o un fragmento de la misma.

- 10 Adecuadamente, el nivel de lípido es aproximadamente el 20-70 % de aquél que causa, o está asociado a, toxicidad hepática. Preferentemente, el lípido está a una concentración de aproximadamente 30-60 g/l. Una concentración particularmente ventajosa de lípido es aproximadamente 30-50 g/l, o en ciertas realizaciones aproximadamente 34 o 47 g/l.

El lípido es un fosfolípido. Más preferentemente, el fosfolípido es, o comprende, fosfatidilcolina (PC).

- 15 En una realización preferida, la relación molar de apolipoproteína:lípido está en el intervalo de 1:20 a 1:100. Más preferentemente, la relación molar de apolipoproteína:lípido está en el intervalo de 1:40 a 1:75. Una relación particularmente ventajosa de apolipoproteína:lípido es aproximadamente 1:40 o 1:55.

Adecuadamente, la formulación de HDLr comprende además un estabilizador. Preferentemente, el estabilizador es un azúcar tal como sacarosa. Una concentración preferida es aproximadamente 65-85 g/l de formulación de HDLr.

- 20 En toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera de otro modo, se entenderá que las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un número entero establecido o grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 25 Se hace referencia a las siguientes figuras que ayudan a entender realizaciones no limitantes de la invención descritas en detalle en lo sucesivo, en las que:

La Figura 1 muestra los resultados de estudios de rata agudos que indican que la reducción simultánea de tanto colato como fosfatidilcolina reduce la toxicidad hepática;

la Figura 2 muestra los resultados de estudios de rata agudos que indican que la reducción selectiva de colato reduce la toxicidad hepática;

- 30 la Figura 3 muestra los resultados del análisis de turbidez de CSL111 en presencia de concentraciones diferentes de colato;

la Figura 4 muestra los resultados de turbidez de CSL111 en presencia de concentraciones diferentes de colato después de la liofilización y reconstitución;

- 35 la Figura 5 muestra los resultados del análisis de turbidez de HDL reconstituida 1:50 PC a temperatura ambiente (TA);

la Figura 6 muestra los resultados del análisis de turbidez de HDL reconstituida 1:50 PC a 37 °C;

la Figura 7 muestra los resultados del análisis de turbidez de HDL reconstituida 1:75 PC a TA;

la Figura 8 muestra los resultados del análisis de turbidez de HDL reconstituida 1:75 PC a 37 °C; y

- 40 la Figura 9 proporciona una visión general de una realización de un proceso de fabricación de la formulación de HDLr.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 45 La invención surge al menos en parte del descubrimiento inesperado de que la toxicidad hepática mostrada por la formulación de HDL reconstituida (HDLr) CSL111 descrita en el estado de la técnica se debió a exceso de detergente, particularmente cuando se consideró en términos de la relación de detergente con respecto a Apo-AI en la formulación. A este respecto, el nivel de colato de sodio fue aproximadamente 0,3 g/g de Apo-AI. Sin embargo, los inventores también han descubierto que el detergente no puede ser totalmente eliminado y debe ser retenido a un nivel por el cual la formulación de HDLr muestra suficiente estabilidad y actividad terapéutica.

Además, se ha encontrado inesperadamente que una reducción en la concentración de lípido en comparación con aquella presente en CSL111 reduce la toxicidad hepática sin comprometer sustancialmente la actividad terapéutica de la formulación de HDLr.

5 En todavía un descubrimiento más, se ha identificado una relación molar de apolipoproteína:lípido que es óptima para la formulación de HDLr.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una formulación de HDLr que comprende una apolipoproteína o fragmento de la misma; un Lípido y un nivel de detergente que es aproximadamente el 5-50 % de aquél presente en una formulación de HDLr que presentaría toxicidad hepática tras la administración a un ser humano.

10 El detergente es una sal biliar o ácido biliar a un nivel que es aproximadamente 0,5 a 1,5 g/l.

Como se usa en el presente documento, una formulación de "HDL reconstituida (HDLr)" puede ser cualquier formulación o composición de lipoproteína producida artificialmente que es funcionalmente similar a, análoga a, se corresponde con, o imita, lipoproteína de alta densidad (HDL) normalmente presente en plasma sanguíneo. Las formulaciones de HDLr incluyen dentro de su alcance "miméticos de HDL" y "partículas de HDL sintéticas".

15 En este contexto, por "muestra toxicidad hepática tras la administración de la formulación de HDLr a un ser humano" significa un nivel de detergente en una formulación de HDLr que tras la administración a un ser humano causa, produce o está al menos asociado a un acontecimiento adverso a partir de entonces. Normalmente, el acontecimiento adverso es toxicidad hepática, tal como se evidencia por función hepática anormal o comprometida. Ejemplos no limitantes de la(s) función (funciones) hepática(s) que pueden ser anormales o comprometidas incluyen
20 actividad de alanina aminotransferasa (ALT) elevada, actividad de aspartato aminotransferasa (AST) elevada y/o niveles de bilirrubina elevados. Según la invención, un nivel adecuado de detergente es aquél que no causa, produce o no está asociado a un acontecimiento adverso, como se describió anteriormente en este documento. Normalmente, esto se mediría al final de la infusión.

25 Preferentemente, el nivel de detergente es aproximadamente del 5-35 % de aquél que muestra toxicidad hepática. Este intervalo incluye, por ejemplo, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % y 35 %. Más preferentemente, el nivel de detergente es aproximadamente el 5-20 % de aquél que muestra toxicidad hepática. Ventajosamente, el nivel es aproximadamente el 5-10 % de aquél que muestra toxicidad hepática. Preferentemente, estos niveles se expresan en términos del mínimo o nivel de umbral de detergente que muestra toxicidad hepática.

30 A modo de ejemplo, un nivel de detergente que se ha mostrado en trabajo que conduce a la presente invención que causa, produce o al menos está asociado a toxicidad hepática es 0,3 g/g de Apo-AI o 6 g/l de formulación de HDLr (a 20 g/l de Apo-AI). Por consiguiente, el 5-10 % de este nivel de detergente es 0,015-0,03 g/g de Apo-AI o 0,5-0,9 g/l de formulación de HDLr (a 30 g/l de Apo-AI).

35 El "nivel" de detergente puede ser una cantidad absoluta de detergente, una concentración de detergente (por ejemplo, masa por unidad de volumen de formulación de HDLr). y/o una relación de la cantidad o concentración de detergente con respecto a otra cantidad o concentración de un componente de la formulación de HDLr. A modo de ejemplo solo, el nivel de detergente puede expresarse en términos de la masa total de apolipoproteína (por ejemplo, Apo-AI) presente en la formulación de HDLr.

40 Aunque la seguridad y la evasión de la toxicidad hepática es un objetivo de la invención, la invención también requiere un nivel de detergente suficiente para mantener la estabilidad de la formulación de HDLr. Como se describirá en más detalle en los ejemplos, una concentración de detergente no menos de aproximadamente 0,45 g/l de formulación de HDLr con 30 g/l de apolipoproteína es óptima en términos de tanto estabilidad como de no toxicidad. La estabilidad se puede medir de ventajosamente por cualquier medio conocido en la técnica, aunque la turbidez de la formulación de HDLr es una medida preferida.

45 Los ácidos biliares normalmente son esteroides dihidroxilados o trihidroxilados con 24 carbonos, incluyendo ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico o ácido ursodesoxicólico. Preferentemente, el detergente es una sal biliar tal como una sal de colato, desoxicolato, quenodesoxicolato o ursodesoxicolato. Un detergente particularmente preferido es colato de sodio.

50 La apolipoproteína puede ser cualquier apolipoproteína que sea un componente funcional biológicamente activo de HDL que existe de forma natural o de una lipoproteína de alta densidad reconstituida (HDLr). Normalmente, la apolipoproteína es tanto una apolipoproteína derivada de plasma o recombinante, tal como Apo-AI, Apo-AII o Apo-AV, pro-apo-A1, como una variante tal como Apo-AI Milano. Preferentemente, la apolipoproteína es Apo-AI. También se contemplan fragmentos biológicamente activos de la apolipoproteína. Los fragmentos pueden existir de forma natural, ser químicos sintéticos o recombinantes. A modo de ejemplo solo, un fragmento biológicamente activo de Apo-AI tiene preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 95-100 % o incluso más del 100 % de
55 la actividad estimulante de lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) de Apo-AI.

Adecuadamente, la apolipoproteína está a una concentración de aproximadamente 20-50 g/l. Esto incluye 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 g/l y cualquier intervalo entre estas cantidades. La apolipoproteína está preferentemente a una concentración de aproximadamente 30 g/l.

- La formulación de HDLr comprende un lípido a un nivel que no causa toxicidad hepática. Adecuadamente, el nivel de lípido es aproximadamente del 20-70 % de aquél que causa, o está asociado a, toxicidad hepática. En realizaciones particulares, el nivel de lípido es preferentemente aproximadamente el 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o el 65 % de aquél que causa, o está asociado a, toxicidad hepática, y cualquier intervalo entre estas cantidades. Preferentemente, estos niveles se expresan en términos del mínimo o nivel de umbral de lípido que muestra toxicidad hepática.
- A modo de ejemplo, un nivel de lípido que se ha mostrado en trabajo que conduce a la presente invención que causa, produce o al menos está asociado a toxicidad hepática es 84 g/l. Por consiguiente, el lípido está preferentemente a una concentración de aproximadamente 30-60 g/l. Esto incluye 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 g/l y cualquier intervalo entre estas cantidades. Una concentración particularmente ventajosa de lípido es aproximadamente 30-50 g/l, o en ciertas realizaciones aproximadamente 34 o 47 g/l.
- El "nivel" de lípido puede ser una cantidad absoluta de lípido, una concentración de lípido (por ejemplo, masa por unidad de volumen de formulación de HDLr) y/o una relación de la cantidad o concentración de lípido con respecto a otra cantidad o concentración de un componente de la formulación de HDLr. A modo de ejemplo solo, el nivel de lípido puede expresarse en términos de una relación molar de apolipoproteína (por ejemplo, Apo-AI) presente en la formulación de HDLr.
- En una realización preferida, la relación molar de apolipoproteína:lípido está en el intervalo de 1:20 a 1:100. Este intervalo incluye relaciones molares tales como 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80 y 1:90. Más preferentemente, la relación molar de apolipoproteína:lípido está en el intervalo de 1:40 a 1:75. Una relación particularmente ventajosa de apolipoproteína:lípido es aproximadamente 1:40 o 1:55.

El lípido es un fosfolípido.

- Ejemplos no limitantes de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina (PC) (lecitina), ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina (PE) (cefalina), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y esfingomielina (SM) o derivados naturales o sintéticos de los mismos. Los derivados naturales incluyen PC de huevo, PG de huevo, PC de soja, PC de soja hidrogenado, PG de soja, PS de cerebro, esfingolípidos, SM de cerebro, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, cefalina, cardiolipina y dicetilfosfato. Los derivados sintéticos incluyen dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), didecanoilfosfatidilcolina (DDPC), dierucoilfosfatidilcolina (DEPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dilaurilfosfatidilcolina (DLPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoilmiristoilfosfatidilcolina (PMPC), palmitolestearoilfosfatidilcolina (PSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), dilaurilfosfatidilglicerol (DLPG), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG), ácido dimiristoilfosfatídico (DMPA), ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA), ácido diestearoilfosfatídico (DSPA), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfatidilserina (DMPS), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), dioleoilfosfatidilserina (DOPS), dipalmitoilesfingomielina (DPSM) y diestearoilesfingomielina (DSSM). El fosfolípido también puede ser un derivado o análogo de cualquiera de los fosfolípidos anteriores.

Preferentemente, el fosfolípido es, o comprende, fosfatidilcolina, sola o en combinación con uno o varios de otros fosfolípidos. Un ejemplo de otro fosfolípido es esfingomielina.

- Adecuadamente, la formulación de HDLr comprende además un estabilizador. Particularmente, el estabilizador mantiene estabilidad de la formulación de HDLr durante la liofilización. Adecuadamente, el estabilizador es un hidrato de carbono tal como un azúcar o alcohol de azúcar. Ejemplos de alcoholes de azúcar adecuados son manitol y sorbitol. Preferentemente, el estabilizador es un azúcar de disacárido tal como sacarosa. Una concentración preferida de sacarosa es aproximadamente 65-85 g/l (equivalente a aproximadamente el 6,5-8,5 % en peso/volumen) de la formulación de HDLr. Preferentemente, la concentración es sacarosa es aproximadamente 75 g/l (equivalente a aproximadamente el 7,5 % en peso/peso). Esto es una concentración de sacarosa reducida, tanto en términos absolutos como con respecto a la concentración de lipoproteína, en comparación con CSL111. Se propone que esta sacarosa relativamente reducida pueda permitir una velocidad de infusión más rápida de la formulación de HDLr de la invención. Otros estabilizadores pueden ser o incluir aminoácidos (por ejemplo, glicina, prolina), antioxidantes, emulsionantes, tensioactivos, agentes quelantes, gelatina, aceites sintéticos, polioles, alginato o cualquier vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, aunque sin limitación a los mismos. A este respecto, se hace referencia a modo de ejemplo a "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000), "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000) y publicación internacional WO 2009/025754.

En una realización particularmente preferida, la formulación de HDLr comprende:

- (i) aproximadamente 30 g/l de Apo-AI;
- (ii) aproximadamente 0,03 g de colato de sodio por gramo de Apo-AI;
- (iii) aproximadamente 34 o 47 g/l de fosfatidilcolina; y
- (iv) aproximadamente 75 g/l de sacarosa;

5 en la que la relación molar de Apo-AI: fosfatidilcolina es aproximadamente 1:40 o 1:55.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una formulación de HDLr que comprende una apolipoproteína; un lípido; y un detergente, incluyendo dicho método la etapa de proporcionar dicho detergente a un nivel que es aproximadamente el 5-50 % de aquél presente en una formulación de HDLr que muestra toxicidad hepática tras la administración a un ser humano.

10 Preferentemente, dicho método incluye la etapa de proporcionar dicho detergente a un nivel que es aproximadamente el 5-10 % de aquél que muestra toxicidad hepática tras la administración a un ser humano. En el método de la invención, el detergente es una sal biliar o ácido biliar a un nivel que es aproximadamente 0,5 - 1,5 g/l de la formulación de HDLr.

15 En una realización preferida del método, un nivel inicial o de partida de detergente se reduce o elimina a un nivel que no muestra toxicidad hepática tras la administración de la formulación de HDLr a un ser humano.

La reducción o eliminación de detergente puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica que incluye, por ejemplo, filtración, adsorción hidrófoba o cromatografía de interacción hidrófoba, diálisis, adsorción de intercambio iónico y cromatografía de intercambio iónico.

20 En algunas realizaciones, resinas de poliestireno no polares pueden ser adecuadas para reducir los niveles de detergente. Tales resinas están preferentemente en forma de un copolímero reticulado (por ejemplo, un copolímero de estireno y divinilbenceno reticulado). Ejemplos no limitantes incluyen Amberlite XAD-2 y Bio Beads SM.

La filtración incluye filtración en gel, permeación en gel, diafiltración y ultrafiltración, aunque sin limitación a las mismas, como son bien entendidas en la técnica. Un ejemplo no limitante de permeación en gel puede utilizar dextrano poroso reticulado tal como resinas Sephadex.

25 En una realización particularmente preferida particularmente adecuada para fabricación a gran escala, el nivel de detergente se reduce por diafiltración.

Adecuadamente, el método incluye la etapa de combinar el lípido y la apolipoproteína en ausencia de disolvente orgánico.

30 Por consiguiente, en una realización preferida, la invención proporciona un método de producción de una formulación de HDLr que incluye las etapas de:

- (I) añadir fosfatidilcolina sin disolvente orgánico y un detergente de colato a una disolución de Apo-AI;
- (II) reducir el nivel de detergente de colato en la disolución producida en la etapa (I) a aproximadamente 0,03 g/g de Apo-AI;
- (III) añadir un estabilizador, preferentemente sacarosa, a la disolución en la etapa (II).

35 Preferentemente, en la etapa (I), se añade fosfatidilcolina de modo que la relación de Apo-AI: fosfatidilcolina sea aproximadamente 1:40 o 1:55.

Preferentemente, la concentración final de sacarosa en la etapa (III) es aproximadamente 75 g/l.

Adecuadamente, el método incluye además la etapa (IV) de liofilizar la formulación de HDLr producida en la etapa (III).

40 Se apreciará que en una realización particular el método de producción de una formulación de HDLr es adecuado para la fabricación comercial a gran escala de una formulación de HDLr de una calidad y seguridad adecuadas para administración a seres humanos. Un ejemplo no limitante de un proceso de fabricación comercial a gran escala, se resume en la FIG. 9.

45 En otro aspecto más, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un ser humano que incluye la etapa de administrar al ser humano una HDLr como se describió anteriormente en este documento o se produjo según el método que se describió anteriormente en este documento, para así tratar dicha enfermedad, trastorno o afección en el ser humano.

La invención también proporciona una formulación de HDLr como se describió anteriormente en este documento o se produjo según el método que se describió anteriormente en este documento, para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un ser humano.

Adecuadamente, la enfermedad, trastorno o afección es sensible a la administración profiláctica o terapéutica de dicha formulación de HDLr. Ejemplos no limitantes de tales enfermedades, trastornos o afecciones incluyen enfermedad cardiovascular (por ejemplo, síndrome coronario agudo (SCA, aterosclerosis e infarto al miocardio) o enfermedades, trastornos o afecciones tales como diabetes, accidente cerebrovascular o infarto de miocardio que predisponen a SCA, hipercolesterolemia (por ejemplo, colesterol en suero elevado o colesterol LDL elevado) e hipocolesterolemia resultante de niveles reducidos de lipoproteína de alta densidad (HDL), tal como es sintomático de la enfermedad de Tangier.

Las formulaciones de HDLr pueden administrarse por cualquier vía de administración conocida en la técnica. Normalmente, las formulaciones de HDLr se administran por vía parenteral, tal como por infusión o inyección intravenosa.

La dosificación administrada de la formulación de HDLr puede estar en el intervalo 1-120 mg/kg de peso corporal. Preferentemente, la dosificación está en el intervalo 5-80 mg/kg, incluyendo dosificaciones de 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg y 70 mg/kg.

De modo que las realizaciones preferidas de la invención puedan ser completamente entendidas y puestas en efecto práctico, se hace referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Los ejemplos proporcionados en lo sucesivo describen estudios iniciales para determinar qué factores de las formulaciones de HDLr (tal como CSL111) contribuyen a la toxicidad hepática (Ejemplos 1 y 2) y prueba de desarrollo y toxicidad de las realizaciones de una formulación de HDLr de la invención (Ejemplos 3 a 8).

EJEMPLO 1

Estudio de toxicidad hepática que compara diferentes relaciones de Apo-AI:PC y el efecto de controlar los niveles de colato

Se determinó el nivel de toxicidad hepática como se mide por la actividad de ALT en el modelo de rata (véanse los detalles del modelo a continuación en el Ejemplo 2) para preparaciones de HDL que contenían diferentes relaciones de Apo AI:PC (1:150, 1:100 y 1:50). Cada preparación de HDL contuvo diferentes concentraciones de colato con niveles que oscilaban de 6 g/l para 1:150 a 1,1 g/l para la preparación de 1:50.

Los resultados indicaron que se observaron niveles de ALT elevados para la preparación de HDL 1:150 para dosis a partir de 300 mg/kg. La preparación de HDL 1:100 causó niveles de ALT elevados a dosificaciones de 400 mg/kg, aumentando los niveles considerablemente a 600 mg/kg. A diferencia, no se observó un aumento en la actividad de ALT para la preparación de HDL 1:50 hasta una dosis de 600 mg/kg (FIG. 1). Estos resultados sugieren que la toxicidad hepática se reduce por el nivel de PC y/o el nivel de colato en la preparación de HDL. Para investigar si el nivel de colato tuvo un efecto directo sobre la actividad de ALT, se realizó otro estudio en el que CSL111 se empobreció en colato. Los resultados demuestran que la reducción en colato en una preparación de CSL111 produjo una reducción de los niveles de ALT cuando se infundió a una rata a 300 mg/kg (FIG. 2). Además, si el colato se añadió entonces de nuevo a la preparación de HDL empobrecida, la preparación de HDL resuplementada causó niveles de ALT elevados cuando se infundió en una rata a 300 mg/kg (FIG. 2). Estos estudios demuestran que reducir el colato a aproximadamente 1 g/l reduce sustancialmente la toxicidad de HDLr, pero también es un factor contribuyente adicional una reducción en PC a una relación de aproximadamente 1:50 de ApoAI : PC.

EJEMPLO 2

Estudio de toxicidad hepática que compara niveles de colato clasificados y relaciones de Apo-AI : PC

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio era determinar la hepatotoxicidad de formulaciones de HDL reconstituidas (HDLr) con concentraciones de colato clasificadas y relaciones de Apo A-I con respecto a PC de la siguiente manera HDLr PC 1:150 (3 g/l de colato), HDLr PC 1:100 (1 g/l de colato), HDLr PC 1:50 (3 g/l de colato), HDLr PC 1:50 (0,2 g/l de colato). Se usó el modelo de rata consciente para determinar el efecto de las formulaciones anteriormente mencionadas sobre la función hepática. Se evaluó la hepatotoxicidad por determinación de la actividad enzimática del hígado (ALT y AST) en suero.

Se considera que Apo-AI es el componente activo de las formulaciones y los niveles en plasma de Apo-AI son el indicador clave de la exposición.

MATERIALES Y MÉTODOS*Administración de formulaciones de HDLr de prueba***Formulación 1 de HDLr de prueba**

Sustancia/INN:	HDLr PC 1:150 (3 g/l de colato)
Fabricante:	CSL Behring AG, Berna, Suiza
Número de lote:	Q.3
Dosis:	600 mg/kg de p.c.
Vía:	infusión i.v. mediante la vena de la cola
Frecuencia:	infusión t=0-60 min
Volumen de administración:	31,25 ml/kg/h

Formulación 2 de HDLr de prueba

Sustancia/INN:	HDLr PC 1:100 (1 g/l de colato)
Fabricante:	CSL Behring AG, Berna, Suiza
Número de lote:	0,3-2
Dosis:	600 mg/kg de p.c.
Vía:	infusión i.v. mediante la vena de la cola
Frecuencia:	infusión t=0-60 min
Volumen de administración:	30,30 ml/kg/h

5

Formulación 3 de HDLr de prueba

Sustancia/INN:	HDLr PC 1:50 (3 g/l de colato)
Fabricante:	CSL Behring AG, Berna, Suiza
Número de lote:	P.3
Dosis:	600 mg/kg de p.c.
Vía:	infusión i.v. mediante la vena de la cola
Frecuencia:	infusión t=0-60 min
Volumen de administración:	31,58 ml/kg/h
Fecha de caducidad:	n.d.

Formulación 4 de HDLr de prueba

Sustancia/INN:	HDLr PC 1:50 (0,2 g/l de colato)
Fabricante:	CSL Behring AG, Berna, Suiza
Número de lote:	P.2
Dosis:	900 mg/kg de p.c.
Vía:	infusión i.v. mediante la vena de la cola
Frecuencia:	infusión t=0-120 min.
Volumen de administración:	23,08 ml/kg/h de p.c.

Diseño del estudio

Este estudio se diseñó como un ensayo abierto de cuatro brazos en un total de 14 ratas. La pauta de dosificación se resume en la Tabla 1.

Grupos de tratamiento

5

Tabla 1: Grupos de Tratamiento

N.º	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Vía	volumen (ml/kg/h)	programa (t=x min)	N
1	HDLr PC 1:150 (3 g/l de colato)	600	i.v.	31,25	0-60	4
2	HDLr PC 1:100 (1 g/l de colato)	600	i.v.	30,30	0-60	4
3	HDLr PC 1:50 (3 g/l de colato)	600	i.v.	31,58	0-60	4
4	HDLr PC 1:50 (0,2 g/l de colato)	900.	i.v.	23,08	0-120	2

Animales experimentales

Especie:	Ratas
Cepa:	CD
Sexo:	macho
N.º de animales:	14
Proveedor:	Charles River Laboratories (Sulzfeld, Alemania)
Peso corporal:	286-328 g
Edad al llegar:	7-9 semanas
Alojamiento:	jaulas Macrolon
Cama:	virutas de madera (Braun, Battenberg, Alemania)
Agua:	agua de grifo, a voluntad
Comida:	dieta para ratas estándar (Ssniff-Versuchsdäten, Soest, Alemania)
Luz/oscuridad:	12 h/12 h
Temperatura:	21-22 °C
Humedad relativa:	40 - 50 %

Se colocaron los animales en dispositivos de inmovilización (soporte para ratas) y se pinchó la vena lateral de la cola con un catéter i.v. Se infundieron los artículos de prueba durante 60/120 minutos.

- 10 Se extrajeron muestras de sangre a partir del complejo venoso retro-orbital y se recogieron en tubos de suero en el nivel inicial, 1 h/2 h y 7 h/8 h tras la infusión i.v. Las muestras de sangre se procesaron a suero, se almacenaron a -20 °C.

Determinación de enzimas hepáticas

- 15 Las muestras se analizaron para la actividad de AST y ALT usando kits de prueba fotométricos enzimáticos disponibles comercialmente (Greiner Biochemica).

Determinación del nivel en plasma de Apo A-I

La determinación de los niveles de Apo A-I humana se realizó por un ensayo nefelométrico.

RESULTADOS

- 20 Se investigaron formulaciones de HDLr con relaciones de Apo A-I con respecto a PC de 1:50, 1:100 y 1:150, además de a concentraciones de colato definidas de 1 o 3 g/l o empobrecidas en colato (0,2 g/l). La solución salina sirvió de

vehículo y CSL 111 de control positivo. Se tomó una muestra de sangre en el nivel inicial (momento de tiempo 0) al final de la infusión (1 h o 2 h, 600 y 900 mg/kg, respectivamente), y a 7 h u 8 h. La actividad enzimática del hígado (ALT y AST) y los niveles de Apo A-I humana se estimaron en los momentos de tiempo anteriormente mencionados.

5 La concentración de AST en el nivel inicial osciló entre 63 y 87 U/l. La concentración de AST aumentó al final de la infusión y en el momento de tiempo de 7 h/8 h para todas las formulaciones, excepto Apo A-I:PC 1:50 (colato 0,2 g/l).

La concentración de ALT en el nivel inicial osciló entre 39 y 45 U/l. La concentración de AST aumentó al final de la infusión y en el momento de tiempo 7 h/8 h para todas las formulaciones, excepto Apo A-I:PC 1:50 (colato 0,2 g/l).

10 La concentración de Apo A-I humana en el nivel inicial estuvo por debajo del límite más bajo de detección. Al final de la infusión, la concentración aumentó a aproximadamente 13 g/l para todas las formulaciones dosificadas a 600 mg/kg. La formulación 1:50 a 900 mg/kg produjo una concentración de Apo A-I de 15 g/l.

Las medias y desviaciones estándar para todos los grupos, dosis y momentos de tiempo se dan en las Tablas 2 a 4.

Tabla 2: Niveles en suero de AST (media $\pm$ DE)

Momento de tiempo	Tratamiento / Concentración en suero (U/l)			
	HDLr PC 1: 150 (3 g/l de colato)	HDLr PC 1:100 (1 g/l de colato)	HDLr PC 1:50 (3 g/l de colato)	HDLr PC 1:50 (0,2 g/l de colato) (*)
	600 mg/kg n=4	600 mg/kg n=4	600 mg/kg n=4	900 mg/kg n=2
Nivel inicial	65,81 $\pm$ 15,96	63,33 $\pm$ 7,16	66,83 $\pm$ 9,62	87,26 $\pm$ 25,41
1 h/2 h(*)	275,48 $\pm$ 66,20	166,19 $\pm$ 118,42	287,77 $\pm$ 122,04	55,29 $\pm$ 1,71
7 h/8 h(*)	1755,65 $\pm$ 562,36	433,42 $\pm$ 320,17	286,57 $\pm$ 65,38	91,44 $\pm$ 15,45

Tabla 3: Niveles en suero de ALT después (media $\pm$ DE)

Momento de tiempo	Tratamiento / Concentración en suero (U/l)			
	HDLr PC 1:150 (3 g/l de colato)	HDLr PC 1:100 (1 g/l de colato)	HDLr PC 1:50 (3 g/l de colato)	HDLr PC 1:50 (0,2 g/l de colato) (*)
	600 mg/kg n=4	600 mg/kg n=4	600 mg/kg n=4	900 mg/kg n=2
Nivel inicial	38,91 $\pm$ 328	43,02 $\pm$ 6,39	45,27 $\pm$ 4,07	41,51 $\pm$ 6,87
1 h/2 h(*)	211,80 $\pm$ 61,26	105,19 $\pm$ 69,09	147,62 $\pm$ 51,32	33,1 $\pm$ 2,98
7 h/8 h(*)	1552,96 $\pm$ 715,45	435,66 $\pm$ 323,69	263,07 $\pm$ 69,86	55,90 $\pm$ 16,92

Tabla 4: Niveles en suero de Apo A-I (media $\pm$ DE)

Momento de tiempo	Tratamiento / Concentración en suero (g/l)			
	HDLr PC 1:150 (3 g/l de colato)	HDLr PC 1:100 (1 g/l de colato)	HDLr PC 1:50 (3 g/l de colato)	HDLr PC 1:50 (0,2 g/l de colato) (*)
	600 mg/kg n=4	600 mg/kg n=4	600 mg/kg n=4	900 mg/kg n=2
Nivel inicial	0,246 $\pm$ 0,000	0,246 $\pm$ 0,000	0,246 $\pm$ 0,000	0,246 $\pm$ 0,000
1 h/2 h(*)	13,150 $\pm$ 0,687	13,900 $\pm$ 0,248	13,000 $\pm$ 1,217	14,700 $\pm$ 1,414
7 h/8 h(*)	10,175 $\pm$ 0,185	7,700 $\pm$ 1,352	7,075 $\pm$ 0,595	9,250 $\pm$ 0,283

CONCLUSIÓN

En conclusión, solo la relación de Apo AI:PC de la formulación de HDLr 1:50 (0,2 g/l de colato) a 900 mg/kg no indujo anomalías en la prueba de la función hepática. A diferencia, la misma formulación de HDLr de 1:50 con niveles de colato más altos (3 g/l) a 600 mg/kg mostró niveles elevados de tanto de AST como ALT. Esto sugiere que la toxicidad hepática se minimiza mejor controlando el contenido de lípido y de detergente residual de las formulaciones de HDLr.

EJEMPLO 3

Ensayos de estabilidad que comparan niveles de colato en formulaciones de HDLr

Una realización de una formulación de HDLr de la invención muestra toxicidad hepática significativamente reducida en comparación con la formulación de HDLr CSL111 del estado de la técnica, mientras que mantiene una actividad biológica al menos equivalente a CSL111. Esta formulación de HDLr se distingue de CSL111 por una relación de proteína con respecto a PC más baja, un nivel de colato más bajo, un contenido de proteína más alto y una concentración de sacarosa reducida.

Formulación de HDL reconstituida

Material de partida Apo-AI

Como material de partida se usó una disolución de Apo-AI purificada y pasteurizada. El tamaño de lote fue 30 g o 35 g de proteína.

Disolución de lípido

La fórmula para la fabricación de la disolución de lípido se da a continuación. Primero, se preparó la disolución de tampón que contenía Tris 10 mM, NaCl 10 mM y EDTA 1 mM. La cantidad requerida se calculó según la ecuación 1:

$$\text{cantidad de disolución tampón [g]} = \frac{\text{cantidad de proteína [g]} \cdot 1000 \cdot 0,025 \cdot \text{relación}}{150} \quad \text{ecuación 1}$$

A continuación, se añadió colato de sodio (1,3 mol / mol de lípido) a esta disolución y se disolvió.

Entonces, se introdujo la cantidad de lípido calculada (ecuación 2), la mezcla se agitó suavemente durante 6-18 horas (lípido disuelto), y después se filtró usando un sistema de filtro pre-esterilizado de 0,2 µm Millipak 40 Gamma Gold, (Art. de Millipore MPGL04GH2).

$$\text{cantidad de lípido [g]} = \frac{\text{cantidad de proteína [g]} \cdot \text{relación de proteína} \cdot M(\text{lípido}) [\text{g/mol}] \cdot 100}{M(\text{apoA} - \text{I}) [\text{g/mol}] \cdot \text{pureza de lípido} [\%]} \quad \text{ecuación 2}$$

M(lípido): 775 g/mol para PC; 731 g/mol para SM

M(Apo-AI): 28,078 g/mol

Incubación de lípidos y UF/DF

Se dispuso la disolución de Apo-AI (30 g - 35 g de proteína) en un recipiente de camisa doble de 5 l y se enfrió a 1-4 °C. Entonces, se añadió la disolución de lípido y se agitó durante 2-16 h a 1-4 °C. Para algunos experimentos, la disolución de proteína-lípido se calentó durante 30 min a 30 °C, se enfrió y luego se incubó durante 2-16 h a 1-4 °C.

Para eliminar el colato, se realizó UF/DF con un casete de 10 kDa contra 7-9 volúmenes de disolución al 1 % de sacarosa.

La disolución se concentró entonces a 22-28 g/l (20 g/l de concentración de proteína en la FP) o 32-38 g/l (30 g/l de concentración de proteína en la FP) y después se llevó a 7,5 % de sacarosa y 20 g/l o 30 g/l de proteína, añadiendo sacarosa y WFI. El volumen de HDLr se esterilizó por filtración (Sartopore 2, 150 cm², PES, corte 0,1 µm, Art. de Sartorius 5441358K4--00) y se cargó en el flujo laminar.

Reducción de colato con Amberlite

Preparación de Amberlite

Todas las etapas de filtración se realizaron con un filtro de PES de 0,2 µm de Nalgene (Art. 595-4520).

Se añadió Amberlite XAD-2 (400 g) a 500 ml de metanol 20 % (v/v). La suspensión se agitó durante 1-2 h y entonces el Amberlite se separó por filtración. A continuación, se dispusieron 300 ml de NaOH 1 M en un vaso de precipitados de 1000 ml, se añadió el Amberlite y se calentó a 55-60 °C con agitación durante 15 minutos. El Amberlite se separó por filtración; después este procedimiento se repitió otras dos veces. Entonces, el Amberlite se lavó con agua (SWA) hasta un pH neutro (aproximadamente 10-15 l), se separó por filtración, se añadió a 300 ml de metanol, se agitó durante 1 h y entonces la mezcla se dejó a 2-8 °C al menos durante la noche. Para eliminar el metanol, el Amberlite se separó por filtración, se lavó con aproximadamente 10 l de agua (SWA) y se separó por filtración otra vez. Entonces, el Amberlite se vertió en aproximadamente una disolución de sacarosa de 4 l, tanto al 7,5 % como al 10 %, correspondiente a la concentración de sacarosa de la HDL reconstituida que iba a empobrecerse. La mezcla se agitó durante varios minutos y se separó por filtración justo antes de uso.

Reducción de colato con Amberlite

La HDL reconstituida se enfrió a 2-8 °C, se añadió el Amberlite XAD-2 y la mezcla se agitó durante 3,5 h. El Amberlite se separó por filtración y se descargó. Esta etapa se realizó dos veces.

Dependiendo del experimento, para 5 g de proteína, se usaron 100-160 g de Amberlite para cada etapa de empobrecimiento.

Después del empobrecimiento, se añadió de nuevo colato para lograr las diferentes concentraciones de colato.

Para la reducción de la HDL reconstituida 1:75 PC con respecto a una concentración de colato de 0,7 g/l, la cantidad de Amberlite que iba a añadirse se determinó experimentalmente añadiendo Amberlite en diferentes relaciones a la HDL reconstituida (experimento preliminar). Estos experimentos encontraron que era necesario un tratamiento con 50 g de Amberlite por 5 g de proteína. Entonces se usó esta relación de Amberlite con respecto a proteína para el agotamiento del lote principal.

Evaluaciones de estabilidad

CSL111

Un compuesto que suponen los presentes inventores que puede influir en la toxicidad hepática es el colato. Por tanto, la reducción de colato en la formulación final era un objetivo primario. Se realizaron experimentos iniciales con CSL111. Para encontrar la concentración de colato mínima que todavía garantizaba un producto estable, se trató CSL111 reconstituido con Amberlite y después se añadió de nuevo colato para obtener diferentes concentraciones.

Se realizaron evaluaciones de estabilidad en estos materiales. Por tanto, se investigó la influencia de la liofilización sobre la estabilidad de CSL111 con diferentes concentraciones de colato.

HDL reconstituida 1:50 PC / 1:75 PC

Se empobrecieron en colato dos formulaciones (1,50 PC y 1:75 PC) con Amberlite y se complementaron con colato para obtener diferentes concentraciones de colato. Estas disoluciones se liofilizaron, se reconstituyeron y se investigó la estabilidad para determinar la concentración de colato requerida mínima que es necesaria para garantizar la estabilidad de estas formulaciones.

RESULTADOS

Resultados para CSL111

Se trató CSL111 con Amberlite para eliminar el colato. Entonces se añadió el colato para obtener las diferentes concentraciones requeridas para el estudio.

En el intervalo inferior a 2,8 g/l de colato, la turbidez aumentó a medida que se redujo adicionalmente la concentración de colato. Para concentraciones de colato superiores a 2,8 g/l, casi no se detectó cambio de los valores de turbidez (FIG. 3).

Entonces, estas muestras se liofilizaron y reconstituyeron. La turbidez se midió después de 0 h, 24 h y 7 días de almacenamiento. Los valores de turbidez después de la liofilización y reconstitución son superiores para las muestras no liofilizadas (véanse la FIG. 3 y la FIG. 4).

Parece que las partículas de CSL111 reconstituida requieren una concentración de colato mínima para seguir estables. Si la concentración de colato es demasiado baja, se desarrollan agregados y turbidez. Por tanto, la distribución del tamaño molecular cambia más rápido a concentraciones de colato bajas.

HDL reconstituida 1:50 PC

Los datos para la turbidez se dan en las FIG. 5 y 6.

Los datos de turbidez indicaron que los cambios a TA son pequeños para concentraciones de colato $\geq 0,3$ g/l.

Los cromatogramas de SE-HPLC después de 24 h a TA (no mostrados) demostraron la misma tendencia que los valores de turbidez. Con una concentración de colato de $\geq 0,3$ g/l, los cambios son pequeños. Entre 0,8 - 1,0 g/l, los cromatogramas casi no muestran diferencia. Por tanto, no se espera obtener un aumento en la estabilidad si la concentración de colato aumenta por encima de 1,0 g/l. Por tanto, para la formulación 1:50 con 20 g/l de proteína, se considera que una concentración de colato entre 0,3 - 1,0 g/l es óptima. Calculado para un producto que contiene 30 g/l de proteína, la concentración de colato óptima oscilaría de 0,5 - 1,5 g/l.

HDL reconstituida 1:75 PC

Las mediciones de turbidez (FIG. 7 y 8) de la formulación 1:75 muestran un claro aumento para concentraciones por debajo de 0,6 g/l de colato. Las diferencias después de un día de almacenamiento para las otras concentraciones (0,6 - 2,0 g/l de colato) son bajas.

Los cromatogramas de SE-HPLC de la distribución de tamaño molecular después de 24 horas a TA (no mostrados) mostraron una clara diferencia entre las muestras empobrecidas y las otras muestras.

Entre 1,0 - 1,3 g/l de colato, los cromatogramas casi no mostraron diferencia. Por tanto, no se espera un gran aumento en la estabilidad para concentraciones de colato superiores a 1,3 g/l. Por tanto, para la formulación 1:75 con 20 g/l de proteína, se considera que una concentración de colato entre 0,6 - 1,3 g/l es óptima. Para una formulación con 30 g/l de proteína esto es igual a una concentración de colato final de 0,9 - 2,0 g/l.

CONCLUSIONES

Se seleccionó una concentración de colato óptima de 0,5 - 1,5 g/l para la formulación de HDLr de la invención. Por debajo de este intervalo, la estabilidad disminuyó. Concentraciones de colato superiores a 1,5 g/l causaron un ligero aumento en la estabilidad. Sin embargo, puede esperarse un aumento apreciable en la toxicidad hepática con concentraciones de colato más altas.

EJEMPLO 4

Comparación del ensayo de toxicidad hepática con CSL111

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio era confirmar el perfil hepatotóxico favorable de una realización de la formulación de HDLr de la invención después de la infusión intravenosa a conejos. La hepatotoxicidad se define como actividad de enzima hepática (ALT) elevada en suero. Se considera que Apo-AI es el componente activo de ambas formulaciones y los niveles de Apo-AI en plasma son el indicador clave de la exposición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Administración de formulaciones de HDLr de prueba

Formulación 1 de HDLr de prueba

Sustancia/INN:	HDLr CSL111
Fabricante:	CSL Behring AG, Berna
Número de lote:	E502-03750-00005
Dosis:	75 mg/kg de p.c.
Vía:	i.v.
Frecuencia:	infusión t=0-40 min
Volumen de administración:	4,95 ml/kg/h

Formulación 2 de HDLr de prueba

Sustancia/INN:	HDLr (PC 1:55)
Fabricante:	CSL Behring AG, Berna
Número de lote:	1003.E009.01
Dosis:	75 mg/kg de p.c.
Vía:	i.v.

Frecuencia: infusión t=0-40 min
 Volumen de administración: 3,87 ml/kg/h

Diseño del estudio

Este estudio se diseñó como un ensayo abierto de dos brazos en un total de 6 conejos hembra. La pauta de dosificación se resume en la Tabla 5.

Grupos de tratamiento

5

Tabla 5: Grupos de tratamiento

N.º	Tratamiento	Dosis / volumen / vía	N (f)
1	HDLr CSL111	75 mg/kg de p.c./4,95 ml/kg/h / i.v.	3
2	HDLr PC1:55	75 mg/kg de p.c./ 3,87 ml/kg/h / i.v.	3

Animales experimentales

Especie: Conejo
 Cepa: CHB
 N.º de animales, sexo: 6 (hembra)
 Proveedor: Empresa Bauer (Neuenstein-Lohe, Alemania)
 Peso corporal: 3,1 - 3,3 kg
 Edad al llegar: aproximadamente 3 - 4 meses
 Alojamiento: jaulas de alambre de acero; 1 animal/jaula
 Cama: no
 Agua: agua de grifo, a voluntad
 Comida: Gránulos Deukanin (Deuka), a voluntad
 Luz/oscuridad: 12 h / 12 h
 Temperatura: 21-23 °C
 Humedad relativa: 50 %

Modelo animal

10

Los animales se fijaron en un dispositivo de inmovilización (soporte para conejos). Se colocó un catéter i.v. en la vena de la oreja. Los artículos de prueba se administraron como una infusión i.v. de 40 minutos. Se tomaron muestras de sangre de la arteria de la oreja y se recogieron en viales para suero y estreptocinasa-plasma (5 %). Las muestras de sangre se procesaron a suero, se almacenaron a -20 °C y a plasma y se almacenaron a -80 °C.

Determinación de enzimas hepáticas

Las muestras se analizaron para la actividad de ALT usando kits de prueba fotométricos enzimáticos disponibles comercialmente (Greiner Biochemica).

15

Determinación del nivel en plasma de Apo A-I

La determinación de Apo A-I humana se realizó por un ensayo nefelométrico.

RESULTADOS

Las medias y desviaciones estándar de los datos *in vivo* se dan en las Tablas 6 a 7.

20

La realización de la formulación de HDLr probada en el presente documento no aumentó los niveles en suero de ALT. CSL111 aumentó ALT de 25 U/l a 94 U/l a 8 h.

Se observaron niveles pico de Apo-AI humana en el momento de tiempo 40 min para la formulación de HDLr (1,5 mg/dl) y CSL111 (1,6 mg/dl).

Tabla 6: Niveles en suero de ALT (media $\pm$ DE)

Tratamiento / Concentración en suero (U/l)		
Momento de tiempo	HDLr CSL 111	HDLr PC 1:55
	75 mg/kg	75 mg/kg
	n=3	n=3
nivel inicial	25,38 $\pm$ 9,05	45,07 $\pm$ 4,77
40 min	35,62 $\pm$ 25,04	52,31 $\pm$ 16,21
2 h	56,77 $\pm$ 28,77	49,05 $\pm$ 10,84
4 h	63,65 $\pm$ 33,42	43,17 $\pm$ 11,53
8 h	94,22 $\pm$ 58,63	33,26 $\pm$ 4,25

5

Tabla 7: Niveles en plasma de Apo-AI (media $\pm$ DE)

Tratamiento / Concentración en suero (mg/dl)		
Momento de tiempo	HDLr CSL 111	HDLr PC 1:55
	75 mg/kg	75 mg/kg
	n=3	n=3
nivel inicial	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
40 min	1,571 $\pm$ 0,311	1,509 $\pm$ 0,481
2 h	1,083 $\pm$ 0,323	1,203 $\pm$ 0,250
4 h	0,939 $\pm$ 0,356	1,073 $\pm$ 0,164
8 h	0,740 $\pm$ 0,260	0,830 $\pm$ 0,198

EJEMPLO 5

Se determinó la capacidad de preparar partículas de HDL sintéticas de la invención para partículas que contenían niveles de fosfolípido más bajos. Las relaciones de Apo A-I con respecto a fosfolípido oscilaron de 1:2 a 1:55.

- 10 Para preparar las partículas de HDL sintéticas, se disolvió colato de sodio (New Zealand Pharmaceuticals) en tampón (NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, TRIS 10 mM, pH 8,0) y se agitó hasta quedar claro. Se añadió fosfatidilcolina de soja (Phospholipid GmbH) a un volumen apropiado del colato y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. La disolución de apoA-I se diluyó a una concentración de proteína de 9,0 g/l (determinada por DO280) con NaCl 10 mM y se mezcló con un volumen apropiado de la disolución de lípido para obtener la relación de proteína con respecto a lípido apropiada. La mezcla se agitó a 2-8 °C durante 16 h. Se prepararon miméticos de HDL por eliminación de
- 15 colato sobre una columna de desalación HiPrep 26/10 usando 1 % de sacarosa como tampón de electroforesis. El eluato se concentró por ultrafiltración a una concentración de proteína de 20 g/l y 7,5 % de sacarosa, respectivamente.

Las preparaciones de HDL reconstituida se incubaron (almacenaron) a 2-8 °C y se midieron los siguientes parámetros después de 0, 5 y 14 días:

- 20 - Transmisión (405 nm), distribución del tamaño de partícula (SE-HPLC), endotoxinas, SDS-PAGE (reductora y no reductora), Native PAGE, activación de LCAT, concentración de apoA-I y toxicidad *in vitro*

- 25 En el día 0, se realizaron las siguientes pruebas adicionales: i) concentración de proteína por Biuret modificado adaptado para muestras que contienen lípido (se añadió desoxicolato a disolución de Biuret); ii) concentración de fosfatidilcolina (ProDiagnostics, mti-diagnostics GmbH); y iii) se midió la concentración de colato por un kit de prueba Gallsäuren colorimétrico y Gallsäuren-Stoppreagens (Trinity Biotech).

Se determinó la distribución de tamaño de partícula por SE-HPLC usando una columna Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) con PBS + 0,1 % de azida de sodio como tampón de electroforesis. El caudal fue 0,5 ml/min, se inyectaron 5 µl de muestra, la detección se produjo a una longitud de onda de 280 nm. Las partículas de HDL sintéticas se analizaron por SDS-PAGE (reductora/no reductora) usando XCell SureLock Mini-Cell con geles bis-Tris al 4-12 % de NuPAGE Novex y tampón de electroforesis MOPS o MES (Invitrogen). Las bandas de proteína se visualizaron con la tinción de Coomassie Bio-Safe (Bio-Rad). Native PAGE se realizó usando XCell SureLock Mini-Cell con geles bis-Tris al 4-16 % de Native Page Novex y el kit de tampón de electroforesis NativePAGE (Invitrogen). Las bandas de proteína se visualizaron con el reactivo GelCode Blue Stain (Thermo Scientific). Se determinó la concentración de apoA-I por electroforesis capilar usando un instrumento 3D CE (Agilent Technologies) y un capilar Extended Light Path CE (50 µm, 56 cm, ambos de Agilent Technologies). El tampón de electroforesis fue borato de Na 53 mM a pH 9,1, 0,21 % de SDS, 5 % de metanol. La electroforesis se realizó a 25 kV.

Se determinó la actividad de LCAT por cuadruplicado. Brevemente, se pipetearon muestras de 10 µl en un tubo frío. Se disolvieron 150 µl de plasma humano, 150 µl de PBS y 20 µl de ¹⁴C colesterol (Perkin Elmer) en 25 mg/ml de disolución de albúmina humana, se mezclaron y se incubaron a 2-8 °C durante 90 minutos. Se incubaron muestras duplicadas a 37 °C, las otras 2 muestras (blanco) a 2-8 °C durante 30 min. Se añadieron 2 ml de etanol para detener la reacción y posteriormente se extrajo dos veces con hexano (1x 5 ml, 1x 3 ml). El hexano se evaporó a sequedad y los residuos se redisolviéron en 0,5 ml de hexano. El éster de colesterol se separó de las otras sustancias pasando el extracto a través de una columna Amino SPE de fase sólida, eluyendo con 2x1 ml de hexano. La radiactividad en el eluato se determinó en un contador beta de centelleo.

La toxicidad *in vitro* implicó preparar células HEP-G2 (día 1): se tomó un cultivo de fase logarítmica de células HEP-G2 de un matraz T75, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS. Después de la tripsinización y resuspensión en 10 ml de medio de cultivo (90 % de DMEM, 10 % de FCS inactivado, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de Pen/Estrep), se determinó la concentración por Neubauer/azul de tripano. Se sembraron 100 µl de células (10x10⁴ C/ml)/pocillo en placas de fondo en F de 96 pocillos. La placa se incubó durante la noche a 37 °C/5 % de CO₂, 95 % de H₂O. Incubación (día 2): se prepararon 700 µl de muestra de la mayor concentración de compuesto en medio de cultivo. Se eliminó el medio de la primera fila de pocillos y se añadieron 200 µl de la disolución a las células. Se hizo una serie de dilución 1:2 seriada y la placa se incubó durante 72 horas a 37 °C/5 % de CO₂, 95 % de H₂O. Viabilidad (día 3): se añadieron 50 µl de 3x disolución de Neutral Red (70 mg de Neutral Red en 100 ml de PBS) a cada pocillo. La placa se incubó durante 2 horas a 37 °C/5 % de CO₂, 95 % de H₂O y los pocillos se lavaron una vez con 200 µl de PBS/pocillo, se añadieron 100 µl de etanol a cada pocillo y la placa se puso en un agitador durante 20 minutos. La absorción en cada pocillo se leyó a 540 nm.

Un resumen de las características de las partículas de HDL sintéticas que contienen diferentes relaciones de fosfolípido con respecto a proteína se proporciona en la Tabla 8. El % de transmisión indica que las partículas fueron estables. Los valores de LCAT disminuyeron a medida que se redujo el nivel de fosfolípido presente en las partículas sintéticas. Esto es según el fosfolípido que actúa de sustrato para LCAT.

Los resultados de HPLC-SEC indicaron que las partículas con relaciones de 1:20 y 1:30 eluyeron como un único pico simétrico. Las partículas de HDL sintéticas con niveles más bajos de lípido con respecto a Apo A-I contuvieron un hombro que fue más pronunciado en las partículas con relaciones de 1:5 y 1:2. Además, el tiempo de elución del pico principal fue progresivamente posterior a medida que se redujo la relación de fosfolípido con respecto a proteína. Esto indica que las partículas se están haciendo progresivamente más pequeñas. Este cambio de tamaño también se reflejó en los resultados de Native PAGE donde se observó una banda de peso molecular bajo a intensidad creciente a medida que se redujo la relación 1:55 a 1:2. La SDS-PAGE fue similar para todas las muestras.

Los resultados de ensayo *in vitro* indicaron que la viabilidad celular para cada preparación permaneció estable durante el periodo de 14 días. Hubo una pequeña reducción en la viabilidad celular observada con niveles de lípido crecientes cuando las células se incubaron con HDL reconstituida a la concentración más alta (2 mg/ml) (véase la Tabla 9, a continuación).

Tabla 8: Resumen de características de las partículas de HDL sintéticas con diferentes relaciones de Apo A-I con respecto a fosfolípido (1:2 a 1:55).

Muestra	Tiempo (días)	Apo A-I (mg/ml)	Proteína (mg/ml)	Fosfolípido (g/l)	Relación	Colato (g/l)	LCAT (% de ref)	Transmisión (%)	Endotoxina (UE/mg)
1:55	t=0	21,00	20,4	33,3	59	1,4	78	72,3	3,0
	t=5	-	-	-	-	-	82	70,6	3,2
	t=14	20,74	-	-	-	-	81	70,6	5,4
1:40	t=0	20,60	20,0	21,9	39	0,8	51	73,9	2,4
	t=5	-	-	-	-	-	53	72,3	2,7
	t=14	21,93	-	-	-	-	52	72,2	2,4
1:30	t=0	19,79	19,7	16,3	30	0,4	37	75,7	2,1
	t=5	-	-	-	-	-	41	74,1	10,1
	t=14	20,75	-	-	-	-	39	74,0	2,9
1:20	t=0	18,34	19,7	10,9	20	0,1	28	76,8	0,8
	t=5	-	-	-	-	-	33	74,8	11,6
	t=14	19,32	-	-	-	-	29	75,0	1,9
1:10	t=0	16,21	19,8	5,4	10	0,1	27	76,3	3,3
	t=5	-	-	-	-	-	26	76,5	2,1
	t=14	16,33	-	-	-	-	24	76,2	2,5
1:5	t=0	15,15	18,7	2,8	5	<0,1	23	77,0	1,9
	t=5	-	-	-	-	-	23	77,2	1,4
	t=14	16,97	-	-	-	-	20	75,9	1,4
1:2	t=0	14,06	17,5	1,0	2	<0,1	20	77,6	1,6
	t=5	-	-	-	-	-	20	77,8	1,1
	t=14	14,59	-	-	-	-	17	77,3	0,8
* Celdas en blanco indican que no se obtuvieron datos.									

Tabla 9: Resumen de % viabilidad de las partículas de HDL sintéticas con diferentes relaciones de Apo A-I con respecto a fosfolípido (1:2 a 1:55).

	Conc. de HDL (mg/ml)	1:2	1:5	1:10	1:20	1:30	1:40	1:55
0 días	0,5	97	87	104	95	97	109	97
	1,0	105	96	110	101	109	100	105
	2,0	101	84	86	93	87	76	77
5 días	0,5	98	89	102	102	100	111	97
	1,0	105	100	110	107	108	110	105
	2,0	97	87	89	93	94	81	78
14 días	0,5	97	96	107	103	103	112	103
	1,0	106	99	113	107	111	112	106
	2,0	95	86	91	97	100	91	78

EJEMPLO 6

- 5 Se examinó el efecto sobre la toxicidad de partículas de HDL sintéticas reconstituidas usando diferentes detergentes.

Para preparar las partículas Amberlite XAD-2, se limpiaron cuentas por incubación en 20 % de metanol durante la noche y posteriormente se desinfectaron lavando cuatro veces con hidróxido sódico 1 M y dos veces con agua ultrapura. Antes de uso, las perlas se lavaron con 7,5 % de sacarosa y se secaron sobre un filtro.

- 10 Se prepararon las partículas de HDL sintéticas por el siguiente método. Se reconstituyeron partículas de HDL liofilizadas que contenían colato residual con WFI a una concentración de proteína de 30 g/l. Se añadieron perlas de Amberlite XAD-2 (10 g por g de proteína) a la preparación de HDL reconstituida y se incubaron a 2 - 8 °C durante 3,5 horas con agitación. Después de eliminar las perlas por filtración, se repitió este procedimiento una vez más con otra porción de perlas Amberlite XAD-2 (10 g perlas por g de proteína). Entonces, las perlas se eliminaron por filtración y se añadió detergente (colato, desoxicolato, octilglucósido, Polisorbato 80) para obtener una concentración de detergente final de 1 g/l o 6 g/l.

Entonces, las muestras se probaron para estabilidad como se determinó en el ejemplo anterior.

- 20 Para las preparaciones de polisorbato 80, se determinó el nivel de detergente por un ensayo fotométrico: Se precipitó la proteína en 1000 µl de muestra con 5 ml de acetato de amonio 0,1 M y se sedimentó por centrifugación. El sobrenadante se evaporó a sequedad y se redisolvió en 1 ml de tapón de tetraborato de sodio a pH 9,1 (0,953 g de tetraborato de sodio hasta 100 ml con H₂O, añadir 10 ml de HCl), se añadieron 4 ml de disolución de TBPE-K (1,76 g de cloruro de potasio, 0,48 g de tetraborato de sodio, 4800 µl de KOH 0,1 M, 0,015 g de TBPE-K en 5 ml de etanol, hasta 100 ml con H₂O) y se extrajeron con 2,5 ml de diclorometano en una mezcladora extremo sobre extremo durante 30 min. Después de la separación de fases, se midió la absorción de la fase de diclorometano a 611 nm (longitud de onda de referencia 700 nm).

Un resumen de las características de las partículas de HDL sintéticas que contienen diferentes relaciones de fosfolípido con respecto a proteína se proporcionan en la Tabla 10. El % de transmisión y los valores de LCAT indican que las partículas fueron estables y funcionales.

- 30 Los resultados de HPLC-SEC indicaron que las partículas con los diferentes detergentes eluyeron como un único pico simétrico. Esto también se reflejó en los patrones de banda observados en Native PAGE. La SDS-PAGE fue similar para todas las muestras. Los resultados de ensayo *in vitro* indicaron que la viabilidad celular varió dependiendo del nivel de detergente presente. Particularmente, altos niveles de detergente produjeron viabilidad celular reducida. Sin embargo, los valores permanecieron estables durante el periodo de 14 días (véase la Tabla 11).

Tabla 10: Resumen de características de las partículas de HDL sintéticas con diferentes detergentes.

Muestra	Tiempo (días)	Apo A-I (mg/ml)	Proteína (mg/ml)	Fosfolípido (g/l)	Relación	Colato (g/l)	LCA T (% de ref)	LCA T	Transmisión	Endotoxina (UE/mg)
Polisorbato 1 g/l	t=0	21,24	20,98	37,28	64	-	97	83	65,4	0,0
	t=5	-	-	-	-	-	97	80	62,9	0,0
	t=14	22,07	-	-	-	-	103	82	65,6	0,0
Polisorbato 6 g/l	t=0	21,42	21,09	38,10	65	-	108	85	63,8	0,0
	t=5	-	-	-	-	-	114	83	59,2	0,1
	t=14	20,71	-	-	-	-	131	94	63,9	0,0
Desoxicolato 1 g/l	t=0	21,26	20,94	36,42	63	1,3	104	86	68,5	0,0
	t=5	-	-	-	-	-	103	89	65,8	0,0
	t=14	23,08	-	-	-	-	113	89	66,2	0,1
Desoxicolato 6 g/l	t=0	19,79	21,39	37,92	64	6,1	113	101	69,0	0,0
	t=5	-	-	-	-	-	118	101	65,8	0,0
	t=14	20,63	-	-	-	-	126	103	64,1	0,0
Octilglucósido 1 g/l	t=0	16,33	21,39	35,38	60	-	91	80	63,4	0,0
	t=5	-	-	-	-	-	94	80	57,8	0,0
	t=14	22,34	-	-	-	-	99	81	62,7	0,0
Octilglucósido 6 g/l	t=0	20,75	20,94	35,66	62	-	113	93	62,4	0,0
	t=5	-	-	-	-	-	115	94	59,4	0,0
	t=14	21,9	-	-	-	-	127	102	55,9	0,0
Colato 1 g/l	t=0	22,25	21,24	36,52	62	1,4	101	88	68,2	0,0
	t=5	-	-	-	-	-	106	90	65,6	0,1
	t=14	22,54	-	-	-	-	115	86	66,4	0,0
Colato 6 g/l	t=0	21,54	21,13	34,66	59	7,2	122	106	67,8	0,0
	t=5	-	-	-	-	-	130	103	66,3	0,0
	t=14	22,43	-	-	-	-	140	114	163,1	0,0
* Celdas en blanco indican que no se obtuvieron datos.										

Tabla 11: Resumen del % de viabilidad de las partículas de HDL sintéticas en presencia de diferentes detergentes.

Día	Conc. de HDL (mg/ml)	Colato (1 g/l)	Colato (6 g/l)	Octilglucósido (1/L)	Octilglucósido (6 g/l)	Desoxicolato (1 g/l)	Desoxicolato (6 g/l)	PS80 (1 g/l)	PS80 (6 g/l)
0	0,5	90	90	99	56	98	32	95	74
	1,0	81	72	86	21	76	7	79	31
	2,0	55	32	26	5	39	5	43	7
5	0,5	88	90	103	56	95	35	97	73
	1,0	80	68	88	18	75	6	83	25
	2,0	58	30	35	5	44	5	41	5
14	0,5	91	92	89	56	96	32	95	72
	1,0	84	70	86	17	76	10	85	23
	2,0	56	31	49	5	40	5	44	5

EJEMPLO 7

Se prepararon partículas de HDL sintéticas como se describe en el Ejemplo 5 anterior con la excepción de que se usó POPC (NOF Corporation) para reconstituir las partículas de HDL. Las partículas se examinaron entonces por los métodos descritos en el Ejemplo 5.

- 5 Los resultados indican un producto estable/funcional que presenta propiedades de toxicidad similares a las partículas de HDL sintéticas reconstituidas con fosfatidilcolina de soja (Tablas 12 y 13).

Tabla 12: Resumen de las características de las partículas de HDL sintéticas

Muestra	Tiempo (días)	Apo (mg/ml)	A-I (mg/ml)	Proteína (mg/ml)	Fosfolípido (g/l)	Relación	Colato (g/l)	LCAT (% de ref)	Transmisión (%)
PC, 1:55	t=0	23,27		23,1	32,1	50	1,2	85	69,7
	t=5	-		-	-	-	-	83	69,9
	t=14	20,90		-	-	-	-	87	69,9
POPC, 109	t=0	21,55		22,1	30,4	50	1,2	151	72,0
	t=5	-		-	-	-	-	145	73,0
	t=14	19,90		-	-	-	-	149	72,2

* Celdas en blanco indican que no se obtuvieron datos.

Tabla 13: Resumen de % viabilidad de las partículas de HDL sintéticas en presencia de diferentes fosfolípidos.

	Conc. de HDL (mg/ml)	PC de soja	POPC
0 días	0,5	102	101
	1,0	97	101
	2,0	63	63
5 días	0,5	104	113
	1,0	96	99
	2,0	62	59
14 días	0,5	105	112
	1,0	96	92
	2,0	60	53

10

EJEMPLO 8

- La seguridad y tolerancia y la farmacocinética de dosis en aumento de las formulaciones de HDL reconstituidas de la invención puede evaluarse por tanto infusiones intravenosas individuales como múltiples en voluntarios sanos. El estudio tiene dos brazos con uno que implica el uso de las partículas de HDL sintéticas en dosis en aumento y el otro que implica el uso de un comparador de placebo de solución salina normal (0,9 %). Las infusiones serán aleatorizadas y de doble ciego (sujeto, investigador y asesor de resultados).

- Los voluntarios sanos pueden ser tanto hombres como mujeres de edades de 18 años a 55 años y que pesan al menos 45 kg. Otros criterios de entrada pueden incluir un índice de masa corporal (IMC) de entre 18 y 42,0 kg/m². Los criterios de exclusión pueden incluir i) evidencia de una afección médica clínicamente significativa, trastorno o enfermedad; ii) evidencia de enfermedad hepatobiliar; iii) evidencia de resultados de pruebas de laboratorio anormales clínicamente relevantes; y iv) evidencia de historia de abuso de alcohol o de sustancias.

- La seguridad y tolerabilidad se medirán por i) la frecuencia de acontecimientos adversos clínicos relacionados con el fármaco hasta 14 días después de la infusión; y ii) medición de las pruebas de la función hepática hasta 14 días

después de la infusión (por ejemplo, elevación de alanina aminotransferasa (ALT) o aspartato aminotransferasa (AST)). La información farmacocinética puede medirse hasta 10 días después de la infusión de las partículas de HDL sintéticas. Mediciones particulares incluirán determinar los niveles en plasma de lipoproteína.

CONCLUSIÓN

- 5 Se han evaluado realizaciones de una formulación de HDLr de la invención y una formulación de CSL111 para probar si la formulación de HDLr de la invención tiene un perfil de toxicidad mejorado, pero conservó la actividad biológica. La formulación de HDLr de la invención tiene una relación de Apo-AI con respecto a PC reducida de 1:40 o 1:55 mientras que CSL111 tiene una relación de 1:150. Además, más esfuerzos de purificación han conducido a una reducción sustancial de colato en la formulación. Como consecuencia, la formulación de HDLr de la invención
- 10 presenta una toxicidad hepática reducida en comparación con CSL111. Y, lo que es más importante, los niveles en suero de Apo-AI fueron similares para ambas formulaciones, que indica exposición similar al componente activo (véase la Tabla 7).

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de lipoproteína de alta densidad reconstituida (HDLr) que comprende una apolipoproteína o fragmento de la misma; un fosfolípido; y una sal biliar o ácido biliar a un nivel que es aproximadamente 0,5 -1,5 g/l.
- 5 2. La formulación de HDLr de la reivindicación 1, en la que el nivel de sal biliar o ácido biliar es aproximadamente 0,015-0,030 g/g de apolipoproteína.
3. La formulación de HDLr de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la sal biliar o ácido biliar es colato de sodio.
4. La formulación de HDLr de cualquier reivindicación precedente, en la que la apolipoproteína es Apo-AI o un fragmento de la misma.
- 10 5. La formulación de HDLr de cualquier reivindicación precedente, en la que el fosfolípido es fosfatidilcolina.
6. La formulación de HDLr de cualquier reivindicación precedente, en la que la formulación comprende además un estabilizador.
- 15 7. Un método de producción de una formulación de HDLr que comprende una apolipoproteína; un fosfolípido; y un detergente, incluyendo dicho método la etapa de proporcionar dicha sal biliar o ácido biliar a un nivel que es aproximadamente 0,5 -1,5 g/l de la formulación de HDLr.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el nivel de sal biliar o ácido biliar es aproximadamente 0,015-0,030 g/g de apolipoproteína.
9. El método de la reivindicación 7 u 8, en el que la sal biliar es colato de sodio.
- 20 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que la apolipoproteína es Apo-AI o un fragmento de la misma.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que el fosfolípido es fosfatidilcolina.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, que incluye las etapas de:
 - (A) añadir fosfatidilcolina sin disolvente orgánico y un detergente de colato a una disolución de Apo-AI;
 - 25 (B) reducir el nivel de detergente de colato en la disolución producida en la etapa (A) a aproximadamente 0,03 g/g de Apo-AI;
 - (C) añadir un estabilizador a la disolución en la etapa (B).
13. Una formulación de HDLr obtenible según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12.
14. Una formulación de HDLr según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un ser humano.
- 30 15. Una formulación de HDLr para su uso según la reivindicación 14, en la que la enfermedad, trastorno o afección incluye enfermedad cardiovascular, hipercolesterolemia o hipocolesterolemia.
16. Una formulación de HDLr para su uso según la reivindicación 15, en la que la enfermedad, trastorno o afección incluye síndrome coronario agudo (SCA), aterosclerosis e infarto de miocardio.

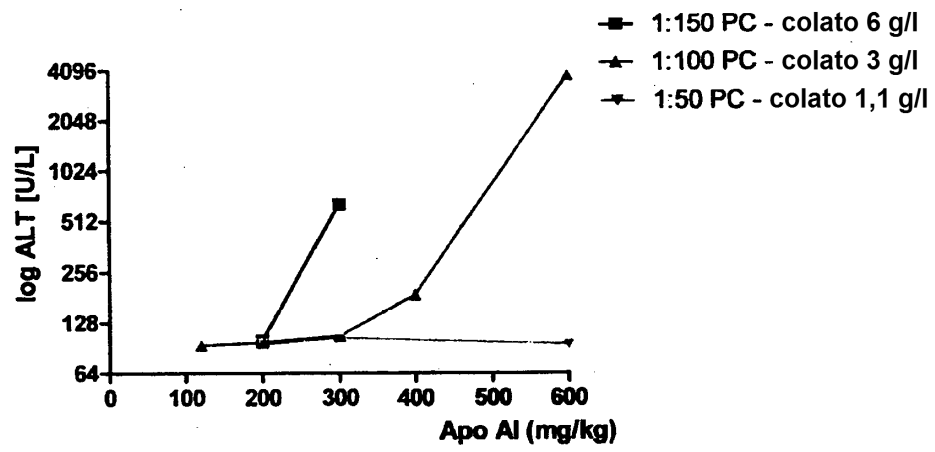


Figura 1

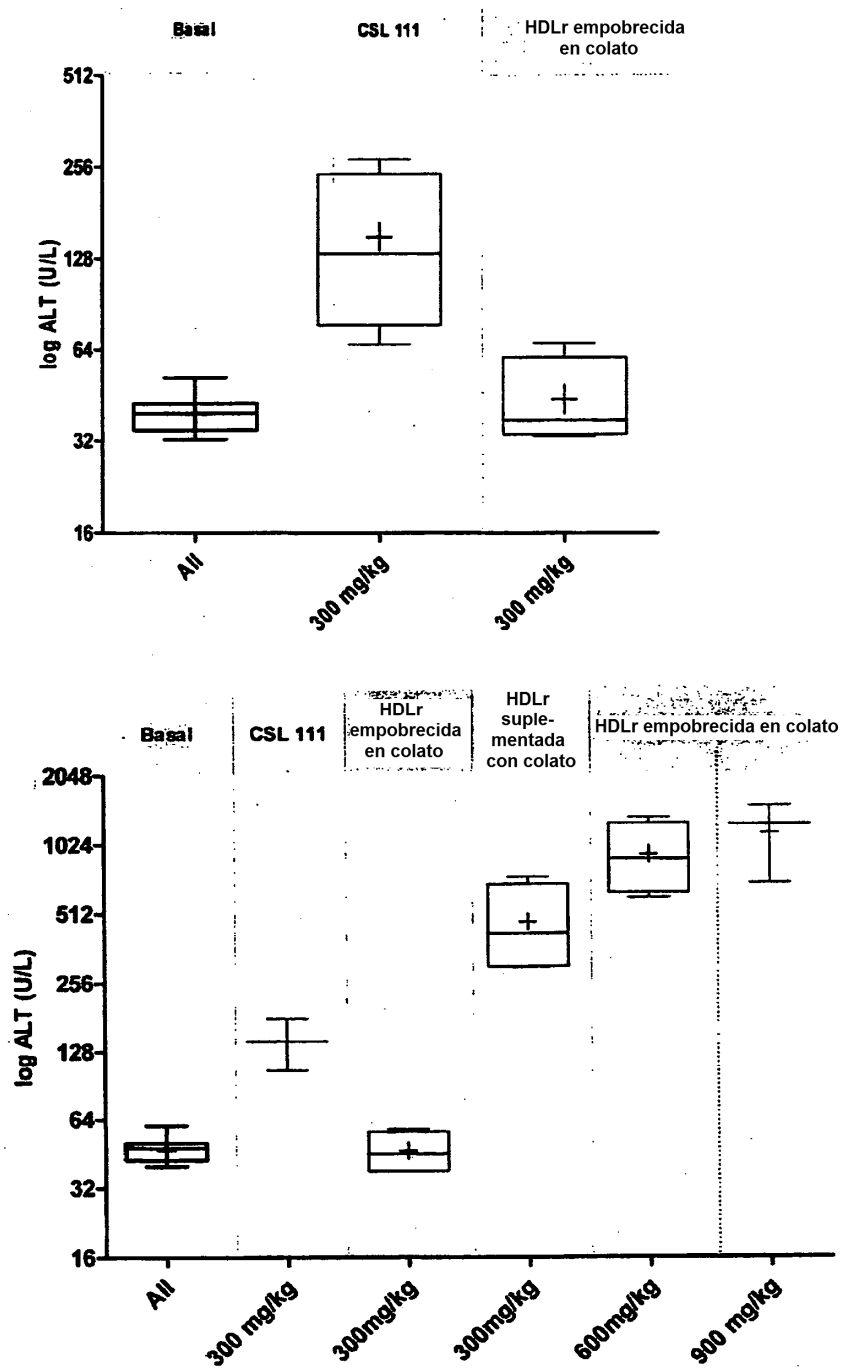


Figura 2

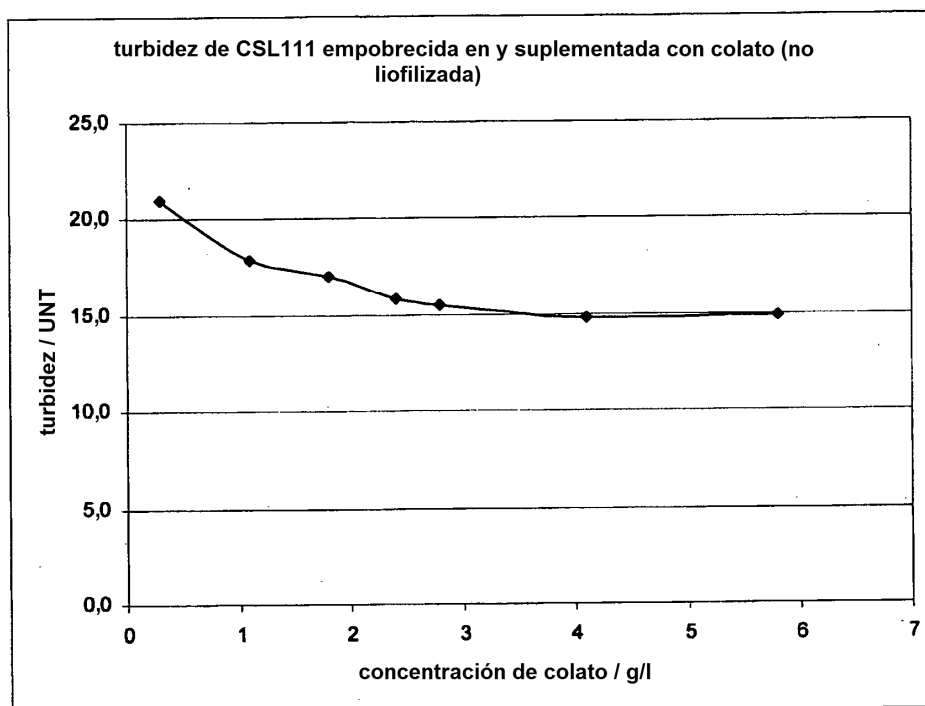


Figura 3

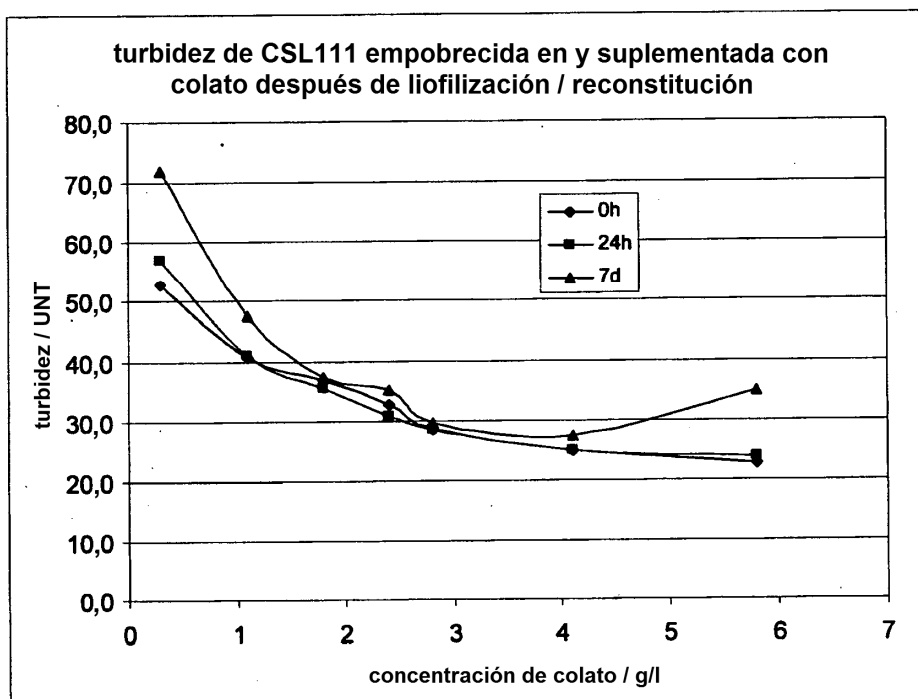


Figura 4

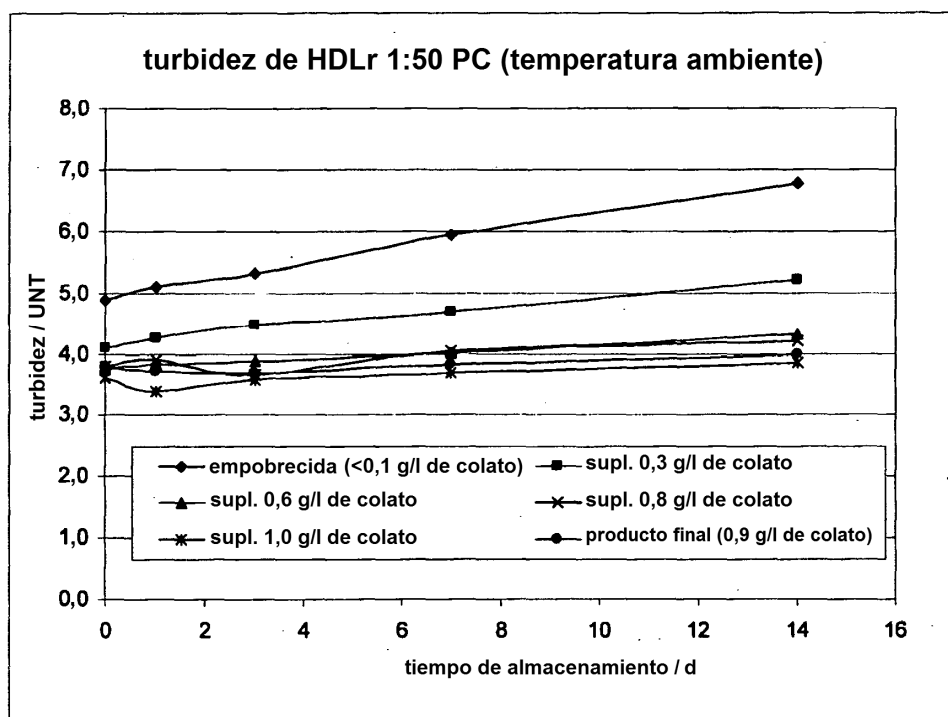


Figura 5

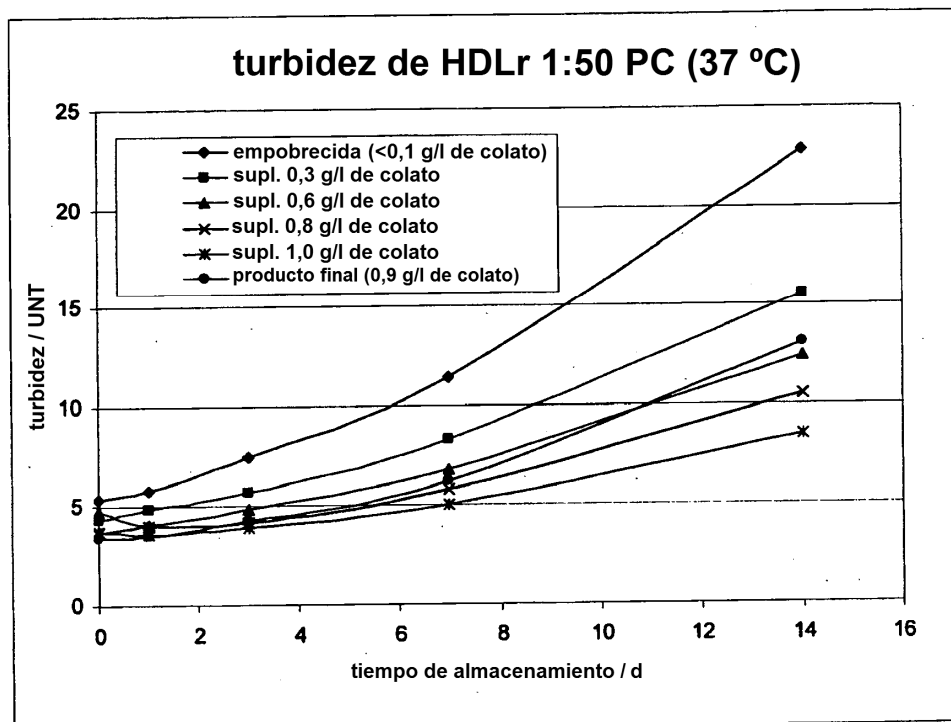


Figura 6

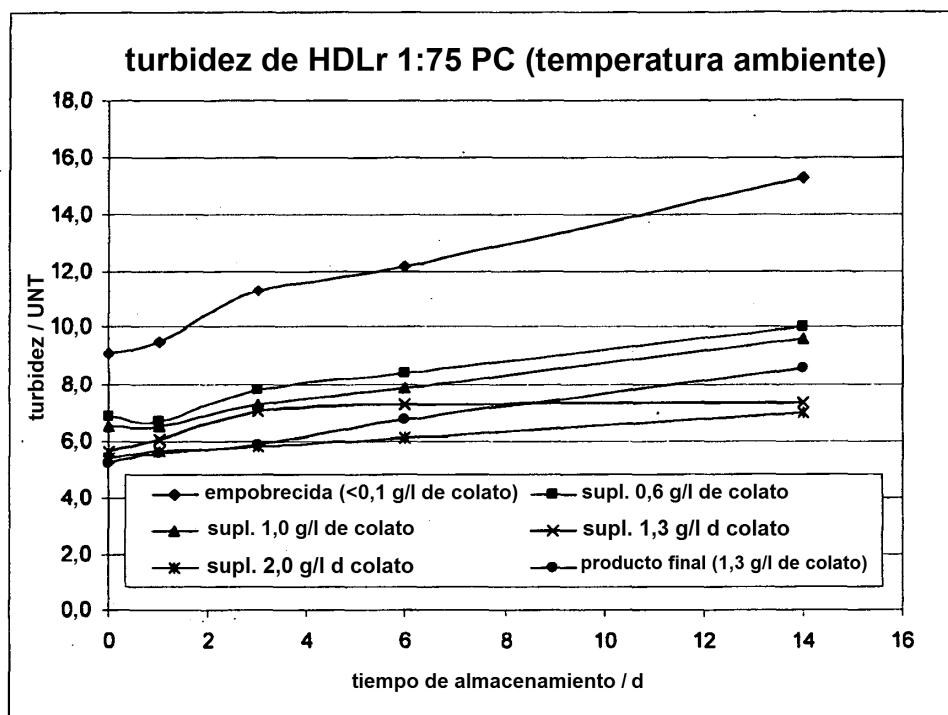


Figura 7

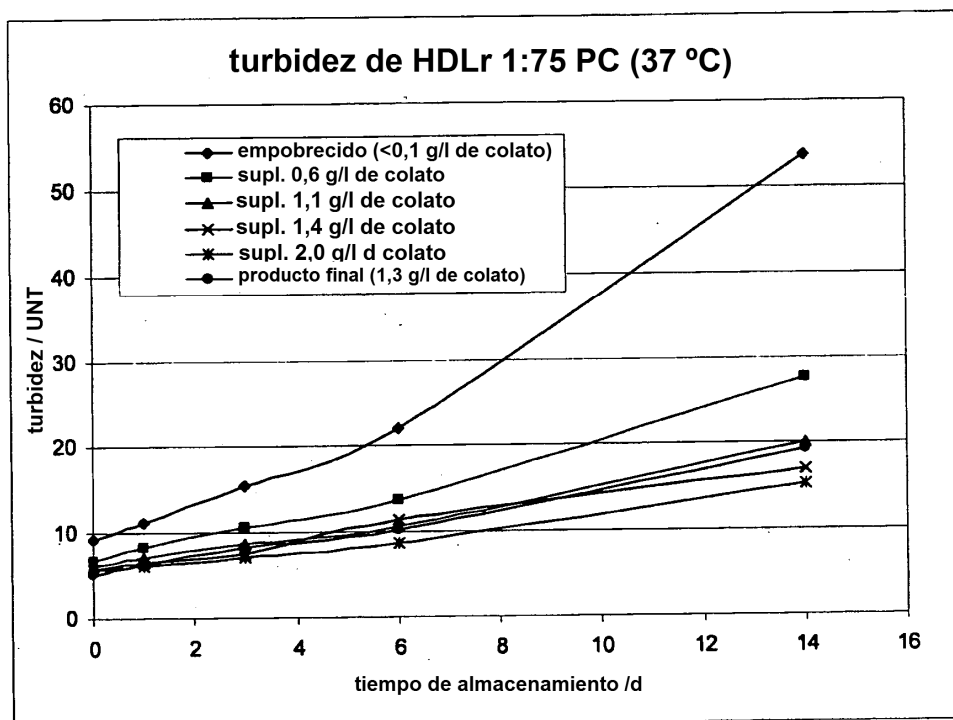


Figura 8

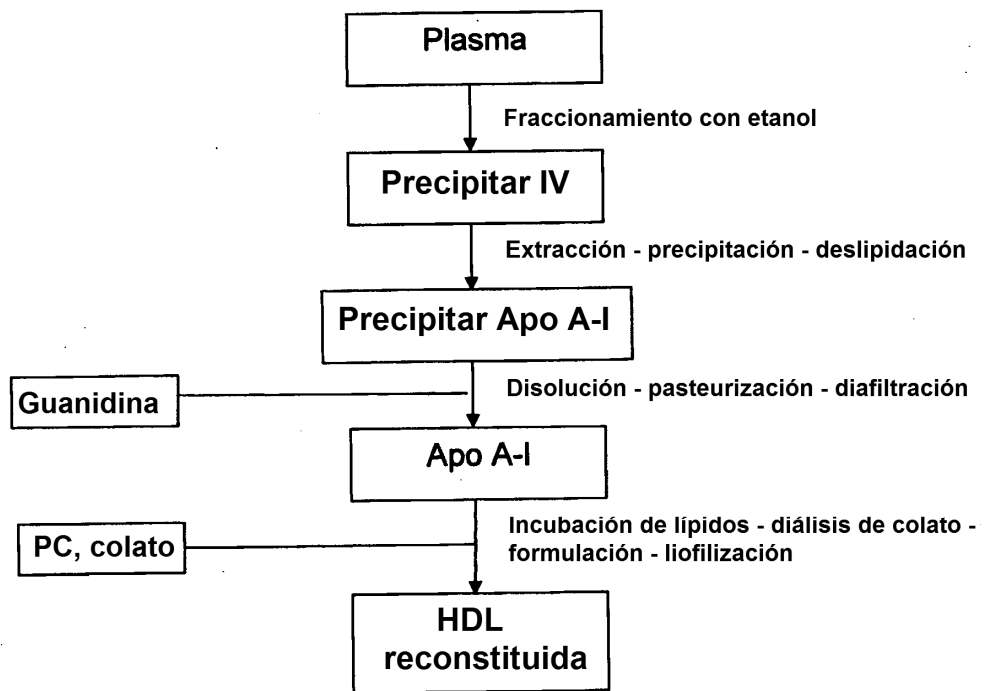


Figura 9