

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 496**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 7/00** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2004 PCT/US2004/006988**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2005 WO05011620**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2004 E 04718501 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 1641421**

54 Título: **Métodos y aparatos para crear derivados de partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos**

30 Prioridad:

**03.07.2003 US 484690 P**

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

**04.06.2019**

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:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 715 496 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

Métodos y aparatos para crear derivados de partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos

**Campo de la invención**

5 La presente invención, como se define en las reivindicaciones, se refiere en general a métodos para eliminar los lípidos de las partículas de HDL dejando las partículas de LDL sustancialmente intactas, por medio del tratamiento extracorpóreo del plasma sanguíneo utilizando un solo disolvente o múltiples disolventes. El método de la presente invención proporciona un procedimiento para la eliminación selectiva de lípidos de HDL a fin de crear una partícula de HDL modificada, dejando las partículas de LDL sustancialmente intactas. El método de la presente invención proporciona un procedimiento para eliminar las partículas de LDL del plasma antes de tratar las partículas de HDL para eliminar los lípidos. Esta invención crea partículas que comprenden HDL modificadas que se pueden administrar a un animal o ser humano para uso terapéutico, tales como el tratamiento de la arteriosclerosis y enfermedades vasculares ateroscleróticas en un animal o ser humano.

10  
15 Cualquier referencia en la siguiente descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la invención presente para uso en un método para el tratamiento de un cuerpo humano o animal mediante terapia.

**Antecedentes de la invención***Introducción: hiperlipidemia y arteriosclerosis*

20 Las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y vasculares periféricas son responsables de un número significativo de muertes anuales en muchos países industrializados. Uno de los procesos patológicos más comunes que subyacen a estas enfermedades es la arteriosclerosis. La arteriosclerosis se caracteriza por lesiones, que comienzan como engrosamientos grasos localizados en los aspectos internos de los vasos sanguíneos que suministran sangre al corazón, cerebro y otros órganos y tejidos en todo el cuerpo. Con el tiempo, estas lesiones ateroscleróticas pueden ulcerarse, exponiendo depósitos de placa grasa que pueden desprenderse y embolizarse dentro de la circulación. Las lesiones ateroscleróticas obstruyen los lúmenes de los vasos sanguíneos afectados y, a menudo, reducen el flujo sanguíneo dentro de los vasos sanguíneos, lo que puede resultar en isquemia del tejido irrigado por el vaso sanguíneo. La embolización de las placas ateroscleróticas puede producir obstrucción aguda e isquemia en los vasos sanguíneos distales. Dicha isquemia, ya sea prolongada o aguda, puede provocar un ataque cardíaco o un derrame cerebral del cual el paciente puede o no recuperarse. Una isquemia similar en una arteria que irriga una extremidad puede ocasionar gangrena que requiera amputación de la extremidad.

30 Durante algún tiempo, la comunidad médica ha reconocido la relación entre la arteriosclerosis y los niveles de lípidos en la dieta, colesterol en suero, y triglicéridos en suero dentro del torrente sanguíneo de un paciente. Se han realizado muchos estudios epidemiológicos que revelan que la cantidad de colesterol sérico en el torrente sanguíneo de un paciente es un factor predictivo importante de enfermedad coronaria. De manera similar, la comunidad médica ha reconocido la relación entre la hiperlipidemia y la resistencia a la insulina, que puede conducir a la diabetes mellitus. Además, la hiperlipidemia y la arteriosclerosis se han identificado como relacionadas con otros problemas de salud importantes, tales como la obesidad y la hipertensión.

*Transporte del colesterol*

40 El colesterol que circula en la sangre es transportado por las lipoproteínas del plasma que transportan los lípidos a través de la sangre. Las lipoproteínas plasmáticas se clasifican en cinco tipos según el tamaño: quilomicrones (que son más grandes en tamaño y más bajas en densidad), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (que son las más pequeñas y densas). Estas lipoproteínas plasmáticas exhiben diferencias en tamaño, densidad, diámetro, contenido de proteína, contenido de fosfolípidos y contenido de triacilglicerol, conocidas por los expertos en la técnica. De estas, la lipoproteína de baja densidad (LDL) y la lipoproteína de alta densidad (HDL) son principalmente las proteínas transportadoras del colesterol más importantes. El componente proteico de LDL, la apolipoproteína B (Apo B) y sus productos comprenden los elementos aterogénicos. Los niveles elevados de LDL en plasma y los niveles reducidos de HDL se reconocen como la causa principal de la enfermedad coronaria ya que la Apo B está en la concentración más alta en partículas de LDL y no está presente en las 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. Apo C y Apo E también se observan en partículas de LDL.

55 Se ha informado sobre numerosas clases principales de partículas HDL, incluyendo HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub> (Segrest et al., Curr. Opin. Lipidol. 11:105-115, 2000). Se han descrito varias formas de partículas de HDL en base a su movilidad electroforética en agarosa como de dos poblaciones principales, una fracción importante con movilidad  $\alpha$ -HDL y una fracción menor con migración similar a VLDL (Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1996). Esta última fracción se ha denominado pre- $\beta$  HDL y se cree que estas partículas son la subclase de partículas HDL más eficiente en inducir el flujo de salida del colesterol celular (Segrest et al., Curr. Opin. Lipidol.

11:105-115, 2000). Las partículas pre- $\beta$  HDL se han separado aún más en pre- $\beta_1$  HDL, pre- $\beta_2$  HDL y pre- $\beta_3$  HDL. Estas partículas de lipoproteínas comprenden Apo A-1, fosfolípidos y colesterol libre. Las partículas pre- $\beta$  HDL se considera que son los primeros aceptores del colesterol libre celular y son esenciales para la transferencia eventual del colesterol libre y esterificado a  $\alpha$ -HDL (Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1996). Las partículas pre- $\beta_3$  HDL pueden transferir el colesterol a  $\alpha$ -HDL o convertirse en  $\alpha$ -HDL. Estas partículas pre- $\beta$  HDL se han caracterizado en términos de su carga, masa molecular (que varía de 40 kDa - 420 kDa), tamaño (radio de Stoke de 4 nm - 15 nm), forma (elipsoidal, discoidal o esférica) y composición química (proteína (incluyendo Apo A-1), colesterol libre, colesterol esterificado, fosfolípidos y la proporción de colesterol libre a fosfolípidos) (véase Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1996 para detalles adicionales). Los niveles de HDL se correlacionan inversamente con la aterosclerosis y la enfermedad arterial coronaria. Por consiguiente, lo que se necesita es un método para disminuir o eliminar el colesterol de estas diversas partículas de HDL, especialmente las partículas pre- $\beta$  HDL, para que estén disponibles para eliminar el colesterol adicional de las células.

El colesterol es sintetizado por el hígado u obtenido de fuentes dietéticas. LDL es responsable de transferir el colesterol del hígado a los tejidos en diferentes sitios del cuerpo. Sin embargo, si las LDL se acumulan en las paredes arteriales, sufren la oxidación causada por los radicales libres de oxígeno liberados de los procesos químicos del cuerpo e interactúan de forma perjudicial con los vasos sanguíneos. La LDL modificada hace que los glóbulos blancos del sistema inmunitario se acumulen en las paredes arteriales, formando una sustancia grasa llamada placa e hiriendo las capas celulares que recubren los vasos sanguíneos. La LDL oxidada modificada también reduce el nivel de óxido nítrico, que es responsable de relajar los vasos sanguíneos y de esta forma permitir que la sangre fluya libremente. A medida que este proceso continúa, las paredes arteriales se contraen lentamente, lo que provoca el endurecimiento de las arterias y, por lo tanto, reduce el flujo sanguíneo. La acumulación gradual de placa puede provocar el bloqueo de un vaso coronario y, en última instancia, un ataque cardíaco.

A diferencia de LDL, los niveles altos de HDL en plasma son deseables porque desempeña un papel importante en el "transporte inverso del colesterol", mediante el cual el exceso de colesterol se transfiere de los tejidos al hígado, donde se cataboliza y se elimina. Los niveles óptimos de colesterol total son de 200 mg/dl o menos, con un nivel de colesterol LDL de 160 mg/dl o inferior y un nivel de colesterol HDL de 45 mg/dl para hombres y 50 mg/dl para mujeres. Se recomiendan niveles más bajos de LDL para las personas con antecedentes de colesterol elevado, aterosclerosis o enfermedad de las arterias coronarias.

#### *Métodos actuales de tratamiento*

La hiperlipidemia se puede tratar cambiando la dieta de un paciente. Sin embargo, la dieta como modo primario de terapia requiere un gran esfuerzo por parte de los pacientes, médicos, nutricionistas, dietistas y otros profesionales de la salud y, por lo tanto, grava de forma no deseable los recursos de los profesionales de la salud. Otro aspecto negativo de esta terapia es que su éxito no se basa exclusivamente en la dieta. Más bien, el éxito de la terapia dietética depende de una combinación de factores sociales, psicológicos, económicos y de comportamiento. Por lo tanto, la terapia basada solo en la corrección de fallos dentro de la dieta de un paciente no siempre es exitosa.

En los casos en que la modificación de la dieta no ha tenido éxito, la terapia con medicamentos se ha utilizado como alternativa. Dicha terapia ha incluido el uso de fármacos hipolipidémicos disponibles comercialmente, administrados solos o en combinación con otras terapias como suplemento del control dietético. Estos medicamentos, llamados estatinas, incluyen estatinas naturales, lovastatina, pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina. Las estatinas son particularmente efectivas para disminuir los niveles de LDL y también son efectivas en la reducción de triglicéridos, aparentemente en proporción directa a sus efectos reductores de LDL. Las estatinas aumentan los niveles de HDL, pero en menor medida que otros medicamentos contra el colesterol. Las estatinas también aumentan el óxido nítrico, que, como se describió anteriormente, se reduce en presencia de LDL oxidada.

Las resinas de ácidos biliares, otra terapia con medicamentos, funcionan mediante la unión con el ácido biliar, una sustancia producida por el hígado que utiliza el colesterol como uno de los principales componentes de fabricación. Debido a que estos medicamentos se unen a los ácidos biliares en el tracto digestivo, se excretan con las heces en lugar de ser absorbidos por el cuerpo. Como resultado, el hígado debe tomar más colesterol de la circulación para continuar construyendo ácidos biliares, lo que resulta en una disminución general de los niveles de LDL.

El ácido nicotínico, o niacina, también se conoce como vitamina B<sub>3</sub>. Es extremadamente eficaz para reducir los niveles de triglicéridos y elevar los niveles de HDL más altos que cualquier otro medicamento contra el colesterol. El ácido nicotínico también reduce el colesterol LDL.

Los derivados del ácido fibrótico, o fibratos, se usan para disminuir los niveles de triglicéridos y aumentar el HDL cuando otros medicamentos que se usan habitualmente para estos fines, tal como la niacina, no son efectivos.

Probucol reduce los niveles de colesterol LDL, sin embargo, también reduce los niveles de HDL. Generalmente se usa para ciertos trastornos genéticos que causan niveles altos de colesterol, o en casos donde otros medicamentos para reducir el colesterol son ineficaces o no se pueden usar.

Los medicamentos hipolipidémicos han tenido diversos grados de éxito en la reducción de los lípidos en la sangre; sin embargo, ninguno de los medicamentos hipolipidémicos trata con éxito todos los tipos de hiperlipidemia. Si bien

algunos medicamentos hipolipidémicos han tenido bastante éxito, la comunidad médica no ha encontrado ninguna evidencia concluyente de que los medicamentos hipolipidémicos causen la regresión de la aterosclerosis. Además, todos los medicamentos hipolipidémicos tienen efectos secundarios indeseables. Como resultado de la falta de éxito del control dietético, la terapia con medicamentos y otras terapias, la aterosclerosis sigue siendo una causa importante de muerte en muchas partes del mundo.

Se han utilizado nuevas terapias para reducir la cantidad de lípidos en pacientes para quienes las terapias con medicamentos y dietas no fueron lo suficientemente eficaces. Por ejemplo, se han empleado procedimientos extracorpóreos como la plasmaféresis y la aféresis de LDL y se ha mostrado que son eficaces para reducir LDL.

La terapia de plasmaféresis o terapia de intercambio de plasma implica reemplazar el plasma de un paciente con el plasma de un donante o, más generalmente, con una fracción de proteínas plasmáticas. La plasmaféresis es un proceso mediante el cual el plasma sanguíneo es eliminado de las células sanguíneas por un separador de células. El separador funciona al girar la sangre a alta velocidad para separar las células del fluido o al pasar la sangre a través de una membrana con poros tan pequeños que solo el componente fluido de la sangre puede pasar a través de ellos. Las células se devuelven a la persona que recibe el tratamiento, mientras que el plasma se desecha y se reemplaza con otros líquidos.

Este tratamiento ha resultado en complicaciones debido a la introducción de proteínas extrañas y la transmisión de enfermedades infecciosas. Además, la plasmaféresis tiene la desventaja de la eliminación no selectiva de todas las proteínas séricas, tales como VLDL, LDL y HDL. Además, la plasmaféresis puede provocar varios efectos secundarios que incluyen reacciones alérgicas en forma de fiebre, escalofríos y erupciones, y posiblemente incluso anafilaxia.

Como se describió anteriormente, no es deseable eliminar HDL, que se secreta tanto del hígado como del intestino en forma de partículas nacientes en forma de disco que contienen colesterol y fosfolípidos. Se cree que HDL desempeña un papel en el transporte inverso del colesterol, que es el proceso por el cual el exceso de colesterol se elimina de los tejidos y se transporta al hígado para su reutilización o eliminación en la bilis.

En contraste con la plasmaféresis, el procedimiento de la aféresis de LDL elimina de forma selectiva las Apo B que contienen colesterol, tal como LDL, mientras que retiene HDL. Se han desarrollado varios métodos para la aféresis de LDL. Estas técnicas incluyen la absorción de LDL en perlas de heparina-agarosa, el uso de anticuerpos LDL inmovilizados, la absorción por filtración en cascada para inmovilizar sulfato de dextrano y la precipitación de LDL a bajo pH en presencia de heparina. Cada método descrito anteriormente es eficaz para eliminar LDL. Sin embargo, este proceso de tratamiento tiene desventajas, como el hecho de no afectar positivamente a HDL o causar un cambio metabólico que pueda aumentar la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares. Con la aféresis de LDL simplemente se trata a pacientes con hiperlipidemia grave.

Otro método más para lograr una reducción del colesterol plasmático en la hipercolesterolemia familiar homocigótica, la hipercolesterolemia familiar heterocigótica y los pacientes con hiperlipidemia adquirida, es un proceso de eliminación de lípidos extracorpóreo, conocido como aféresis del colesterol. En la aféresis del colesterol, la sangre se extrae de un paciente, el plasma se separa de la sangre y el plasma se mezcla con una mezcla de disolventes. La mezcla de disolventes extrae los lípidos del plasma. Posteriormente, el plasma deslipidado se recombina con las células sanguíneas del paciente y se devuelve al paciente.

Sin embargo, los procesos convencionales de deslipidación extracorpórea se dirigen hacia la deslipidación simultánea de LDL y HDL. Este proceso puede tener una serie de desventajas. Debido a que LDL es más difícil de deslipidar, los sistemas extracorpóreos están diseñados para someter los volúmenes de fluidos corporales a un procesamiento sustancial, posiblemente a través de múltiples etapas de exposición a disolventes y múltiples etapas de extracción. La exposición y extracción con disolventes en varias etapas vigorosas puede tener varios inconvenientes. Puede ser difícil eliminar una cantidad suficiente de disolventes del plasma deslipidado a fin de que el plasma deslipidado se pueda devolver con seguridad al paciente.

Por lo tanto, la aféresis y los sistemas extracorpóreos existentes para el tratamiento de los constituyentes del plasma tienen una serie de inconvenientes que limitan su capacidad para ser utilizados en aplicaciones clínicas. Existe la necesidad de sistemas, aparatos y métodos mejorados capaces de eliminar los lípidos de los componentes de la sangre a fin de proporcionar tratamientos y medidas preventivas para las enfermedades cardiovasculares. Lo que también se necesita es un método para eliminar de manera selectiva los lípidos de las partículas de HDL y, por lo tanto, crear partículas de HDL modificadas con mayor capacidad para aceptar el colesterol. Lo que también se necesita es un método para eliminar de manera selectiva los lípidos de las partículas de HDL y, por lo tanto, crear partículas de HDL modificadas con mayor capacidad para aceptar el colesterol, sin afectar sustancialmente las partículas de LDL.

#### **Compendio de la invención**

La presente invención, como se define en las reivindicaciones, está dirigida a métodos para crear partículas de HDL modificadas sin afectar sustancialmente a las de LDL. Estas partículas de HDL modificadas son derivados de HDL con un contenido reducido de lípidos, particularmente un contenido de colesterol reducido. Estas partículas de HDL modificadas tienen la capacidad de unirse al colesterol y pueden administrarse a un paciente para mejorar el flujo de

salida del colesterol celular y reducir los niveles de colesterol en células, tejidos, órganos y vasos sanguíneos.

5 La presente invención también proporciona un fluido biológico que comprende una distribución de proteínas modificada en donde el fluido biológico tuvo un primer estado, el primer estado con alfa lipoproteínas de alta densidad y pre-beta lipoproteínas de alta densidad, y en donde el fluido biológico tiene un segundo estado, segundo estado que tiene una concentración aumentada de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con el primer estado, después de haber sido expuesto a un agente de eliminación de lípidos.

10 La presente invención también proporciona un fluido biológico capaz de mejorar una ruta ABCA1 de un paciente en donde el fluido biológico se manufactura modificando un fluido que tiene una primera concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con la proteína total, en donde la modificación aumenta la concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con la proteína total.

15 La presente invención proporciona además un método para mejorar una ruta ABCA1 de un paciente con una primera distribución de proteínas, teniendo la primera distribución de proteínas una concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad con respecto a la proteína total, que comprende la etapa de modificar un fluido que contiene la primera distribución de proteínas mediante la exposición del fluido a un agente de eliminación de lípidos, en donde la modificación aumenta la concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con la proteína total, e introduciendo el fluido en un paciente.

20 La presente invención proporciona además un método para modificar una distribución de proteínas en un fluido en donde la distribución de proteínas tiene un primer estado, teniendo dicho primer estado alfa lipoproteínas de alta densidad y pre-beta lipoproteínas de alta densidad, que comprende las etapas de: exponer dicho fluido a una agente de eliminación de lípidos en donde la exposición modifica la distribución de proteínas del primer estado a un segundo estado, teniendo dicho segundo estado una concentración incrementada de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con dicho primer estado; y eliminar dicho agente de eliminación de lípidos del fluido biológico.

25 La presente invención divulga un método para eliminar los lípidos de fluidos, tales como el plasma sanguíneo, y de las partículas de HDL sin afectar sustancialmente a LDL mediante el tratamiento del fluido con disolventes y adición de energía para mezclar los disolventes y el fluido. La eliminación de los lípidos de las partículas de HDL crea una partícula de HDL modificada con un contenido de lípidos reducido, que es capaz de unirse a lípidos adicionales y mejorar el flujo de salida del colesterol celular. Más particularmente, la presente invención está dirigida a la eliminación de lípidos de partículas de HDL en plasma sanguíneo utilizando un solo disolvente o múltiples disolventes, creando así nuevas partículas que son derivados de HDL con un contenido reducido de lípidos.

30 En una realización, las partículas de LDL y HDL se separan antes del tratamiento del plasma que contiene las partículas de HDL. Se extrae LDL y se trata el plasma para reducir el contenido de lípidos de las partículas de HDL. Posteriormente a la eliminación de LDL, el plasma que contiene partículas de HDL se expone a los agentes de eliminación de lípidos utilizando los métodos actuales para reducir los niveles de lípidos y así se crean derivados de partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos. Estas partículas demuestran una capacidad mejorada para unirse al colesterol. Estos derivados de partículas de HDL y el plasma con contenido reducido de lípidos pueden administrarse al paciente para mejorar el flujo de salida del colesterol celular y tratar enfermedades y afecciones asociadas con los lípidos.

35 En una realización de la presente invención, la LDL se retiene (no se separa antes del tratamiento) y se emplea un sistema de disolvente para eliminar selectivamente los lípidos de la HDL y crear partículas que comprenden derivados de HDL con un contenido reducido de lípidos, mientras que no se afecta sustancialmente a la LDL. El plasma separado se mezcla con un sistema de disolvente diseñado para disminuir selectivamente los lípidos en las partículas de HDL presentes en el plasma. Se tiene cuidado de garantizar que el disolvente empleado, el método de mezcla empleado, el procedimiento, el tiempo de mezclado y la temperatura creen un sistema de disolvente óptimo que eliminará selectivamente los lípidos de la HDL, creará partículas que comprenden derivados de la HDL y dejará la LDL sustancialmente intacta. El plasma al menos parcialmente o sustancialmente deslipidado, que se separó inicialmente, se trata adecuadamente después para su administración a un paciente.

40 La presente invención puede emplearse para tratar el plasma obtenido de un paciente para su posterior administración al paciente o para su 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 un contenido reducido de lípidos y que contiene partículas que comprenden derivados de HDL con un contenido reducido de lípidos. Este plasma tratado que contiene partículas que comprenden derivados de HDL con un contenido reducido de lípidos puede usarse para la administración heteróloga a otro individuo para aumentar el flujo de salida del colesterol en el paciente. La presente invención también puede emplearse para crear partículas que comprenden derivados de HDL con un contenido reducido de lípidos que pueden recogerse y almacenarse.

55 El presente método modifica varias formas de diferentes partículas de HDL. Dichas partículas de HDL incluyen, pero no se limitan a aquellas partículas de HDL que se han descrito en base a una variedad de métodos, tales como métodos que miden la carga, densidad, tamaño y inmunoafinidad, incluyendo, pero no limitado a la movilidad electroforética, ultracentrifugación, inmunorreactividad y otros métodos conocidos a un experto en la técnica. Dichas

partículas de HDL incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: VLDL,  $\alpha$  HDL, pre- $\beta$  HDL (incluidas pre- $\beta_1$  HDL, pre- $\beta_2$  HDL y pre- $\beta_3$  HDL),  $\beta$  HDL, HDL<sub>2</sub> (incluidas HDL<sub>2a</sub> y HDL<sub>2b</sub>), HDL<sub>3</sub>, VHDL, LpA-I, LpA-II, LpA-I/LpA-II (para una revisión, véase Barrans et al., *Biochemica Biophysica Acta* 1300; 73-85, 1996). Por consiguiente, la práctica de los métodos de la presente invención crea partículas de HDL modificadas como se define en las reivindicaciones.

- 5 Las partículas de HDL pueden modificarse de numerosas maneras, incluidas, pero no limitadas a cambios en una o más de las siguientes propiedades metabólicas y/o físico químicas: masa molecular (kDa); carga; diámetro; forma; densidad; densidad de hidratación; características de flotación; contenido de colesterol; contenido de colesterol libre; contenido de colesterol esterificado; proporción molar de colesterol libre a fosfolípidos; inmunofinidad; 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 del éster de colesterol (CETP), lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT); capacidad y/o tasa para la unión del colesterol, capacidad y/o tasa para el transporte del colesterol. Las propiedades físico químicas de las partículas de HDL son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las partículas pre- $\beta$  HDL se han caracterizado en términos de su carga, masa molecular (que varía de 40 kDa - 420 kDa), tamaño (radio de Stoke de 4 nm - 15 nm), forma (elipsoidal, discoidal o esférica) y composición química (proteína (incluida Apo A-1), colesterol libre, colesterol esterificado, fosfolípidos y la proporción de colesterol libre a fosfolípidos) (véase Barrans et al., *Biochemica Biophysica Acta* 1300; 73-85, 1996 para detalles adicionales).

La presente invención crea partículas de HDL modificadas sin afectar sustancialmente varias propiedades metabólicas y o físico químicas de las partículas de LDL.

- 20 En otro aspecto de la presente invención, las partículas derivadas de HDL modificadas fabricadas con el método divulgado se administran a un paciente para mejorar el flujo de salida del colesterol de las células. Estas partículas de HDL modificadas se pueden obtener del mismo paciente o de un paciente diferente que recibirá las partículas de HDL modificadas. Estas partículas pueden combinarse con el plasma tratado con los métodos de la presente invención y que contiene niveles sustancialmente reducidos de lípidos y luego administrarse a un paciente.

- 25 También se divulga en este documento una proteína Apo A-1 modificada producida tratando plasma con el método de la presente invención, en donde la proteína Apo A-1 modificada tiene un contenido reducido de lípidos. La proteína Apo A-1 modificada se purifica y se puede administrar a un paciente sola o en combinación con las partículas de HDL modificadas con un contenido reducido de lípidos para mejorar el flujo de salida del colesterol.

- 30 Estas partículas de HDL modificadas también se pueden combinar con plasma heterólogo tratado con los métodos de la presente invención y que contiene niveles sustancialmente reducidos de lípidos y luego se administran a un paciente. Estas partículas pueden combinarse con otros constituyentes del plasma y, opcionalmente, con glóbulos rojos antes de la administración en el sistema vascular. La administración de estas partículas ocurre tan frecuentemente como sea necesario para efectuar la salida del colesterol de las células.

- 35 Las partículas de HDL modificadas de la presente invención deben administrarse a pacientes para reducir los niveles celulares de colesterol, y están indicadas para una variedad de afecciones, que incluyen, pero no se limitan a, la aterosclerosis, arteriosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, obesidad, hipertensión, accidente cerebrovascular, neuroprotección después de un accidente cerebrovascular, inflamación, enfermedad de Alzheimer, diabetes, niveles bajos de HDL endógenos, niveles altos de LDL, enfermedad cardiovascular (incluida la aterosclerosis de las arterias coronarias, arterias carótidas, subclavia, braquial, aorta, iliaca, 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, cerebelosa y/o espinal, o cualquier rama de estas arterias, arterias del extremo cortical cerebral, o cualquiera otra arteria que abastece al sistema nervioso central).

- 45 Las partículas de HDL modificadas de la presente invención deben administrarse a un paciente según cualquier programa que sea eficaz para mejorar el flujo de salida del colesterol celular. En un ejemplo, un litro de plasma se trata con los métodos de la presente invención cada semana y el plasma tratado que contiene las partículas de HDL modificadas se devuelve al paciente cada semana durante de cuatro a seis semanas. Alternativamente, las partículas de HDL modificadas pueden separarse del plasma tratado y administrarse en un vehículo aceptable.

- 50 Debe entenderse que las partículas de HDL modificadas de la presente invención pueden administrarse junto con otros regímenes y tratamientos para el tratamiento de las enfermedades y afecciones mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las partículas de HDL modificadas de la presente invención pueden administrarse junto con el ejercicio y/o la restricción dietética de la ingesta de grasas y colesterol.

- 55 Las partículas de HDL modificadas de la presente invención pueden usarse 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 los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, o las estatinas, pueden administrarse en dosis y según los esquemas de administración comúnmente conocidos por un experto en la técnica. Las estatinas incluyen, pero no están limitadas a, la cerivastatina, atorvastatina, fluvastatina, simvastatina, pravastatina y lovastatina. Por ejemplo, comúnmente se emplean dosis de 10 mg, 20 mg, 40 mg u 80 mg de estatinas, tomadas una vez al día. La administración de las partículas de HDL modificadas de la presente invención puede eliminar la necesidad de terapia con estatinas en

pacientes o reducir la dosis requerida de estatinas.

En otro aspecto, las partículas de HDL modificadas de la presente invención se usan junto con la administración de agentes diseñados para reducir la absorción de grasas y colesterol. Dichos agentes, por ejemplo, ezetimiba, y las dosis clínicamente apropiadas son conocidos por los expertos en la técnica.

5 En aún otro aspecto de la presente invención, las partículas de HDL modificadas se usan junto con la administración de uno o más agentes tales como los derivados de ácido fibríco (gemfibrozil), ácido nicotínico (niacina) y resinas de unión a ácidos biliares (colestiramina, colestipol).

10 En aún otro aspecto, las partículas de HDL modificadas de la presente invención se usan junto con la administración de fármacos antiinflamatorios conocidos por los expertos en la técnica, tales como la aspirina. Los fármacos antiinflamatorios a menudo se recetan a pacientes con enfermedades vasculares, ya que se cree que la inflamación es un factor causante de la aterosclerosis y otras enfermedades vasculares.

15 Las partículas de HDL modificadas de la presente invención se usan junto con la administración de agentes tales como las estatinas junto con agentes diseñados para reducir la absorción de grasas y colesterol. Esta combinación de las tres terapias es eficaz para mejorar el flujo de salida del colesterol de las células y permite la administración de dosis más bajas de las estatinas. Las partículas de HDL modificadas de la presente invención también se usan junto con cualquiera de los enfoques terapéuticos descritos anteriormente.

20 Estas partículas de HDL modificadas se pueden almacenar antes de su uso. Pueden fabricarse a partir del plasma de un paciente y devolverse a ese paciente. Alternativamente, las partículas de HDL modificadas pueden fabricarse a partir de plasma obtenido de un primer paciente y administrarse posteriormente a un segundo paciente. La presente invención es útil para crear muestras de plasma que contienen partículas de HDL modificadas para su almacenamiento en un banco de plasma y su posterior administración a los pacientes.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar partículas que comprenden partículas de HDL modificadas.

25 Es un objeto de la presente invención proporcionar partículas que comprenden partículas de HDL modificadas sin afectar sustancialmente a la LDL.

Aún otro objeto más de la presente invención es proporcionar partículas que comprenden derivados de al menos una forma de HDL, en donde las partículas tienen un contenido de colesterol reducido.

Es otro objeto proporcionar partículas que comprenden derivados de al menos una forma de HDL con una proporción reducida de colesterol libre a fosfolípidos.

30 Otro objeto es proporcionar partículas que comprenden derivados de al menos una forma de HDL, en donde las partículas son partículas pre- $\beta$  HDL.

35 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar un fluido biológico que comprende una distribución de proteínas modificada en donde el fluido biológico tuvo un primer estado, el primer estado tenía alfa lipoproteínas de alta densidad y pre-beta lipoproteínas de alta densidad, y en donde el fluido biológico tiene un segundo estado, el segundo estado tiene una concentración aumentada de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con el primer estado, después de haber sido expuesto a un agente de eliminación de lípidos.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar un método novedoso para la creación de partículas que comprenden derivados de al menos una forma de HDL.

40 Es todavía otro objeto de la presente invención proporcionar un método novedoso para la creación de partículas que comprenden derivados de al menos una forma de HDL sin afectar sustancialmente a la LDL.

45 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para modificar una distribución de proteínas en un fluido en donde la distribución de proteínas tiene un primer estado, teniendo dicho primer estado alfa lipoproteínas de alta densidad y pre-beta lipoproteínas de alta densidad, que comprende las siguientes etapas de: exponer dicho fluido a un agente de eliminación de lípidos en donde la exposición modifica la distribución de proteínas del primer estado a un segundo estado, teniendo dicho segundo estado una concentración incrementada de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con dicho primer estado; y eliminar dicho agente de eliminación de lípidos del fluido biológico.

50 Es aún otro objeto de la presente invención proporcionar un fluido biológico capaz de mejorar una ruta ABCA1 de un paciente en donde el fluido biológico se fabrica modificando un fluido que tiene una primera concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con las proteínas totales, en donde la modificación aumenta la concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con las proteínas totales.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para mejorar una ruta ABCA1 de un paciente con una primera distribución de proteínas, teniendo la primera distribución de proteínas una concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad con respecto a las proteínas totales, que comprende la etapa de modificar un fluido que

contiene la primera distribución de proteínas al exponer el fluido a un agente de eliminación de lípidos, en donde la modificación aumenta la concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con las proteínas totales, e introduciendo el fluido en el paciente.

5 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar un método novedoso para tratar enfermedades asociadas con la acumulación de lípidos administrando a un paciente una composición que comprende partículas que son derivados de al menos una forma de HDL.

10 Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método novedoso para tratar enfermedades asociadas con la acumulación de lípidos administrando a un paciente una composición que comprende partículas que son derivados de al menos una forma de HDL junto con la administración terapéutica de una estatina, un inhibidor de la captación de colesterol o lípidos, niacina, derivados de ácido fólico, resinas de unión a ácidos biliares, o una combinación de los mismos.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método novedoso para mejorar el flujo de salida del colesterol celular en un paciente que comprende la administración de una composición que comprende partículas que son derivados de al menos una forma de HDL.

15 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método novedoso para tratar la aterosclerosis administrando a un paciente una composición que comprende partículas que son derivados de al menos una forma de HDL.

Otro objeto es proporcionar un kit útil para tratar un fluido biológico con el fin de reducir el colesterol y los lípidos y crear partículas que comprenden derivados de al menos una forma de HDL.

20 Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de las realizaciones y reivindicaciones divulgadas.

Breve descripción de los dibujos

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

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

La Figura 3 es un esquema de un perfil de FPLC de una muestra de plasma de banco de plasma normal. El colesterol total (TC) se representa como una línea continua; los fosfolípidos (PPL) es la línea discontinua; la apolipoproteína A1 (Apo A-1) es la línea discontinua con un símbolo; y, la apolipoproteína B (Apo B) está representada por la línea con un triángulo. Se muestran las cantidades de estos compuestos (mg/dl) en cada fracción de FPLC.

30 La Figura 4 es un esquema de un perfil de FPLC de una parte alícuota de plasma de banco normal que se sometió a un disolvente de éter diisopropílico al 100% (DIPE) para eliminar los lípidos de HDL. El colesterol total (TC) en la muestra normal de la Figura 3 se representa aquí como una línea discontinua con triángulos. TC 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.

35 La Figura 5 es un esquema de un perfil de FPLC de una parte alícuota de plasma de banco normal que se sometió a un disolvente de DIPE al 100% para eliminar los lípidos 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. Los fosfolípidos (PPL) en la muestra de plasma normal de la Figura 3 se representa aquí con la línea discontinua. PPL en el plasma normal sometido a DIPE se muestra como una línea continua.

40 La Figura 6 es un esquema de un perfil de FPLC de una parte alícuota de plasma de banco normal que se sometió a un disolvente de DIPE al 100% para eliminar los lípidos de HDL. Apo B en la muestra de plasma normal se representa como una línea con un símbolo de punto. Apo B en el plasma normal sometido a DIPE se muestra como una línea discontinua con triángulos. Los fosfolípidos (PPL) en la muestra normal de la Figura 3 se representan con la línea continua. Los PPL en el plasma normal sometido a DIPE se muestran como una línea discontinua.

45 La Figura 7 es un esquema de un perfil de FPLC de una parte alícuota de plasma de banco normal que se sometió a una relación de disolvente de sevoflurano a n-butanol 95:5. El colesterol total (TC) en la muestra de plasma normal de la Figura 3 se representa aquí como una línea discontinua. TC 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.

50 La Figura 8 es un esquema de un perfil de FPLC de una parte alícuota de plasma de banco normal que se sometió a una proporción de disolvente de 95:5 de sevoflurano a n-butanol. 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. Los fosfolípidos (PPL) en la muestra normal de la Figura 3 se representan aquí con la línea discontinua. Los PPL en el plasma normal sometido a sevoflurano:n-butanol se muestran como una línea continua.

5 La Figura 9 es un esquema de un perfil de FPLC de una parte alícuota de plasma de banco normal que se sometió a una relación de disolvente de 95:5 de sevoflurano a n-butanol. Apo B en la muestra normal de la Figura 3 está representada por la línea con un símbolo de punto. Apo B en el plasma normal sometido a sevoflurano:n-butanol se muestra como una línea discontinua con triángulos. Los fosfolípidos (PPL) en la muestra normal de la Figura 3 se representan aquí con la línea continua. Los PPL en el plasma normal sometido a sevoflurano:n-butanol se muestran como una línea discontinua.

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

15 La Figura 11 es una representación esquemática de un perfil de Superose FPLC de una muestra de plasma normal que actúa como control para la comparación con los tratamientos en las Figuras 12-15. El colesterol total (TC) en la muestra de plasma normal se representa aquí como una línea sólida. Los fosfolípidos (PPL) se representan con la línea continua con círculos. Apo B está representada por la línea con cuadrados abiertos. Apo A-1 se representa como una línea continua con símbolos de triángulos abiertos. Apo A-2 se muestra como una línea discontinua con un símbolo de estrella.

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

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

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

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

La Figura 16 demuestra los efectos de diversos tratamientos del plasma con disolventes sobre la capacidad del plasma tratado para estimular el flujo de salida del colesterol en la ruta metabólica ABCA1 y la ruta metabólica SRB1, como se representa en las líneas celulares COS+ y FU5AH en comparación con muestras no tratadas o tratadas de forma simulada.

La Figura 17 es una representación de una subespecie de HDL que contiene Apo A-1 determinada por 3-16% de PAGE nativo, inmunotransferencia y análisis de imagen de una muestra de plasma lipémico normal (panel izquierdo) y una parte alícuota de este plasma tratado con sevoflurano:n-butanol (95:5) (panel derecho). El panel de la izquierda muestra una distribución de proteínas de varias especies de HDL que tienen una distribución que comprende principalmente alfa HDL y el panel de la derecha muestra una distribución de proteínas de HDL modificada que tiene una distribución que comprende principalmente pre-β HDL.

La Figura 18 es una representación de una subespecie de HDL que contiene Apo A-1 determinada por 3-16% de PAGE nativo, inmunotransferencia y análisis de imagen de una muestra de plasma lipémico normal (panel izquierdo) y una parte alícuota de este plasma tratado con DIPE:n-butanol (95:5) (panel derecho). El panel de la izquierda muestra una distribución de proteínas de varias especies de HDL que tienen una distribución que comprende principalmente alfa HDL y el panel de la derecha muestra una distribución de proteínas de HDL modificada que tiene una distribución

que comprende principalmente pre-β HDL.

La Figura 19 es una representación esquemática de una pluralidad de componentes utilizados en la presente invención para lograr los nuevos procesos de deslipidación divulgados en este documento.

5 La Figura 20 es una realización de una configuración de una pluralidad de componentes utilizados en la presente invención para lograr los procesos novedosos de deslipidación divulgados en este documento.

La Figura 21 es otra realización de una configuración de una pluralidad de componentes utilizados en la presente invención para lograr los procesos novedosos de deslipidación divulgados en este documento.

**Descripción detallada de la invención**

10 Esta invención, como se define en las reivindicaciones, se refiere a métodos útiles para eliminar lípidos de partículas de HDL derivadas principalmente del plasma de pacientes, creando así partículas de HDL modificadas con un contenido reducido de lípidos, particularmente un contenido de colesterol reducido. Los métodos actuales crean estas partículas de HDL modificadas con un contenido reducido de lípidos sin modificar sustancialmente las partículas de LDL.

15 La presente invención proporciona además un fluido biológico que comprende una distribución de proteínas modificada en donde el fluido biológico tenía un primer estado, el primer estado teniendo alfa lipoproteínas de alta densidad y pre-beta lipoproteínas de alta densidad, y en donde el fluido biológico tiene un segundo estado, el segundo estado teniendo una concentración aumentada de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con el primer estado, después de haber sido expuesto a un agente de eliminación de lípidos. La presente invención proporciona un fluido biológico capaz de mejorar una ruta ABCA1 de un paciente en donde el fluido biológico se fabrica modificando un fluido que  
20 tiene una primera concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en proporción con la proteína total, en donde la modificación aumenta la concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en proporción con la proteína total.

25 La presente invención proporciona derivados recién formados de partículas de HDL que pueden administrarse a pacientes para mejorar el flujo de salida del colesterol celular y tratar enfermedades, particularmente la arteriosclerosis, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades relacionadas con los lípidos.

*Definiciones*

30 El término "fluido" se define como fluidos de animales o seres humanos que contienen lípidos o partículas que contienen lípidos, fluidos de tejidos de cultivo 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 el plasma y las partículas contenidas en el plasma, incluyendo, pero no limitado a, las partículas de HDL. Los fluidos incluyen, pero no se limitan a: fluidos biológicos; tales como la sangre, plasma, suero, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido pericárdico, diversos líquidos del sistema reproductivo incluyendo, pero no limitados a, el semen, líquidos eyaculatorios, líquido folicular y líquido amniótico; reactivos de cultivo celular tales como los sueros normales, suero de ternera fetal o suero derivado de cualquier animal  
35 o ser humano; y reactivos inmunológicos, tales como diversas preparaciones de anticuerpos y citoquinas procedentes de cultivos de tejidos y células, fluidos mezclados con células que contienen lípidos y fluidos que contienen organismos que contienen lípidos, tales como una solución salina que contiene organismos que contienen lípidos. Un fluido preferido tratado con los métodos de la presente invención es el plasma.

40 El término "lípidos" se define como uno cualquiera o más de un grupo de grasas o sustancias similares a las grasas que se encuentran en seres humanos o animales. Las grasas o sustancias similares a grasas se caracterizan por su insolubilidad en agua y solubilidad en disolventes orgánicos. El término "lípidos" es conocido por los expertos en la técnica e incluye, pero no se limita a, lípidos complejos, lípidos simples, triglicéridos, ácidos grasos, glicerofosfolípidos (fosfolípidos), grasas verdaderas tales como los ésteres de ácidos grasos, glicerol, cerebrosidos, ceras, y esteroides tales como el colesterol y el ergosterol.

45 El término "disolvente de extracción" se define como uno o más disolventes utilizados 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 eliminado por otros subsistemas. Los disolventes de extracción adecuados incluyen disolventes que extraen o disuelven lípidos, incluyendo, pero no limitados a, fenoles, hidrocarburos, aminas, éteres, ésteres, alcoholes, halohidrocarburos, o halocarburos y combinaciones de los mismos. Los disolventes de extracción preferidos son los éteres, ésteres, alcoholes, halohidrocarburos o halocarburos incluyendo, pero no limitados a, el éter diisopropílico (DIPE), que también se conoce como éter isopropílico, éter dietílico (DEE), al que también se hace referencia como éter etílico, alcoholes de orden inferior tales como el butanol, especialmente n-butanol, el acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, isofluorano, sevoflurano (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(fluorometoxi)propano-d3), perfluorociclohexanos, trifluoroetano, ciclofluoroheptanol y combinaciones de los mismos.

55 El término "paciente" se refiere a animales y seres humanos, que pueden ser una fuente de fluido a tratar con los métodos de la presente invención o un receptor de derivados de partículas de HDL y o plasma con un contenido

reducido de lípidos.

El término "partículas de HDL" abarca varios tipos de partículas definidas en función de una variedad de métodos, tales como los que miden la carga, densidad, tamaño e inmunoafinidad, incluyendo, pero no limitados a, la movilidad electroforética, ultracentrifugación, inmunorreactividad y otros métodos conocidos por cualquier experto en la técnica.

5 Dichas partículas de HDL incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: VLDL,  $\alpha$  HDL, pre- $\beta$  HDL (incluidas pre- $\beta_1$  HDL, pre- $\beta_2$  HDL y pre- $\beta_3$  HDL),  $\beta$  HDL, HDL<sub>2</sub> (incluyendo HDL<sub>2a</sub> y HDL<sub>2b</sub>) HDL<sub>3</sub>, VHDL, LpA-I, LpA-II, LpA-I/LpA-II (para una revisión, véase Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1996). Por consiguiente, la práctica de los métodos de la presente invención crea partículas de HDL modificadas. Estos derivados modificados de partículas de HDL pueden modificarse de muchas maneras, incluyendo, pero no limitado a cambios en una o más de las

10 siguientes propiedades metabólicas y o físico químicas (para una revisión, véase Barrans et al., Biochemica Biophysica Acta 1300; 73-85, 1996): masa molecular (kDa); carga; diámetro; forma; densidad; densidad de hidratación; características de flotación; contenido de colesterol; contenido de colesterol libre; contenido de colesterol esterificado; proporción 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 del

15 éster de colesterol (CETP), lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT)); capacidad y/o tasa para la unión al colesterol, capacidad y/o tasa para el transporte del colesterol.

#### Métodos

Los métodos de la presente invención emplean técnicas para crear partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos. Estas partículas de HDL se obtienen de fluidos, tales como el plasma. El primer método comprende la

20 eliminación de las LDL del plasma antes de tratar el plasma para disminuir los lípidos y crear partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos. El segundo método no elimina las LDL del plasma antes de la exposición a los disolventes, sino que emplea varios sistemas de disolventes para permitir la eliminación selectiva de lípidos de las partículas de HDL sin afectar sustancialmente a las LDL. Las diversas etapas involucradas en los dos métodos se describen en general a continuación. A continuación de estas descripciones generales se encuentran descripciones de varias realizaciones de los métodos de la presente invención, que incluyen variantes tales como disolventes

25 empleados, métodos de mezcla, tiempos de mezcla y, opcionalmente, temperatura.

La presente invención proporciona además un método para modificar una distribución de proteínas en un fluido en donde la distribución de proteínas tiene un primer estado, teniendo dicho primer estado alfa lipoproteínas de alta densidad y pre-beta lipoproteínas de alta densidad, que comprende las etapas de: exponer dicho fluido a un agente de eliminación de lípidos en donde la exposición modifica la distribución de proteínas del primer estado a un segundo estado, teniendo dicho segundo estado una concentración incrementada de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con dicho primer estado; y eliminar dicho agente de eliminación de lípidos del fluido biológico.

30

La presente invención también proporciona un método para mejorar una ruta ABCA1 de un paciente con una primera distribución de proteínas, teniendo la primera distribución de proteínas una concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad con respecto a la proteína total, que comprende la etapa de modificar un fluido que contiene la primera distribución de proteínas al exponer el fluido a un agente de eliminación de lípidos, en donde la modificación aumenta la concentración de pre-beta lipoproteínas de alta densidad en relación con la proteína total, e introduciendo el fluido en el paciente.

35

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

40 En una realización, como se muestra en la Figura 1, las partículas de HDL y LDL se separan antes del tratamiento. La Figura 1 es un diagrama de flujo del proceso para la extracción de LDL y la eliminación de lípidos de las partículas de HDL.

En la etapa 100 del proceso para la extracción de LDL y la eliminación de lípidos de las partículas de HDL, el plasma se separa de la sangre. En una realización preferida, esto se consigue mediante filtración. En otra realización preferida,

45 el plasma y los componentes sanguíneos se separan mediante centrifugación. La sangre puede combinarse opcionalmente con un anticoagulante, tal como el citrato de sodio, y centrifugarse con una fuerza aproximadamente igual a 2.000 veces la gravedad. Los glóbulos rojos se aspiran del plasma. En la etapa 102, las células se devuelven al paciente. En esta realización particular de la presente invención, la LDL se separa del plasma en la etapa 104. Esto se logra mediante el uso de una columna de afinidad, ultracentrifugación o cualquier otro método conocido por un experto en la técnica. Un método ejemplar es el uso de la ultracentrifugación, en la cual el plasma pasa a través del

50 separador ultracentrífugo, analizando así las partículas de LDL y HDL. El separador ultracentrífugo usa ultracentrifugación en gradiente de densidad, un proceso sofisticado y altamente preciso que separa porciones más ligeras de lipoproteínas de porciones más pesadas por fuerza centrífuga. La LDL se desecha en la etapa 106.

En la etapa 108, se agregan disolventes al plasma que todavía contiene HDL para eliminar los lípidos. Los tipos de disolventes, las proporciones y las concentraciones pueden variar. El plasma y el disolvente se introducen en al menos un aparato para mezclar, agitar o de otra manera poner en contacto el plasma con el disolvente. El plasma puede ser transportado usando un proceso continuo o por lotes. Además, se pueden incluir diversos medios de detección para controlar las presiones, temperaturas, caudales, niveles de disolventes y similares (que se analizan con más detalle a

55

continuación).

En la etapa 110, se introduce energía en el sistema. Las diversas formas de energía empleadas involucran métodos de mezcla, tiempo y velocidad (las variantes de las cuales se analizan con más detalle a continuación). La centrifugación se emplea en el paso 112 para eliminar el disolvente residual a granel. El disolvente soluble restante se elimina en la etapa 114. Esto se logra por medio de la adsorción al carbón, la evaporación o la pervaporación de HFC, como se explica a continuación. En el paso opcional 116, la mezcla se analiza para determinar el disolvente residual mediante cromatografía de gases (GC) o cualquier otro medio similar. Opcionalmente, esta etapa se elimina con validación estadística. En la etapa 118, el plasma con un contenido reducido de lípidos se devuelve al paciente. Este plasma con niveles de lípidos al menos parcialmente o sustancialmente reducidos, que se separaron inicialmente, luego se trata adecuadamente y después se reintroduce en el cuerpo.

*Eliminación selectiva de lípidos de HDL y formación de partículas de HDL modificadas*

La Figura 2 presenta un diagrama de flujo que delinea las etapas de otra realización preferida de la presente invención. En la etapa 200, el plasma se separa de la sangre a través de filtración, centrifugación o cualquier otro medio conocido por un experto en la técnica. En una realización preferida, la sangre se pasa a través de un separador centrífugo, que separa la sangre en células sanguíneas y plasma. En la etapa 202, las células se devuelven al paciente. Los disolventes se agregan al plasma separado en la etapa 204 para extraer los lípidos. El sistema de disolvente está diseñado de manera óptima, de modo que solo las partículas de HDL se tratan para reducir sus niveles de lípidos y la LDL permanece al menos sustancialmente intacta. El sistema de disolvente incluye la factorización en variables tales como el disolvente empleado, método de mezcla, tiempo y temperatura. El tipo de disolvente, proporciones y concentraciones pueden variar en esta etapa. El plasma y el disolvente se introducen en al menos un aparato para mezclar, agitar o de otra manera poner en contacto el plasma con el disolvente. El plasma puede ser transportado usando un proceso continuo o por lotes. Además, pueden incluirse diversos medios de detección para controlar las presiones, temperaturas, velocidades de flujo, niveles de disolventes y similares (que se explican con más detalle a continuación).

En la etapa 206, la energía se introduce en el sistema en forma de diversos métodos de mezcla, tiempo y velocidad. Los disolventes a granel se eliminan en la etapa 208 mediante centrifugación. En la etapa 210, el disolvente soluble restante se elimina mediante adsorción al carbón, evaporación o pervaporación de HFC. En la etapa 212, la mezcla se analiza opcionalmente para detectar disolventes residuales mediante el uso de GC, o medios similares. La prueba de disolvente residual puede eliminarse opcionalmente en base a la validación estadística. En la etapa 214, el plasma tratado (que contiene preferiblemente partículas de HDL modificadas con contenido reducido de lípidos), que se separó inicialmente, se trata adecuadamente y luego se devuelve al paciente.

Un experto en la técnica apreciaría que aunque los procesos mostrados en las Figuras 1 y 2 representan solo las etapas principales de los procesos y los elementos primarios de referencia de los sistemas, opcionalmente, pueden contener otros elementos, tales como una bomba de sangre para mantener el volumen de sangre adecuado, un medidor de presión arterial, un dispositivo de inyección de agente anticoagulante sanguíneo, una cámara de goteo para eliminar las burbujas de aire en la sangre y un calentador o enfriador para mantener una temperatura adecuada para la sangre mientras está fuera del cuerpo.

*Variables que deben considerarse al emplear los métodos de la presente invención*

La presente invención emplea uno de los muchos sistemas de disolventes configurados de manera óptima diseñados para eliminar los lípidos de las partículas de HDL sin afectar sustancialmente a la LDL. En la primera realización, la LDL se elimina del plasma antes de tratar el plasma con disolvente(s) para crear las partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos mientras se retiene la composición de las proteínas plasmáticas. En la segunda realización, se tiene cuidado de eliminar selectivamente los lípidos de las partículas de HDL sin afectar sustancialmente a las partículas de LDL. Estas variables incluyen la elección del disolvente, los métodos de mezcla, el tiempo y la temperatura.

*Procedimientos de separación del plasma*

Los procedimientos de separación del plasma típicos son bien conocidos por los expertos en la técnica y preferiblemente incluyen, pero no se limitan a, la filtración, centrifugación y aspiración.

*Extracción de LDL*

Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de extracción de LDL. Para los fines de la presente invención, dos métodos preferidos son, pero no se limitan a, el uso de una columna de afinidad y la ultracentrifugación. El separador ultracentrífugo utiliza una ultracentrifugación con gradiente de densidad, un proceso sofisticado y muy preciso que separa las porciones más ligeras de las lipoproteínas de las porciones más pesadas por la fuerza centrífuga.

55

*Disolventes empleados en el proceso de eliminación de lípidos*

Se pueden usar numerosos disolventes orgánicos en el método de esta invención para la eliminación de lípidos de los fluidos y partículas de HDL, siempre que los disolventes sean efectivos para solubilizar los lípidos. Los disolventes adecuados comprenden mezclas de hidrocarburos aromáticos, alifáticos o alicíclicos, éteres, fenoles, ésteres, alcoholes, halohidrocarburos y halocarbonos. Los disolventes preferidos son éteres, por ejemplo, el éter diisopropílico (DIPE). Se pueden usar éteres asimétricos y éteres halogenados. Son particularmente preferidos, como al menos un componente, los éteres que contienen C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>, incluyendo, pero no limitados a, el éter dietílico, y éteres propílicos, incluyendo, pero no limitados a DIPE. También son útiles en la presente invención combinaciones de éteres, tales como DIPE y éter dietílico. También son útiles en la presente invención 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, particularmente sevoflurano y n-butanol.

Los hidrocarburos en su forma líquida disuelven compuestos de baja polaridad, tales como los lípidos en los fluidos. En consecuencia, los hidrocarburos comprenden cualquier hidrocarburo sustancialmente inmisible en agua, que es líquido a aproximadamente 37° C. Los hidrocarburos adecuados incluyen, pero no se limitan a los siguientes: hidrocarburos alifáticos C<sub>5</sub> a C<sub>20</sub> tales como el éter de petróleo, hexano, heptano y octano; hidrocarburos haloalifáticos tales como el cloroforno, 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano, 1,1,1-tricloroetano, tricloroetileno, tetracloroetileno diclorometano y tetracloruro de carbono; hidrocarburos tioalifáticos; perfluorocarbonos, tales como el perfluorociclohexano, perfluorometilciclohexano y perfluorodimetilciclohexano; fluoroéteres tales como el sevoflurano; cada uno de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado; hidrocarburos aromáticos tales como el benceno; alquilarenos tales como el tolueno, haloarenos, haloalquilarenos y tioarenos. Otros disolventes adecuados también pueden incluir: compuestos heterocíclicos saturados o insaturados, tales como derivados de piridina insolubles en agua y derivados alifáticos, tio o halo de los mismos; y bromuro de perfluorooctilo. Otro disolvente adecuado es la perfluorodecalina.

Los ésteres adecuados que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, el acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de butilo y propionato de etilo. Las cetonas de ejemplo adecuadas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, la metiletilcetona.

Los tensioactivos adecuados que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: sulfatos, sulfonatos, fosfatos (incluidos los fosfolípidos), carboxilatos y sulfosuccinatos. Algunos materiales anfífilos aniónicos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a los siguientes: dodecilsulfato de sodio (SDS), decilsulfato de sodio, bis-(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio (AOT), sulfato de colesterol y laurato de sodio.

Los alcoholes que se prefieren para uso en la presente invención, cuando se usan solos, incluyen aquellos alcoholes que no son apreciablemente miscibles con plasma u otros fluidos biológicos. Cuando se usan alcoholes en combinación con otro disolvente, por ejemplo, éter, un hidrocarburo, una amina o una combinación de los mismos, se pueden usar alcoholes que contienen C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>. Los alcoholes preferidos para su uso en combinación con otro disolvente incluyen alcoholes inferiores tales como alcoholes que contienen C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>. Por consiguiente, los alcoholes preferidos que caen dentro del alcance de la presente invención son preferiblemente butanoles, pentanoles, hexanoles, heptanoles y octanoles, y sus formas iso. Son particularmente preferidos los butanoles (1-butanol y 2-butanol), también denominados n-butanol. Como se indicó anteriormente, el alcohol más preferido es el alcohol C<sub>4</sub>, butanol. La elección específica de alcohol dependerá del segundo disolvente empleado. En una realización preferida, los alcoholes inferiores se combinan con éteres inferiores.

Los éteres, usados solos o en combinación con otros disolventes, preferiblemente alcoholes, son otro disolvente preferido para usar en el método de la presente invención. Particularmente preferidos son los éteres C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>, incluyendo pero no limitado a, el éter etílico, éter dietílico, y éteres propílicos, incluyendo, pero no limitado al éter diisopropílico (DIPE). También son útiles en la presente invención combinaciones de éteres, tales como éter diisopropílico y éter dietílico. Cuando se utilizan éteres y alcoholes en combinación como primer disolvente para eliminar lípidos, se puede usar cualquier combinación de alcohol y éter siempre que la combinación sea efectiva para eliminar parcial o completamente los lípidos. Cuando los alcoholes y el éter se combinan como un disolvente para eliminar los lípidos de un fluido, las proporciones aceptables de alcohol a éter en este disolvente son aproximadamente de 0,01 partes a 99,99 partes de alcohol a aproximadamente de 99,99 partes a 0,01 partes de éter, incluyendo una proporción de aproximadamente 1 parte a 25 partes de alcohol con aproximadamente 75 partes a 99 partes de éter, una proporción de aproximadamente 3 partes a 10 partes de alcohol con aproximadamente 90 partes a 97 partes de éter, y una proporción 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 éter diisopropílico.

En resumen, los disolventes particularmente preferidos incluyen 100 partes de éter diisopropílico, una combinación de 95 partes de éter diisopropílico por 5 partes de n-butanol y 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 partes 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 particularmente, 97,5 partes de sevoflurano por 2,5 partes de n-butanol.

- 5 Las proporciones aceptables de disolvente a plasma incluyen cualquier combinación de disolvente y plasma. Las proporciones más preferidas son 2 partes de plasma por 1 parte de disolvente, 1 parte de plasma por 1 parte de disolvente y 1 parte de plasma por 2 partes de disolvente. Por ejemplo, cuando se utiliza 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.

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

#### *Procesos para eliminar lípidos de fluidos y partículas de HDL*

- 15 Los procesos empleados en los métodos de la presente invención para reducir los lípidos en fluidos y partículas de HDL se relacionan directamente con la entrada de energía. El procedimiento empleado debe diseñarse de modo que las partículas de HDL se traten para reducir sus niveles de lípidos sin destruir las proteínas plasmáticas o afectar sustancialmente a las partículas de LDL. Téngase en cuenta que los métodos descritos a continuación se pueden usar para lograr las etapas de ambas realizaciones preferidas de la presente invención como se describió anteriormente.

#### *Métodos de mezcla*

- 20 El plasma y el disolvente se someten a al menos un método de mezcla para mezclar, agitar o de otra manera poner en contacto el fluido biológico con el disolvente. El método de mezcla empleado en la presente invención puede ser uno de, pero no se limita a, un mezclador estático en línea, un matraz giratorio, un agitador de vórtex, una centrífuga, un matraz sonicado, un tubo de alto cizallamiento, un homogeneizador, un mezclador, un contactor de fibra hueca, una bomba centrífuga, una mesa vibratoria, un proceso de turbulencia, un proceso de agitación, una rotación de extremo a extremo de un recipiente sellado u otros dispositivos adecuados, o cualquier combinación de estos dispositivos o procesos.

#### *Duración de la mezcla*

- 30 La cantidad de tiempo requerido para la mezcla adecuada del disolvente con el fluido está relacionado con el método de mezcla empleado. Los fluidos se mezclan durante un período de tiempo suficiente para permitir un contacto íntimo entre las fases orgánica y acuosa, y para que el disolvente solubilice al menos parcial o completamente los lípidos. Otra consideración es la temperatura. El equilibrio entre el tiempo de mezclado y la temperatura debe diseñarse de manera que no fomente la contaminación o el deterioro de la muestra de sangre. El sistema de tiempo y temperatura está idealmente equilibrado, de modo que la muestra de sangre sea aún viable y no se deteriore.

- 35 Normalmente, la mezcla se producirá durante un período de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 24 horas, posiblemente de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 horas, posiblemente de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 minutos, o posiblemente de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 hora, según el método de mezcla empleado. Ejemplos no limitativos de las duraciones de mezcla asociadas con diferentes métodos incluyen 1) agitación suave y rotación de extremo a extremo durante un período de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 24 horas, 2) agitación vigorosa y agitación con vórtex durante un período de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 30 minutos, 3) proceso de turbulencia durante un período de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 horas, o 4) homogeneización durante un período de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 minutos.

#### *Temperatura*

- 45 Como se describió anteriormente, la temperatura también es una consideración importante. La temperatura se ajusta usualmente a menos de 37° C a fin de no desnaturalizar el plasma. Opcionalmente, también se pueden emplear temperaturas más frías. Existen varios métodos para lograr la regulación de la temperatura en este sistema.

#### *Métodos de extracción de disolventes*

##### *Eliminación de disolvente a granel residual*

En una realización preferida de la presente invención, el disolvente a granel residual se elimina mediante centrifugación.

- 50 *Eliminación del disolvente soluble restante*

Otro método preferido para separar el disolvente es mediante el uso de carbón vegetal, preferiblemente carbón vegetal activado. Este carbón vegetal está opcionalmente contenido en una columna. Alternativamente, el carbón vegetal puede estar en forma de suspensión. En estas columnas se pueden utilizar varias formas biocompatibles de carbón

vegetal.

#### *Pervaporización por HFC*

Los contactores de fibra hueca (HFCs) pueden reducir con éxito las concentraciones totales de disolventes, como el éter diisopropílico y el éter dietílico, en agua y plasma, utilizando diferentes HFCs, presiones y caudales. Los HFCs pueden tener un área de 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 utilizado. Además, el caudal de gas se varió en estos experimentos desde aproximadamente 2 litros por minuto hasta aproximadamente 10 litros por minuto, y el caudal de plasma varió desde aproximadamente 10 ml por minuto hasta aproximadamente 60 ml por minuto. El funcionamiento de esta manera puede reducir las concentraciones iniciales de disolventes entre aproximadamente 28.000 partes por millón (ppm) y 9.000 ppm a entre aproximadamente 1.327 ppm y aproximadamente 0,99 ppm entre aproximadamente 14 minutos y 30 minutos.

En una realización del sistema de eliminación de disolvente de la presente invención, el plasma tratado con disolvente que contiene disolvente soluble residual típicamente se introduce primero en un circuito de circulación que incluye, por ejemplo, un recipiente de recirculación, un medio de transporte de fluido tal como tubos, válvulas, bomba, y un dispositivo de extracción de disolvente, tal como un HFC. En este circuito de circulación, el HFC funciona como un dispositivo de recirculación y extracción de disolvente. El plasma/disolvente circula a través de la fibra hueca del HFC, por lo que se pone en contacto el disolvente de extracción con un gas o un segundo disolvente de extracción, que circula a través de la cubierta del HFC. Si se usa un disolvente volátil como primer disolvente de extracción, se puede usar cualquier gas capaz de extraer el primer disolvente de extracción del plasma deslipidado, incluyendo, pero no limitado a, nitrógeno y aire.

#### *Realizaciones específicas de la presente invención*

Los componentes descritos anteriormente pueden integrarse en una pluralidad de diferentes realizaciones para permitir la práctica de la presente invención. Ciertas realizaciones específicas se describirán en este documento para resaltar particularmente los enfoques definidos para practicar la presente invención. Las realizaciones enumeradas a continuación no representan todas las variaciones de la presente invención y están diseñadas para ejemplificar la presente invención y, en ciertos casos, representan enfoques preferidos para poner en práctica la presente invención.

Con referencia a las Figuras 19 a 21, se muestran una pluralidad de realizaciones que representan diferentes sistemas capaces de poner en práctica la presente invención. Debe entenderse que cada realización tiene diferentes ventajas y desventajas, desde una perspectiva de costo y uso, y que ninguna de las realizaciones es específicamente preferida con respecto a otras realizaciones. La Figura 19 representa un diagrama de flujo de componentes básicos que define elementos del sistema de modificación de HDL 1900. Se proporciona una entrada de fluido 1905 y se conecta a través de un tubo a un dispositivo de mezcla 1920. Se proporciona una entrada de disolvente 1910 y también se conecta a través de un tubo a un dispositivo de mezcla 1920. Preferiblemente, las válvulas 1915 se usan para controlar el flujo de fluido desde la entrada de fluido 1905 y el disolvente de la entrada de disolvente 1910. Debe apreciarse que la entrada de fluido 1905 contiene preferiblemente cualquier fluido que incluya partículas de HDL, incluido el plasma que tiene partículas de LDL o carece de partículas de LDL, como se explicó anteriormente. Además, debe apreciarse que la entrada de disolvente 1910 puede incluir un solo disolvente, una mezcla de disolventes o una pluralidad de diferentes disolventes que se mezclan en el punto de entrada de disolvente 1910. Mientras se representa como un contenedor de disolvente único, la entrada de disolvente 1910 puede comprender una pluralidad de contenedores de disolvente separados. Los tipos de disolventes que se usan y prefieren se explicaron anteriormente.

El mezclador 1920 mezcla el fluido de la entrada de fluido 1905 y el disolvente de la entrada de disolvente 1910 para producir una mezcla de fluido-disolvente. Preferiblemente, el mezclador 1920 es capaz de usar un método de mezcla de bolsas de agitador con el fluido de entrada y el disolvente de entrada en una pluralidad de lotes, tal como 1, 2, 3 o más lotes. Un mezclador de ejemplo es una mesa de agitador orbital Barnstead Labline. Una vez formada, la mezcla fluido-disolvente se dirige, a través de un tubo y se controla mediante al menos una válvula, a un separador 1925. En una realización preferida, el separador 1925 es capaz de realizar una separación masiva de disolventes a través de la separación por gravedad en una bolsa con forma de embudo.

En el separador 1925, la mezcla fluido-disolvente se separa en una primera capa y una segunda capa. La primera capa comprende una mezcla de disolvente y lípidos que se ha eliminado de las partículas de HDL. La segunda capa comprende una mezcla de disolvente residual, partículas 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 diferirían en función de la naturaleza del fluido de entrada. Una vez que la primera y la segunda capa se separan en el separador 1925, la segunda capa se transporta a través de un tubo a un dispositivo de extracción de disolvente 1940. Preferiblemente, un sensor de presión 1930 y una válvula se colocan en la corriente de flujo para controlar el flujo de la segunda capa al dispositivo de extracción de disolvente 1940.

La apertura y el cierre de válvulas para permitir el flujo de fluido desde los contenedores de entrada 1905, 1910 se cronometra preferiblemente usando cálculos de balance de masa derivados de determinaciones de peso de las entradas de fluido 1905, 1910 y el separador 1925. Por ejemplo, las válvulas entre el separador 1925 y el contenedor

de desechos 1935 y entre el separador 1925 y el dispositivo de extracción con disolvente 1940 se abren después de que las masas de entrada (fluido y disolvente) se equilibren sustancialmente con la masa en el separador 1925 y haya transcurrido un período de tiempo suficiente para permitir la separación entre la primera y segunda capa, como se explicó anteriormente. Dependiendo de qué disolvente se use y, por lo tanto, qué capa se asienta en el fondo del separador 1925, se abre la válvula entre el separador 1925 y el contenedor de desechos 1935 o entre los separadores 1925 y el dispositivo de extracción de disolventes 1940. Un experto en la técnica apreciará que la sincronización de la abertura depende de la cantidad de fluido que se encuentra en la primera y segunda capa y apreciaría además que es preferible mantener la válvula entre el separador 1925 y el contenedor de desechos 1935 abierta solo por el tiempo suficiente para eliminar toda la primera capa y parte de la segunda capa, asegurando así que se haya eliminado la mayor cantidad de disolvente posible del fluido que se envía al dispositivo de extracción de disolvente 1940.

Preferiblemente, una entrada de glucosa 1955 y una entrada de solución salina 1960 están en comunicación fluida con la trayectoria del fluido que va desde el separador 1925 hasta el dispositivo de extracción de disolvente 1940. También se incorpora preferiblemente una pluralidad de válvulas en la corriente de flujo desde la entrada de glucosa 1955 y la entrada de solución salina 1960 hasta el tubo que proporciona la trayectoria de flujo desde el separador 1925 hasta el dispositivo de extracción de disolvente 1940. La glucosa y la solución salina se incorporan a la presente invención para cebar el dispositivo de extracción con disolvente 1940 antes de la operación del sistema. Donde no se requiera tal cebado, no se requieren las entradas de glucosa y solución salina. Además, un experto en la técnica apreciaría que las entradas de glucosa y solución salina pueden reemplazarse con otros cebadores si el dispositivo de extracción con disolvente 1940 lo requiere.

El dispositivo de extracción de disolvente 1940 es preferiblemente una columna de carbón diseñada para eliminar el disolvente específico usado en la entrada de disolvente 1910. Un dispositivo de extracción de disolvente de ejemplo 1940 es una columna de carbón Asahi Hemosorber. Se usa una bomba 1950 para mover la segunda capa desde el separador 1925, a través del dispositivo de extracción de disolvente 1940, y hacia un contenedor de salida 1945. La bomba es preferiblemente una bomba peristáltica, como la Masterflex Modelo 77201-62.

La primera capa se dirige a un contenedor de residuos 1935 que está en comunicación fluida con el separador 1925 a través de un tubo y al menos una válvula. Además, otros residuos, si se generan, pueden dirigirse desde la ruta del fluido que conecta el dispositivo de extracción de disolvente 1940 y el contenedor de salida 1945 al contenedor de desechos 1935.

Preferiblemente, una realización de la presente invención usa la gravedad, siempre que sea práctico, para mover el fluido a través de cada uno de la pluralidad de componentes. Por ejemplo, preferiblemente la gravedad se utiliza para drenar el plasma de entrada 1905 y el disolvente de entrada 1910 en el mezclador 1920. Cuando el mezclador 1920 comprende una bolsa de agitación y el separador 1925 comprende una bolsa de embudo, el fluido se mueve de la bolsa de agitación a la bolsa de embudo y, posteriormente, al contenedor de residuos 1935, si es apropiado, utilizando la gravedad.

En una etapa adicional, no mostrada en la Figura 19, el fluido de salida en el contenedor de salida 1945 se sometería a un sistema de detección de disolvente, o sistema de detección de agente de eliminación de lípidos, para determinar si algún disolvente u otro componente indeseable está en el fluido de salida. En una realización, el fluido de salida se somete a sensores que son capaces de determinar las concentraciones de disolventes introducidos en la entrada de disolvente, tal como el n-butanol o el éter diisopropílico. Esta es una medida importante ya que el fluido de salida se devuelve al torrente sanguíneo del paciente y las concentraciones de disolvente deben estar por debajo de un nivel predeterminado para realizar esta operación de manera segura. Los sensores son preferiblemente capaces de proporcionar dicha información de concentración en base a tiempo real y sin tener que transportar físicamente una muestra del fluido de salida, o aire en el espacio de cabeza, a un dispositivo remoto.

En una realización, se utiliza la tecnología de polímeros con impresión molecular para habilitar sensores de ondas acústicas de superficie. Un sensor de onda acústica de superficie recibe una entrada, a través de cierta interacción de su superficie con el entorno circundante, y produce una respuesta eléctrica, generada por las propiedades piezoeléctricas del sustrato del sensor. Para permitir la interacción, se utiliza tecnología de polímeros impresos molecularmente. Los polímeros impresos molecularmente son plásticos programados para reconocer moléculas diana, tales como productos farmacéuticos, toxinas o contaminantes ambientales, en muestras biológicas complejas. La tecnología de impresión molecular se habilita mediante la polimerización de uno o más monómeros funcionales con un exceso de un monómero de reticulación en presencia de una molécula de plantilla diana que muestra una estructura similar a la molécula diana que debe reconocerse, es decir, al disolvente diana.

El uso de tecnología de polímeros con impresión molecular para habilitar sensores de ondas acústicas de superficie es preferible a otros enfoques tecnológicos, ya que se pueden hacer más específicos a las concentraciones de disolventes diana y son capaces de diferenciar tales disolventes diana de otros posibles agentes interferentes. Como resultado, la presencia de interferentes aceptables que pueden tener estructuras y/o propiedades similares a los disolventes diana no evitaría que el sensor informe con precisión las concentraciones de los disolvente respectivos existentes.

Alternativamente, si el disolvente de entrada comprende ciertos disolventes, tal como el n-butanol, se podría usar la

oxidación electroquímica para medir la concentración del disolvente. Las mediciones electroquímicas tienen varias ventajas. Son simples, sensibles, rápidas y tienen un amplio rango dinámico. La instrumentación es simple y no se ve afectada por la humedad. En una realización, el disolvente diana, tal como el n-butanol, se oxida en un electrodo de platino usando voltametría cíclica. Esta técnica se basa en variar el potencial aplicado en un electrodo de trabajo en las direcciones hacia adelante y hacia atrás, a una velocidad de exploración predefinida, mientras se monitoriza la corriente. Se puede realizar un ciclo completo, un ciclo parcial o una serie de ciclos. Si bien el platino es el material de electrodo preferido, se podrían usar otros electrodos, tales como de oro, plata, iridio o grafito. Si bien se utilizan técnicas de voltametría cíclica, otras técnicas de pulso, como la voltametría de pulso diferencial o la voltametría de onda cuadrada, pueden aumentar la velocidad y la sensibilidad de las mediciones. La alternativa, un sensor Taguchi, no se prefiere porque no funciona de manera efectiva en condiciones húmedas.

La presente invención cubre expresamente todas y cada una de las formas de muestrear y medir, detectar y analizar automáticamente un fluido de salida, o el espacio de cabeza sobre el fluido de salida. Por ejemplo, tal detección automatizada se puede lograr integrando un dispositivo de medición por cromatografía de mini dispositivo de cromatografía de gas (GC) que muestrea automáticamente el aire en el contenedor de salida, lo transmite a un dispositivo GC optimizado para los disolventes específicos utilizados en el proceso de deslipidación, y, utilizando técnicas conocidas de GC, analiza la muestra para detectar la presencia de disolventes.

Con referencia de nuevo a la figura 19, los materiales adecuados para su uso en cualquiera de los componentes del aparato como se describe en este documento incluyen materiales que son biocompatibles, aprobados para aplicaciones médicas que involucran el contacto con fluidos corporales internos y que cumplen con las normas US PV1 o ISO 10993. Además, los materiales no deberían degradarse sustancialmente con, por ejemplo, la exposición a los disolventes utilizados en la presente invención, durante al menos un uso único. Los materiales normalmente deben ser esterilizables por radiación o por esterilización con óxido de etileno (EtO). Dichos materiales adecuados deberían ser capaces de transformarse en objetos utilizando procesos convencionales, tales como, entre otros, extrusión, moldeado por inyección y otros. Los materiales que cumplen con estos requisitos incluyen, pero no se limitan a, el nylon, polipropileno, policarbonato, acrílico, polisulfona, fluoruro de polivinilideno (PVDF), fluoroelastómeros como VITON, disponibles de DuPont Dow Elastomers LLC, elastómeros termoplásticos tales como SANTOPRENE, disponibles de Monsanto, poliuretano, cloruro de polivinilo (PVC), politetrafluoroetileno (PTFE), éter de polifenileno (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 utilizadas en cada realización pueden estar compuestas de, pero no se limitan a, válvulas de pellizco, globo, bola, compuerta u otras válvulas convencionales. Preferiblemente, las válvulas son válvulas de oclusión como la válvula Modelo 955 de Acro Associates. Sin embargo, la invención no se limita a una válvula que tiene un estilo particular. Además, los componentes de cada sistema descrito a continuación pueden acoplarse físicamente entre sí o acoplarse utilizando conductos que pueden estar compuestos por tuberías, tubos u otros dispositivos similares, flexibles o rígidos, conocidos por los expertos en la técnica.

Con referencia a la figura 20, se muestra una configuración específica 2000 de la presente invención. Una configuración preferida 2000 comprende una carcasa cerrada 2005 capaz de contener de manera segura fluidos volátiles, tales como disolventes. En una realización preferida, la carcasa cerrada 2005 comprende una puerta 2015 con una puerta transparente para observar el proceso de deslipidación en funcionamiento, una base móvil 2025, una pantalla de control 2020, una cubierta transparente 2010 y un filtro y un sistema de circulación de aire [no se muestra]. La pantalla de interfaz de la pantalla de control 2020 es preferiblemente funcional cuando la puerta 2015 está abierta para permitir la configuración del sistema y el cebado de un dispositivo de extracción de disolvente, pero no permite que el sistema deslipide un fluido de entrada hasta que la puerta 2015 esté cerrada y, preferiblemente, bloqueada. También se prefiere tener una bandeja de desagüe o desbordamiento capaz de atrapar cualquier fuga de fluido, desbordamientos u otros derrames en la base de la carcasa cerrada 2005 de una manera que permita que la bandeja se retire fácilmente sin abrir la carcasa 2005.

Con referencia a la fig. 21, se muestra una configuración de componentes básicos del sistema de modificación de HDL 2100. Se proporciona una entrada de fluido 2105 y se conecta a través de un tubo a un dispositivo mezclador 2120. Se proporciona una entrada de disolvente 2110 y también se conecta a través de un tubo a un dispositivo de mezcla 2120. Preferiblemente, las válvulas se usan para controlar el flujo de fluido desde la entrada de fluido 2105 y el disolvente desde la entrada de disolvente 2110. Debe apreciarse que la entrada de fluido 2105 contiene preferiblemente cualquier fluido que incluya partículas de HDL, incluyendo el plasma que tiene partículas de LDL o que carece de partículas de LDL, como se explicó anteriormente. Además, debería apreciarse que la entrada de disolvente 2110 puede incluir un solo disolvente, una mezcla de disolventes o una pluralidad de diferentes disolventes que se mezclan en el punto de entrada de disolvente 2110. Mientras que se representa como un solo contenedor de disolvente, la entrada de disolvente 2110 puede comprender una pluralidad de contenedores de disolvente separados. Los tipos de disolventes que se usan y prefieren se explicaron anteriormente.

El mezclador 2120 mezcla el fluido de la entrada de fluido 2105 y el disolvente de la entrada de disolvente 2110 para producir una mezcla de fluido-disolvente. Preferiblemente, el mezclador 2120 es capaz de usar un método de mezcla de bolsas con agitador 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, la mezcla fluido-disolvente se dirige, a través de un tubo y se controla mediante al

menos una válvula, a un separador 2125. En una realización preferida, el separador 2125 es capaz de realizar una separación masiva de disolventes a través de la separación por gravedad en una bolsa con forma de embudo.

5 En el separador 2125, la mezcla fluido-disolvente se separa en una primera capa y una segunda capa. La primera capa comprende una mezcla de disolvente y lípidos que se han 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 podrían diferir en función de la naturaleza del fluido de entrada. Una vez que la primera y la segunda capa se separan en el separador 2125, la segunda capa se transporta a través de un tubo a un dispositivo de extracción de disolvente 2140. Preferiblemente, un sensor de presión y una válvula se colocan en la corriente de flujo para controlar el flujo de la segunda capa al dispositivo de extracción de disolvente 2140.

10 Preferiblemente, una entrada de glucosa 2130 y una entrada de solución salina 2150 están en comunicación fluida con la trayectoria de fluido que va desde el separador 2125 al dispositivo de extracción de disolvente 2140. Preferiblemente, también se incorpora una pluralidad de válvulas en la corriente de flujo desde la entrada de glucosa 2130 y la entrada de solución salina 2150 a la tubería que proporciona el recorrido del flujo desde el separador 2125 al dispositivo de extracción de disolvente 2140. La glucosa y la solución salina se incorporan a la presente invención para cebar el dispositivo de extracción con disolvente 2140 antes de la operación del sistema. Donde no se requiera tal cebado, no se requieren las entradas de glucosa y solución salina. Además, un experto en la técnica apreciaría que las entradas de glucosa y solución salina se pueden reemplazar con otros cebadores si el dispositivo de extracción con disolvente 2140 así lo requiere.

15 El dispositivo de extracción de disolvente 2140 es preferiblemente una columna de carbón diseñada para eliminar el disolvente específico utilizado en la entrada de disolvente 2110. Un dispositivo de extracción de disolvente 2140 de ejemplo es una columna de carbón vegetal Asahi Hemosorber. Se usa una bomba 2135 para mover la segunda capa desde el separador 2125, a través del dispositivo de extracción de disolvente 2140, y hacia un contenedor de salida 2115. La bomba es preferiblemente una bomba peristáltica, tal como la Masterflex Modelo 77201-62.

20 La primera capa se dirige a un contenedor de desechos 2155 que está en comunicación fluida con el separador 2125 a través de la tubería y al menos una válvula. Además, otros residuos, si se generan, pueden dirigirse desde la ruta del fluido que conecta el dispositivo de extracción de disolvente 2140 y el contenedor de salida 2115 al contenedor de desechos 2155.

25 Preferiblemente, una realización de la presente invención usa la gravedad, siempre que sea práctico, para mover el fluido a través de cada uno de la pluralidad de componentes. Por ejemplo, preferiblemente la gravedad se utiliza para drenar el plasma de entrada 2105 y el disolvente de entrada 2110 en el mezclador 2120. Cuando el mezclador 2120 comprende una bolsa de agitación y el separador 2125 comprende una bolsa de embudo, el fluido se mueve de la bolsa de agitación a la bolsa de embudo y, posteriormente, al contenedor de desechos 2155, si es apropiado, utilizando la gravedad.

30 En general, la presente invención comprende preferentemente configuraciones en las que todas las entradas, tales como el plasma de entrada y los disolventes de entrada, los elementos desechables, tales como las bolsas de mezcla, las bolsas de separación, las bolsas de desechos, los dispositivos de extracción de disolventes y los dispositivos de detección de disolventes, y los recipientes de salida se puedan colocar fácilmente en posiciones accesibles y puedan ser quitados y reemplazados fácilmente por un técnico.

35 Para permitir el funcionamiento de las realizaciones de la presente invención descritas anteriormente, es preferible proporcionar a un usuario de dichas realizaciones un conjunto de componentes empaquetados, en forma de kit, que comprende cada componente requerido para practicar la presente invención. Dicho kit incluiría preferiblemente un contenedor de fluido de entrada (es decir, un contenedor de fuente de lipoproteínas de alta densidad), un contenedor de la fuente del agente de eliminación de lípidos (es decir, un contenedor del 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 desechos, tales como una bolsa u otro contenedor, dispositivos de detección del disolvente, y una pluralidad de tubos y una pluralidad de válvulas para controlar el flujo de fluido de entrada (lipoproteína de alta densidad) desde el contenedor de entrada y el agente de eliminación de lípidos (disolvente) desde el contenedor de disolvente hasta el mezclador, para controlar el flujo de la mezcla del agente de eliminación de lípidos, lípidos y derivados de partículas al separador, para controlar el flujo de lípidos y agente de eliminación de lípidos a un contenedor de desechos, para controlar el flujo de agente de eliminación de lípidos residuales, lípidos residuales, y derivados de partículas al dispositivo de extracción, y para controlar el flujo de derivados de partículas al contenedor de salida.

40 En una realización, un kit comprende un recipiente de plástico que tiene componentes desechables de un mezclador, tales como una bolsa u otro recipiente, componentes desechables de un separador, tales como una bolsa u otro recipiente, componentes desechables de un contenedor de residuos, 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 (lipoproteínas de alta densidad) desde el contenedor de entrada y del agente de eliminación de lípidos (disolvente) desde el contenedor de

disolvente hasta el mezclador, para controlar el flujo de la mezcla de agente de eliminación de lípidos, lípidos y derivados de partículas al separador, para controlar el flujo de lípidos y agente de eliminación de lípidos a un contenedor de desechos, para controlar el flujo de agente de eliminación de lípidos residuales, lípidos residuales 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 los dispositivos de extracción del disolvente se proporcionan por separado.

*Horario de Administración*

Las partículas de HDL modificadas de la presente invención pueden administrarse según cualquier programa que sea eficaz para promover el flujo de salida del colesterol celular.

En una realización, la sangre se extrae de un paciente en un volumen suficiente para producir aproximadamente 1 litro de plasma. La sangre se separa en plasma y células de glóbulos rojos utilizando métodos comúnmente conocidos por los expertos en la técnica, tales como la plasmaféresis, y las células de glóbulos rojos se almacenan en una solución de almacenamiento adecuada o se devuelven al paciente durante la plasmaféresis. Los glóbulos rojos se devuelven preferiblemente al paciente durante la plasmaféresis. La solución salina fisiológica también se administra opcionalmente 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 un contenido reducido de lípidos, mientras que no se afecta sustancialmente a la LDL. El plasma tratado resultante que contiene las partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos y con la LDL sustancialmente no afectada se combina opcionalmente con los glóbulos rojos del paciente, si los glóbulos rojos no fueron devueltos durante la plasmaféresis, y se administra al paciente. Una vía de administración es a través del sistema vascular, preferiblemente por vía intravenosa. Este régimen de tratamiento se repite semanalmente durante aproximadamente de 5 a 6 semanas. Tras el tratamiento, se observa un aumento del flujo de salida del colesterol en el paciente.

En otra realización, la sangre se extrae de un paciente en un volumen suficiente para producir aproximadamente 1 litro de plasma. La sangre se separa en plasma y glóbulos rojos utilizando métodos comúnmente conocidos por los expertos en la técnica, tales como la plasmaféresis, y los glóbulos rojos se almacenan en una solución de almacenamiento adecuada o se devuelven al paciente durante la plasmaféresis. El 1 litro de plasma se trata para eliminar el componente de LDL antes del tratamiento adicional del plasma. El 1 litro de plasma se trata con el método de la presente invención para crear partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos. El plasma tratado resultante que contiene las partículas de HDL con lípidos reducidos se combina opcionalmente con los glóbulos rojos del paciente, si los glóbulos rojos no se devolvieron durante la plasmaféresis, y se administran al paciente. Una vía de administración es a través del sistema vascular, preferiblemente por vía intravenosa. Este régimen de tratamiento se repite semanalmente durante aproximadamente 5 a 6 semanas.

Debe entenderse que otros volúmenes de plasma pueden tratarse con el método de la presente invención y administrarse a un paciente en diversos programas de administración. Para un proceso por lotes, los volúmenes de 100 ml a 3500 ml de plasma se pueden tratar con el presente método. La frecuencia del tratamiento también puede variar desde varias veces por semana hasta una vez al mes o menos, dependiendo del volumen a tratar y la gravedad de la condición del paciente.

En otro enfoque de la presente invención, después de la eliminación de un volumen deseado de la sangre de un 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 un contenido reducido de lípidos se aíslan del plasma y se administra al paciente en un vehículo aceptable.

En otra realización más, puede obtenerse plasma heterólogo, tratarlo con el método de la presente invención y el plasma tratado que contiene partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos ser administrado a un paciente que no fue la fuente del plasma. En una realización adicional, puede obtenerse plasma heterólogo, tratarlo con el método de la presente invención y las partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos se separan del plasma tratado. Estas partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos pueden administrarse en un vehículo aceptable a un paciente que no fue la fuente del plasma.

En otra realización más, después de la eliminación de un volumen deseado de la sangre de un paciente, se le permite al paciente recuperarse durante de 1 a 4 días en términos de producir sangre nueva y alcanzar niveles endógenos de HDL en plasma sustancialmente similares a los niveles de HDL en plasma antes de extraer la sangre. La sangre extraída se separa en plasma y glóbulos rojos y el plasma se trata para reducir los niveles de lípidos. Las partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos se aíslan del plasma y se administran al paciente. Alternativamente, las partículas de HDL con un contenido reducido de lípidos no se aíslan del plasma y el plasma tratado se administra al paciente.

En otra realización, el plasma se trata con los métodos de la presente invención para reducir los niveles de lípidos. A continuación, la proteína Apo A-1 se purifica de este plasma tratado utilizando técnicas tales como la cromatografía de afinidad. La proteína Apo A-1 modificada y purificada resultante se administra en un vehículo aceptable a un

paciente junto con las partículas de HDL modificadas con un contenido reducido de lípidos. Estas partículas de HDL modificadas con un contenido reducido de lípidos pueden proporcionarse al paciente como partículas de HDL aisladas en un vehículo aceptable o incluidas con el plasma tratado.

#### *Administración con otras terapias*

- 5 Las partículas de HDL modificadas de la presente invención pueden administrarse junto con uno o más enfoques terapéuticos adicionales. Las partículas de HDL modificadas de la presente invención pueden administrarse junto con el ejercicio y la restricción dietética de la ingesta de grasas y colesterol.

10 Las partículas de HDL modificadas de la presente invención pueden administrarse 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 los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, o las estatinas, pueden administrarse en dosis y según los esquemas de administración comúnmente conocidos por un experto en la técnica. Las estatinas incluyen, pero no se limitan a la cerivastatina, atorvastatina, fluvastatina, simvastatina, pravastatina y lovastatina. Por ejemplo, comúnmente se emplean dosis de 10 mg, 20 mg, 40 mg u 80 mg de estatinas, tomadas una vez al día. La administración de las partículas de HDL modificadas de la presente invención puede eliminar la necesidad de la terapia con estatinas en  
15 pacientes o reducir la dosis requerida de estatinas.

En otro aspecto, las partículas de HDL modificadas de la presente invención se usan junto con la administración de agentes diseñados para reducir la absorción de grasa y colesterol. Dichos agentes, por ejemplo, la ezetimiba, y las dosis clínicamente apropiadas son conocidos por los expertos en la técnica.

20 En otro aspecto más, las partículas de HDL modificadas de la presente invención se usan junto con la administración de uno o más agentes tales como los derivados de ácido fibrótico (gemfibrozil), ácido nicotínico (niacina) y resinas de unión a ácidos biliares (colestiramina, colestipol) y las dosificaciones clínicamente apropiadas son conocidas por un experto con conocimiento ordinario de la técnica.

25 En otro aspecto más, las partículas de HDL modificadas de la presente invención se usan junto con la administración de fármacos antiinflamatorios, tales como la aspirina, conocidos por los expertos en la técnica. Las dosis clínicamente apropiadas de fármacos antiinflamatorios son conocidas por los expertos en la técnica. Los medicamentos antiinflamatorios a menudo se recetan a pacientes con enfermedades vasculares, ya que se cree que la inflamación es un factor causante de la aterosclerosis y otras enfermedades vasculares.

30 Las partículas de HDL modificadas de la presente invención se usan junto con la administración de agentes tales como las estatinas y con agentes diseñados para reducir la absorción de grasa y colesterol. Esta combinación de tres terapias es eficaz para mejorar el flujo de salida del colesterol de las células y permite la administración de dosis más bajas de estatinas. Las partículas de HDL modificadas de la presente invención también se usan junto con cualquiera de los enfoques terapéuticos descritos anteriormente.

Los siguientes ejemplos servirán para ilustrar adicionalmente la presente invención.

#### **Ejemplos**

##### 35 Ejemplo 1

#### *Separación y caracterización del colesterol total, apolipoproteína A1 (Apo A-1), apolipoproteína B (Apo B) y fosfolípidos en plasma normal*

40 se caracterizaron 25 ml de plasma de banco en términos del colesterol total, apolipoproteína A1 (Apo A-1), apolipoproteína B (Apo B) y fosfolípidos. Se cargó una alícuota de 1 ml del plasma de banco en una columna de Sephacryl S-300 26/60 (FPLC). Se aplicó un tampón de elución de solución salina tamponada con fosfato que contenía EDTA 1 mM a la columna y se eluyó a 2 ml/minuto. Se recogieron aproximadamente 96 fracciones, una cada 43 segundos, comenzando 41 minutos después de la aplicación de la muestra de plasma. Cada fracción se caracterizó en términos del colesterol total, Apo A-1, Apo B y fosfolípidos.

45 Las partículas que contenían Apo B que comprendían lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se eluyeron con las fracciones 10-40. Las partículas que contenían Apo A-1, que comprendían lipoproteínas de alta densidad (HDL), se eluyeron con las fracciones restantes. Los resultados se muestran en la Figura 3. Un análisis del colesterol total en plasma indicó una clara separación 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.

##### 50 Ejemplo 2

#### *Creación selectiva de partículas de HDL asociadas a Apo A-1 con colesterol reducido o con colesterol y fosfolípidos reducidos utilizando DIPE*

Este método de tratamiento de plasma selectivo emplea una proporción de 1:1 DIPE:plasma. La muestra se agitó en

vórtex durante 15 segundos y luego se dejó separar por gravedad. El carbón vegetal activado se utilizó para eliminar el DIPE residual después del proceso y se midieron varios parámetros hematológicos diferentes.

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

Una comparación de la elución de la muestra deslipidada con la elución de plasma normal no deslipidado se presenta en las Figuras 4 y 5. Los resultados muestran un desplazamiento a la derecha de las partículas de HDL asociadas a Apo A-1, lo que indica una partícula más pequeña no asociada con el colesterol (Figura 4) y tampoco asociada con fosfolípidos (Figura 5). En consecuencia, este método de deslipidación creó partículas de HDL asociadas con Apo A-1 que eran bajas en o estaban sustancialmente desprovistas de colesterol y fosfolípidos y, por lo tanto, tenían una nueva capacidad para unirse con el colesterol y los fosfolípidos. Con este método los lípidos se eliminaron solo ligeramente de las partículas de LDL (Apo B) (Figura 6).

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

#### Ejemplo 3

*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.*

Se empleó una mezcla de sevoflurano y n-butanol como disolvente en una concentración de 95% de sevoflurano y 5% de n-butanol. La mezcla se añadió al plasma en una proporción de 2:1 de disolvente a plasma. La muestra se agitó en vórtex durante 15 segundos y luego se centrifugó. Se añadió carbón vegetal activado para eliminar el disolvente residual. La muestra sin disolventes resultante se procesó en una columna de FPLC como se describe en el Ejemplo 1. Los datos relativos al porcentaje de reducción de colesterol, fosfolípidos y Apo A-1 se obtuvieron a partir de mediciones cuantitativas y no a partir de los perfiles de elución de FPLC.

Este método redujo el colesterol total en un 9% y los fosfolípidos en un 9%. Se observó una disminución aproximadamente del 14% en Apo A-1. La Figura 7 muestra que este método dio como resultado partículas de HDL asociadas con Apo A-1 de menor peso que no se asociaron con el colesterol en comparación con el plasma que no se sometió a dicho tratamiento. Sin embargo, estas partículas de HDL asociadas a Apo A-1 se asociaron con fosfolípidos (Figura 8). Hubo poco efecto sobre las partículas de LDL asociadas a Apo B como se muestra en la Figura 9. En resumen, este proceso dio como resultado una partícula de HDL modificada que contenía Apo A-1 y fosfolípidos, pero poco o nada de colesterol.

#### Ejemplo 4

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

Alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (AP), bilirrubina-T, sodio, potasio, fósforo, albúmina, globulina y la proporción albúmina/globulina (A/G) se analizaron en plasma normal sin tratar y en plasma tratado con DIPE 100% o con sevoflurano:n-butanol. Los resultados se presentan en la Figura 10.

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

#### Ejemplo 5

*Resumen de la eficacia de diferentes disolventes en la eliminación del colesterol de HDL y efectos sobre LDL*

Las Figuras 11-15 muestran un perfil Superosa 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 el colesterol total, fosfolípidos, Apo B, Apo A-1 y Apo A2. Los datos indican que el colesterol se reduce después del tratamiento con disolvente en las áreas asociadas con Apo A-1 y Apo A2 (el pico en el lado derecho de cada figura), mientras que la Apo B asociado con LDL (pico medio) permanece sustancialmente sin cambios. Sin embargo, un tratamiento severo con disolvente con una proporción de disolvente de 75:25 DIPE:n-butanol (Figura 14) redujo drásticamente el colesterol total y los fosfolípidos cuando se comparó con el plasma no tratado (Figura 11).

#### Ejemplo 6

*Estudios de flujo de salida del colesterol en plasma tratado con varios disolventes*

Se emplearon todas las condiciones de los disolventes anteriores para probar los efectos del plasma tratado sobre el flujo de colesterol en la ruta ABCA1 y la ruta SRB1 según se midió en células COS y células Fu5AH. Los métodos

empleados fueron los descritos por Rothblatt y colaboradores (de la Llera Moya et al., Arteriosclerosis. & Thrombosis 14: 1056-1065, 1994).

Los métodos empleados se describen en general en los párrafos siguientes. El sistema de cultivo de células de tejido se diseñó para cuantificar la contribución del receptor eliminador BI (SR-BI) o del transportador de casete de unión a ATP 1 (ABCA1) al flujo de salida del colesterol celular cuando las células se exponen al suero o lipoproteínas aisladas. El enfoque general es medir la liberación del colesterol celular radiomarcado a aceptadores aislados o suero completo. Las contribuciones de SR-BI o ABCA1 a este proceso de flujo de salida se determinan comparando la liberación obtenida de las células que carecen del receptor específico con la observada en cultivos celulares paralelos que expresan el receptor. Por lo tanto, para cuantificar la contribución de ABCA1 al flujo de salida del colesterol celular, las células de macrófago de ratón transformadas se cultivan en monocapas y se pre-marcan con <sup>3</sup>H-colesterol. Un conjunto de monocapas se trata con AMPc, que se ha demostrado que regula al alza el receptor ABCA1, mientras que un conjunto de monocapas replicadas se dejan sin tratar y sirven como células de control que carecen de ABCA1. Los sueros que se van a analizar se diluyen a una concentración adecuada y se incuban tanto en monocapas positivas como negativas para ABCA1. La liberación del colesterol radiomarcado se determina después de un tiempo de incubación apropiado que varía de 1 a 12 horas. La contribución de ABCA1 al flujo de salida se determina restando el flujo de salida obtenido en cultivos negativos para ABCA1 del obtenido en los cultivos positivos para ABCA1.

Un ensayo general para determinar la contribución de SRBI al flujo de salida del colesterol utiliza el mismo enfoque descrito anteriormente. Las líneas celulares que sirven como donantes de colesterol se tratan de manera que carecen de SRBI o expresan altos niveles del receptor. En el protocolo general, las células COS-7 utilizadas actualmente se transfectan de forma transitoria cuando se trata de SR-BI. Estas células se marcan previamente con <sup>3</sup>H-colesterol y luego se exponen al suero de prueba durante períodos de tiempo apropiados. Después de este período, se retira el medio y se determina la cantidad de colesterol celular radiomarcado que se ha liberado. El flujo de salida de colesterol del control, las células negativas para SR-BI se resta del observado con las células que expresan SR-BI. La diferencia obtenida por este cálculo refleja la contribución de SR-BI al flujo de salida de colesterol. Un sistema celular alternativo que se puede usar para determinar el flujo mediado por SR-BI es la célula de hepatoma de rata Fu5AH. Estas células expresan niveles muy altos de SR-BI y el flujo de salida del colesterol radiomarcado de Fu5AH es una medida muy confiable de la contribución de SR-BI al proceso de flujo de salida.

Los resultados se muestran en la Figura 16 y demuestran que el plasma tratado con los diversos disolventes estimuló el flujo de salida del colesterol de 20 a 25 veces más eficazmente que el plasma no tratado o tratado de manera simulada, tomado del mismo grupo de plasma de partida. Este efecto se observó en las células ABCA1, que poseen una vía metabólica que se cree que es representativa de la salida del colesterol de las paredes arteriales, pero no en las células COS+ o FU5AH que se cree que son representativas de la vía SRB1 en el hígado. Pruebas adicionales de sevoflurano:n-butanol de tres muestras de plasma diferentes obtenidas de diferentes individuos produjeron resultados similares (Figura 16, conjunto de histogramas). Al crear una partícula de HDL modificada, la presente invención, por lo tanto, afecta positivamente la efectividad de las vías SRB1 y ABCA1. La presente invención también abarca la modificación de las rutas SRB1 y ABCA1 modificando la proporción relativa de fosfolípidos a Apo A-1 en partículas de HDL a través de los procesos de deslipidación descritos anteriormente.

#### Ejemplo 7

*Análisis del tratamiento con disolventes en los niveles de partículas pre B-2 HDL asociadas con Apo A-1 y partículas pre B-1 HDL asociadas con Apo A-1*

Se examinaron los efectos individuales de sevoflurano:n-butanol y DIPE:n-butanol (95:5) en las subespecies de HDL que contienen Apo A-1 utilizando geles de PAGE nativos al 3-16%, seguidos de inmunotransferencia y análisis de imagen. Las técnicas empleadas se describen en Asztalos et al., Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; 15:1419-1423, 1995 y Asztalos et al., Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; 17:1885-1893, 1997.

El lado izquierdo de las Figuras 17 y 18 muestran cada una subespecies de HDL que contienen Apo A-1, a saber, partículas pre $\beta$ -2, pre $\beta$ -1,  $\alpha$  y pre- $\alpha$  en plasma lipémico normal, mientras que el panel derecho de cada figura muestra plasma normal tratado con sevoflurano:n-butanol y DIPE:n-butanol (95:5)

La Figura 17 demuestra que el plasma tratado con sevoflurano:n-butanol mostró un aumento en las subespecies de HDL pre $\beta$ -2, pre $\beta$ -1 que contienen Apo A-1 y una disminución en las subespecies de  $\alpha$  HDL. Se observó un patrón similar después del tratamiento con DIPE:n-butanol (Figura 18). Estos resultados demuestran que estos tratamientos con disolventes del plasma aumentaron las subespecies de HDL pre $\beta$ -2 y pre $\beta$ -1 que contienen Apo A-1, mejorando así su disponibilidad para aceptar nuevo colesterol y facilitando el flujo de salida del colesterol celular.

Una comparación similar del plasma normal no tratado que se muestra en el panel izquierdo de las Figuras 17 y 18 y otra muestra de plasma no tratada con niveles de colesterol ligeramente elevados produjo un patrón similar (datos no mostrados) con la mayoría de las especies de HDL inmunorreactivas apareciendo en la forma  $\alpha$ HDL con una densidad relativamente menor asociada con las partículas de HDL pre $\beta$ -2 y pre $\beta$ -1. Estos resultados proporcionan un control metodológico interno.

Ejemplo 8

*Administración de derivados de HDL a un paciente con colesterol elevado y enfermedad arterial coronaria*

Un paciente masculino de 51 años se presenta con síndrome coronario agudo y se determina que tiene aterosclerosis mediante angiografía. Una unidad de sangre se extrae semanalmente del paciente. El plasma se recupera y se procesa con el método de la presente invención para producir derivados de HDL que son partículas con un contenido reducido de colesterol, mientras que los glóbulos rojos se devuelven al paciente. Estas partículas de HDL con un contenido reducido de colesterol en el plasma tratado se administran al paciente por vía intravascular a intervalos semanales durante de 5-10 semanas. Otra prueba de angiografía después de completar el tratamiento muestra menores cantidades de placa aterogénica en los vasos coronarios en comparación con la primera prueba de angiografía.

Ejemplo 9

*Administración de derivados de HDL junto con atorvastatina y ezetimiba a un paciente con colesterol elevado y enfermedad arterial coronaria*

Una mujer de 58 años se presenta con síndrome coronario agudo y se determina que tiene aterosclerosis a través de una angiografía. Una unidad de sangre se extrae semanalmente del paciente. El plasma se recupera y se procesa con el método de la presente invención para producir derivados de HDL que son partículas con un contenido reducido de colesterol, mientras que los glóbulos rojos se devuelven al paciente. Estas partículas de HDL con un contenido reducido de colesterol en el plasma tratado se administran al paciente por vía intravascular a intervalos semanales durante de 5-10 semanas. El paciente había recibido previamente 80 mg de atorvastatina diariamente con 10 mg de ezetimiba. Estos medicamentos se continúan diariamente junto con la administración semanal de partículas de HDL con un contenido reducido de colesterol. Otra prueba de angiografía después de completar el tratamiento muestra menores cantidades de placa aterogénica en los vasos coronarios en comparación con la primera prueba de angiografía.

Ejemplo 10

*Administración de derivados de HDL junto con simvastatina y ezetimiba a un paciente obeso con colesterol elevado y enfermedad arterial coronaria*

Una paciente femenina obesa de 48 años presenta niveles elevados de LDL y colesterol, y el resultado de una prueba angiográfica que indica aterosclerosis en tres arterias coronarias. Se extrae una unidad de sangre semanalmente del paciente. El plasma se recupera y se procesa con el método de la presente invención para producir derivados de HDL que son partículas con un contenido reducido de colesterol, mientras que los glóbulos rojos se devuelven al paciente. Estas partículas de HDL con un contenido reducido de colesterol se combinan con el plasma tratado y se administran al paciente por vía intravascular a intervalos semanales durante de 5-10 semanas. El paciente había recibido previamente 80 mg de simvastatina diariamente con 10 mg de ezetimiba. Estos medicamentos se continúan diariamente junto con la administración semanal de partículas de HDL con un contenido reducido de colesterol. El paciente se coloca en un programa de ejercicio moderado.

Un nuevo análisis de sangre indica una reducción en el colesterol circulante, una reducción en LDL y un aumento en la HDL circulante. El paciente pierde 15 libras durante un período de cinco meses. Un nuevo procedimiento angiográfico muestra menores cantidades de placa aterogénica en los vasos coronarios en comparación con el primer procedimiento angiográfico.

Ejemplo 11

*Administración de derivados de HDL a un paciente diabético con colesterol elevado y enfermedad arterial coronaria*

Una paciente diabética de 44 años de edad presenta niveles elevados de LDL y colesterol, y el resultado de una prueba angiográfica indica aterosclerosis en dos arterias coronarias. Una unidad de sangre se extrae semanalmente del paciente. El plasma se recupera y se procesa con el método de la presente invención para producir derivados de HDL que son partículas con un contenido reducido de colesterol, mientras que los glóbulos rojos se devuelven al paciente. Estas partículas de HDL con un contenido reducido de colesterol se combinan con el plasma tratado y se administran al paciente por vía intravascular a intervalos semanales durante de 5-10 semanas. El paciente había recibido previamente inyecciones diarias de insulina. Estas inyecciones se continúan diariamente junto con la administración semanal de partículas de HDL con un contenido reducido de colesterol.

Un nuevo análisis de sangre indica una reducción en el colesterol circulante, una reducción en LDL y un aumento en la HDL circulante. Un nuevo procedimiento angiográfico muestra menores cantidades de placa aterogénica en los vasos coronarios en comparación 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*

5 Un paciente de sexo masculino de 66 años presenta niveles elevados de LDL y colesterol e informa dolor en la extremidad inferior derecha. Una prueba angiográfica indica aterosclerosis en las arterias poplítea derecha y tibial posterior, lo que lleva a un diagnóstico de claudicación intermitente. Una unidad de sangre se extrae semanalmente del paciente. El plasma se recupera y se procesa con el método de la presente invención para producir derivados de HDL que son partículas con un contenido reducido de colesterol, mientras que los glóbulos rojos se devuelven al paciente. Estas partículas de HDL con un contenido reducido de colesterol se combinan con el plasma tratado y se administran al paciente por vía intravascular a intervalos semanales durante de 5-10 semanas.

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

15

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende partículas de lipoproteína de baja densidad no modificadas y partículas de lipoproteína de alta densidad modificadas que comprenden lípidos y apolipoproteína A-1,  
en donde los lípidos incluyen fosfolípidos,
- 5 en donde la composición está formada por un procedimiento extracorpóreo que comprende exponer un fluido biológico que comprende partículas de lipoproteína de baja densidad y partículas de lipoproteína de alta densidad a un disolvente,  
en donde las partículas de lipoproteína de baja densidad no modificadas están no modificadas, cuando se comparan con las partículas de lipoproteína de baja densidad en el fluido biológico antes de la exposición del fluido biológico al disolvente,
- 10 y en donde las partículas de lipoproteína de alta densidad modificadas tienen un contenido menor de colesterol comparado con las correspondientes partículas de lipoproteína de alta densidad en el fluido biológico antes de la exposición del fluido biológico al disolvente.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el disolvente comprende sevoflurano, trifluoroetano o isoflurano.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde el disolvente comprende un éter.
4. La composición de la reivindicación 3, en donde el éter es el éter diisopropílico.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el disolvente comprende un alcohol.
6. La composición de la reivindicación 5, en donde el alcohol es el n-butanol.
- 20 7. La composición de la reivindicación 1, en donde el disolvente comprende una mezcla de sevoflurano y n-butanol.
8. La composición de las reivindicaciones 3 o 5, en donde el éter es un éter C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> y/o el alcohol es un alcohol C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>.
9. Un procedimiento para preparar una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende las etapas de:
- 25 a. Mezclar el disolvente con el fluido biológico que comprende partículas de lipoproteína de alta densidad y partículas de lipoproteína de baja densidad, para crear una mezcla que comprende los derivados de las partículas, las partículas de lipoproteína de baja densidad no modificadas, los lípidos eliminados, y el disolvente;
- b. separar el disolvente y los lípidos eliminados de la mezcla; y
- 30 c. recoger la composición
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en donde la mezcla se lleva a cabo usando un mezclador estático.
11. El procedimiento de la reivindicación 9 o 10, en donde la separación se lleva a cabo usando una columna de carbón vegetal.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el fluido biológico comprende partículas de lipoproteína de baja densidad y partículas de lipoproteína de alta densidad obtenidas mediante las etapas de:
- 35 a. obtener células de la sangre, y
- b. separar las células de la sangre de la sangre para producir el fluido biológico que comprende las partículas de lipoproteína de alta densidad y las partículas de lipoproteína de baja densidad.
- 40 13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el fluido biológico es la sangre, plasma, suero, u otra fracción de la sangre adecuada
14. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende una estatina, un inhibidor de la recaptación del colesterol, un derivado de ácido fibrótico, ácido nicotínico, ácido de unión al ácido biliar o una combinación de los mismos.
- 45 15. El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 13 o 14, para la manufactura de una composición farmacéutica para la regresión de la aterosclerosis o para aumentar el flujo de salida del colesterol

celular.

16. El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 13 o 14, para la manufactura de una composición farmacéutica para cambiar la reología de la sangre de un paciente con circulación de la sangre impedida.

FIGURA 1

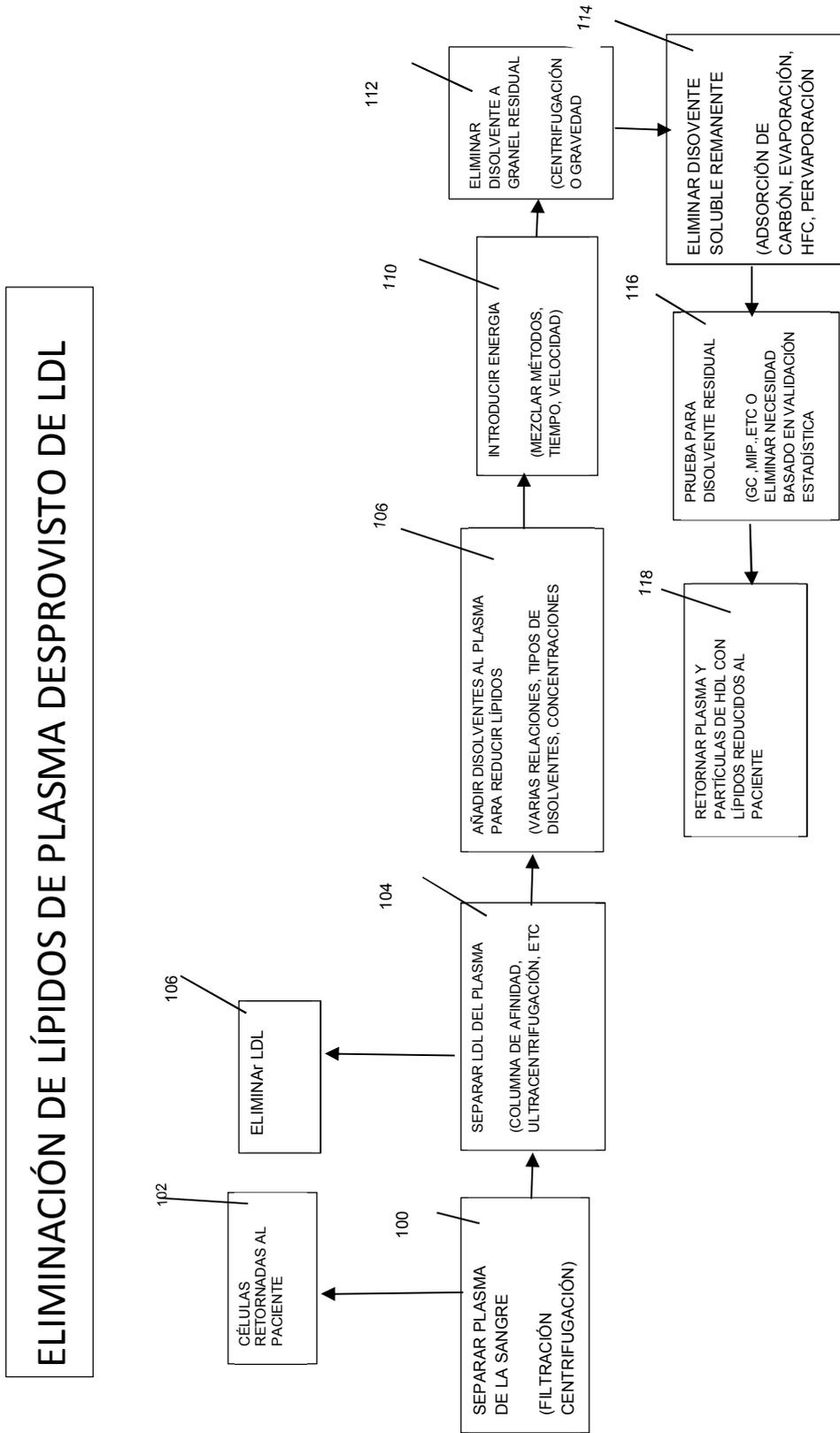


FIGURA 2

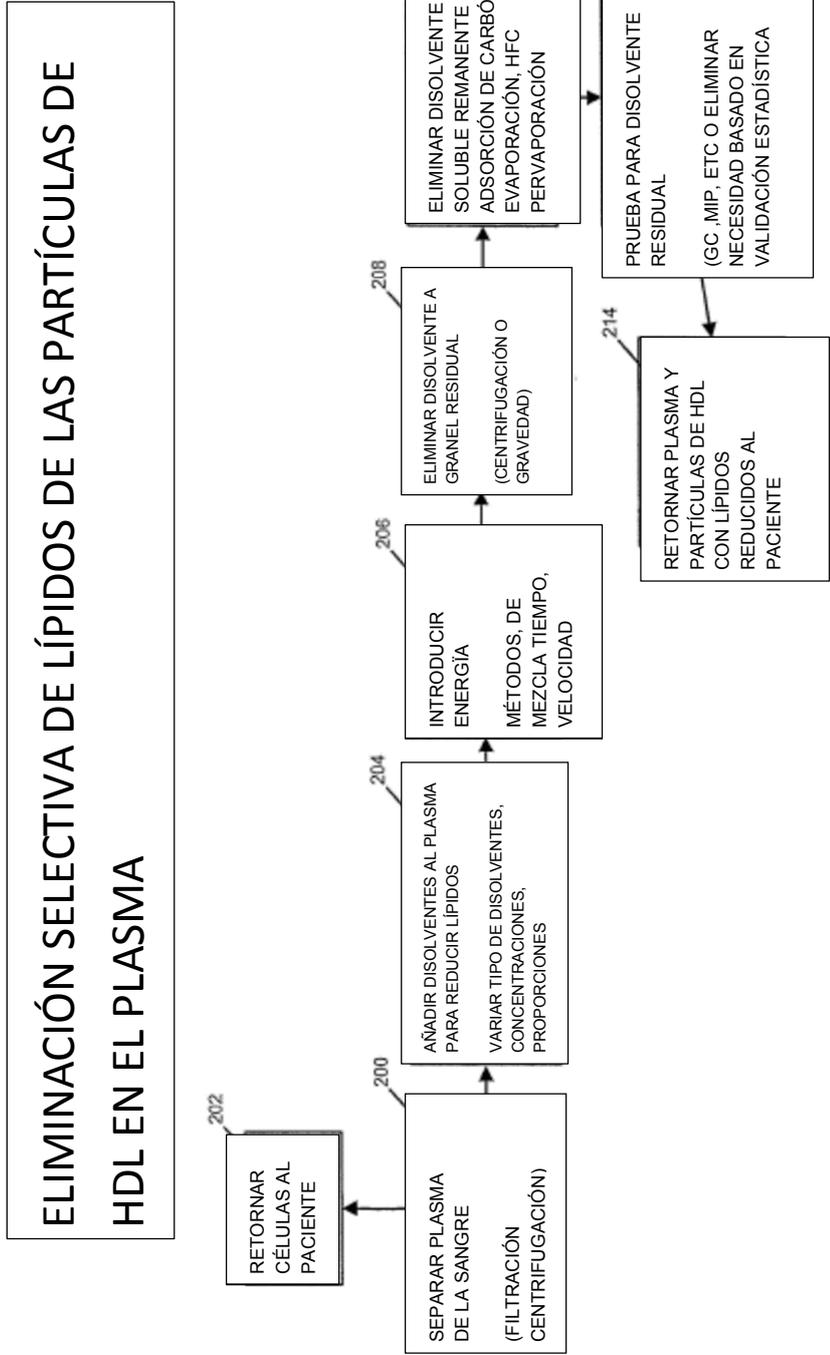


FIGURA ·3  
Perfil de FPLC de plasma  
normal

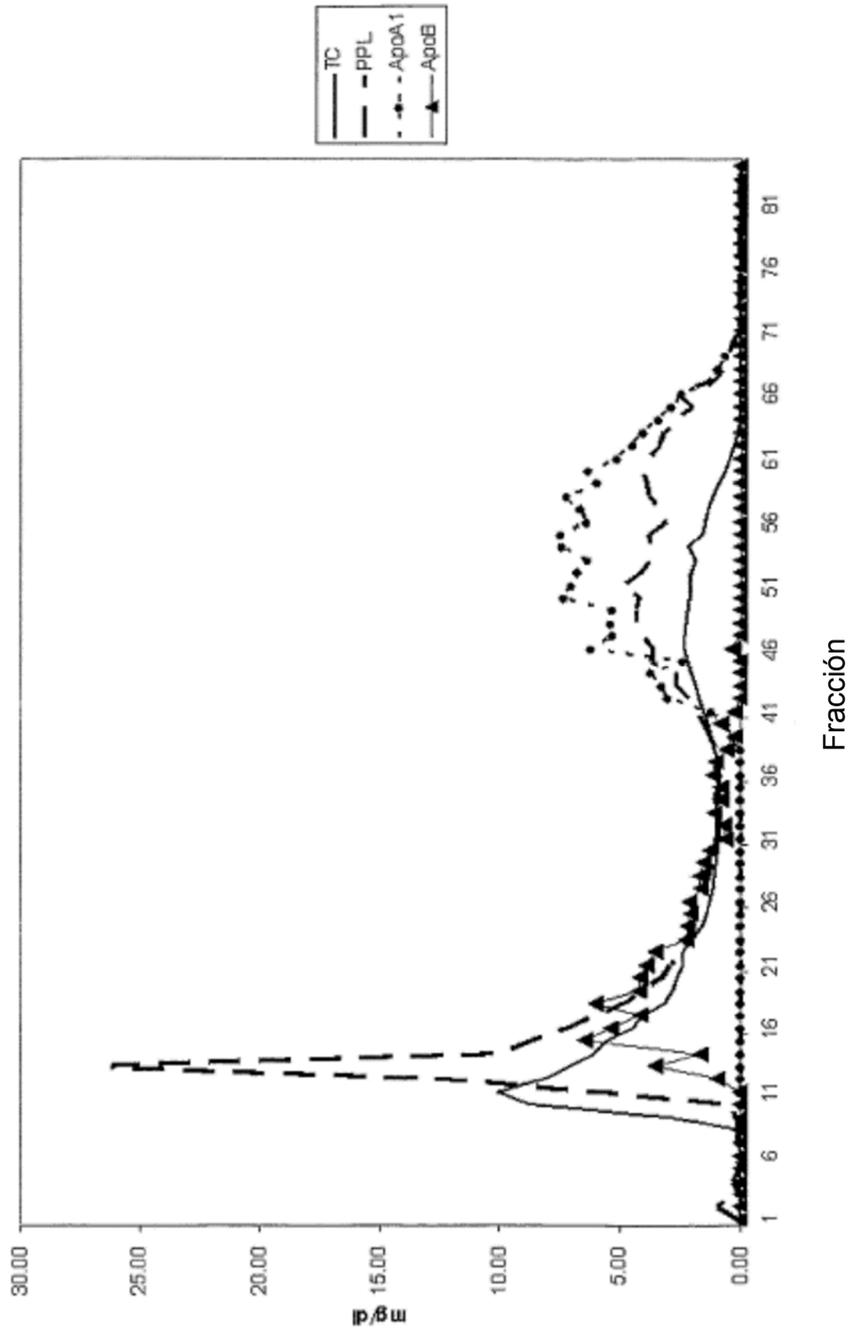


FIGURA 4

Perfil de FPLC de ApoA1 frente al del colesterol total (TC) para el Apo método de deslipidación de tratamiento de un plasma normal de banco con DIPE al 100%

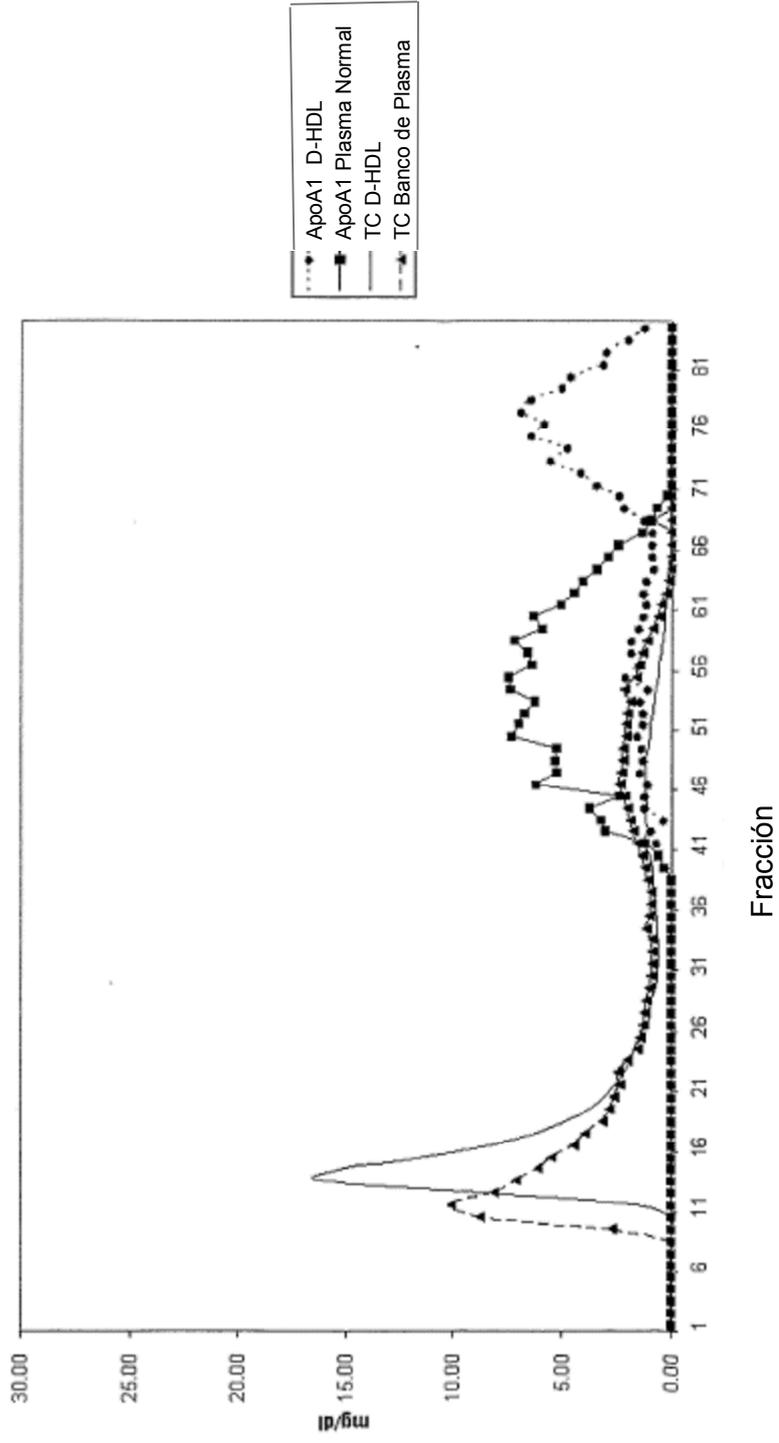


FIGURA 5

Perfil de FPLC de ApoA1 frente al de los fosfolípidos (PPL) para el método de deslipidación de tratamiento de un plasma normal de banco con DIPE al 100%

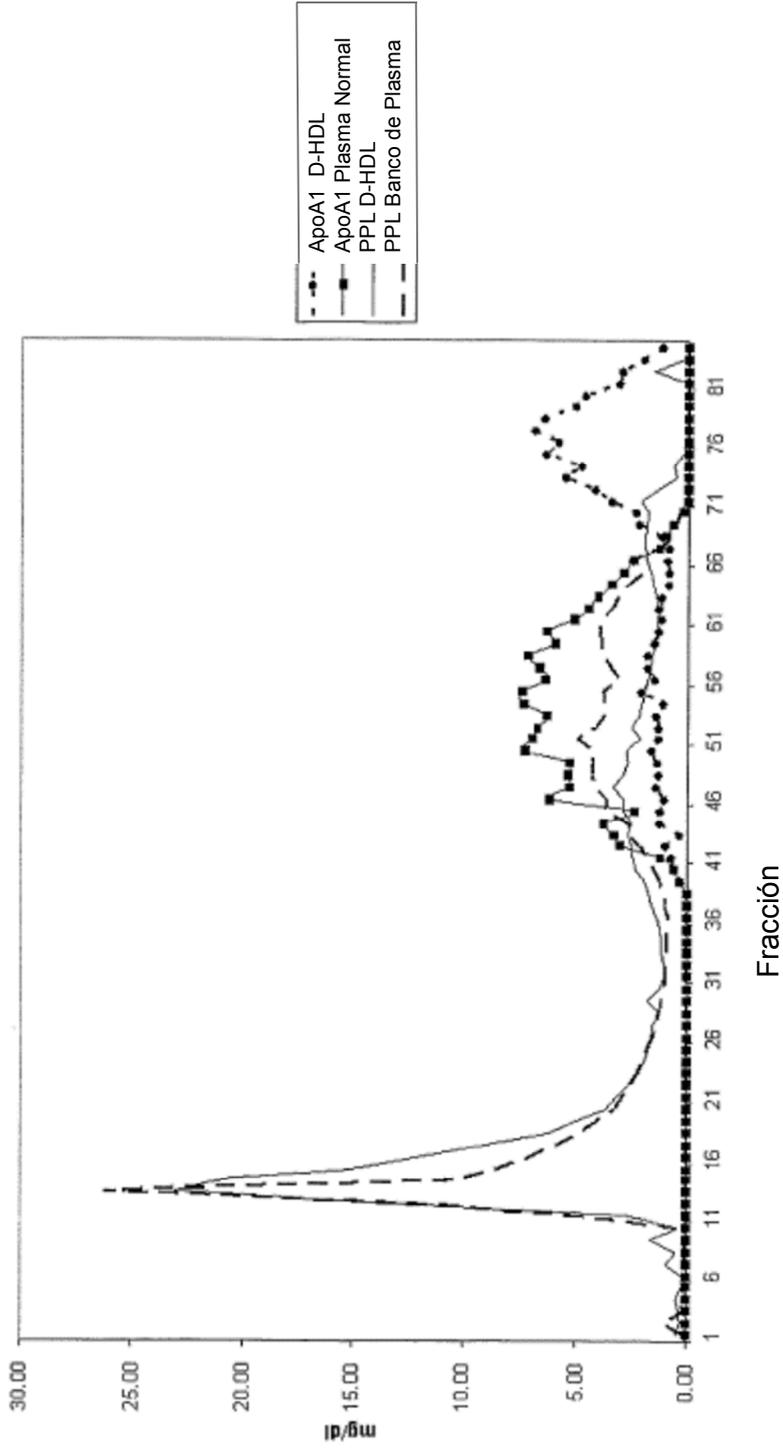


FIGURA 6

Perfil de FPLC de ApoB frente al de los fosfolípidos (PPL) para el método de deslipidación de tratamiento de un plasma normal de banco con DIPE al 100%

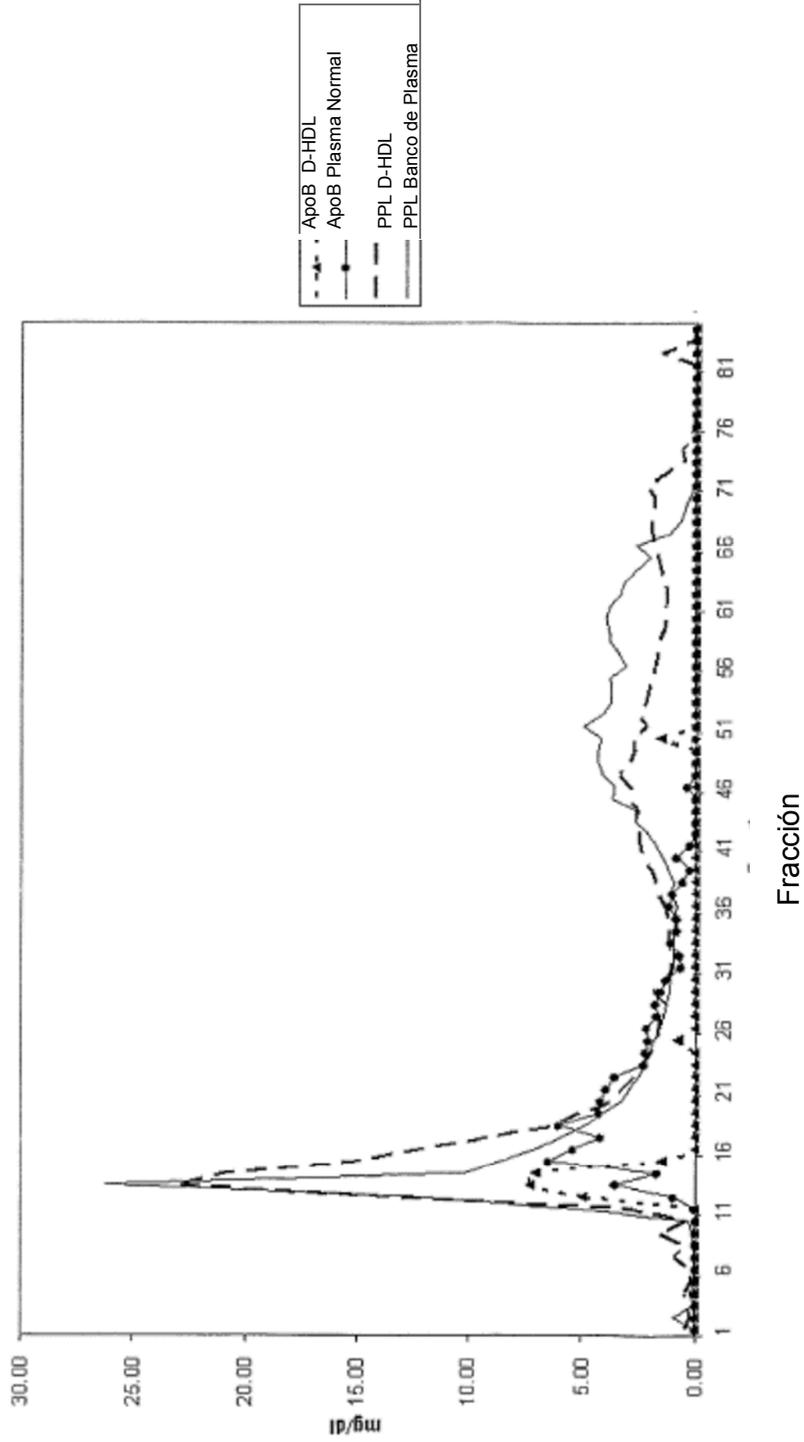


FIGURA 7

Perfil de FPLC de ApoA1 frente al del colesterol total (TC) para el método de deslipidación de tratamiento de un plasma normal de banco con 95:5 sevoflurano:n-butanol

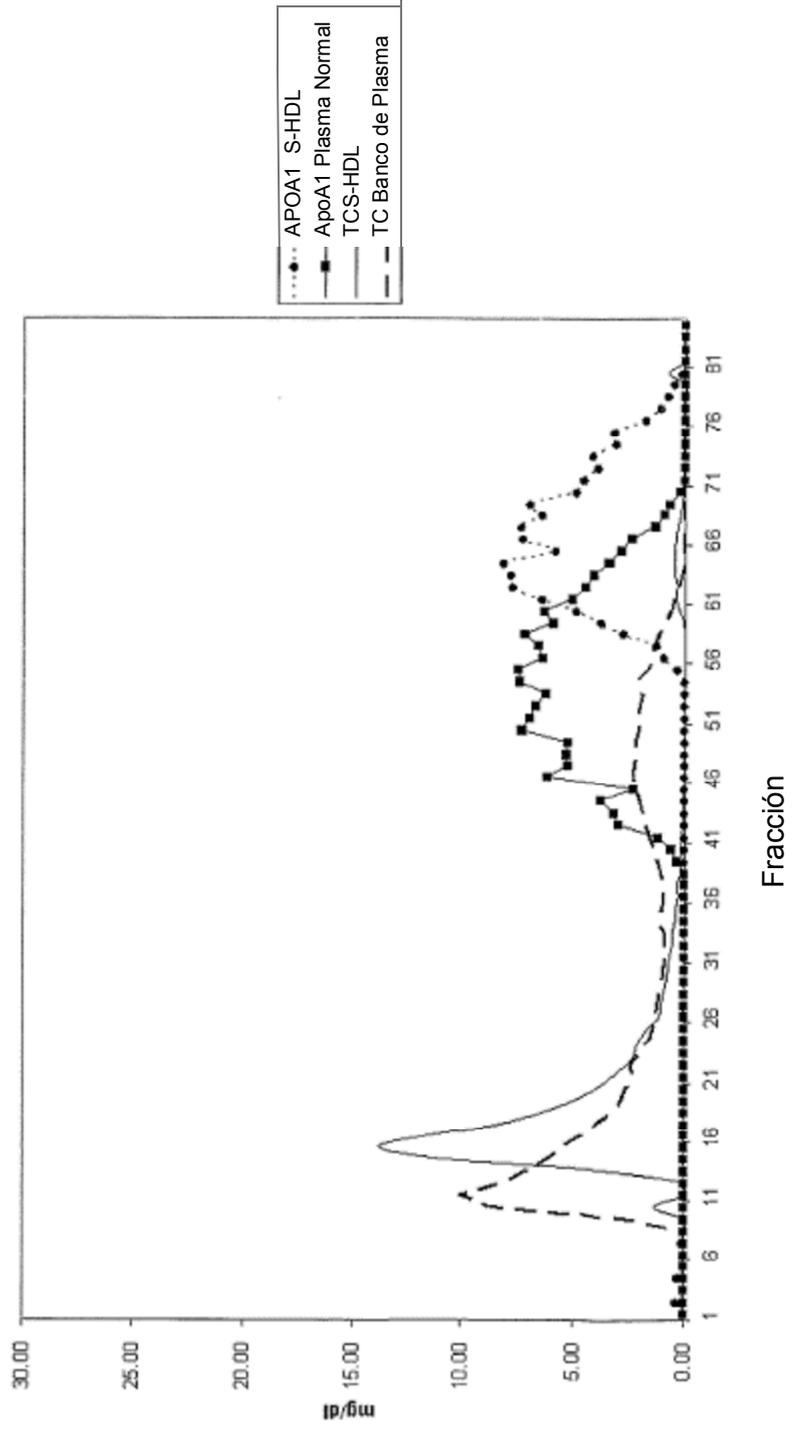


FIGURA 8

Perfil de FPLC de ApoA1 frente al de los fosfolípidos (PPL) para el método de deslipidación de tratamiento de plasma de banco normal con 95:5 sevoflurano:n-butanol

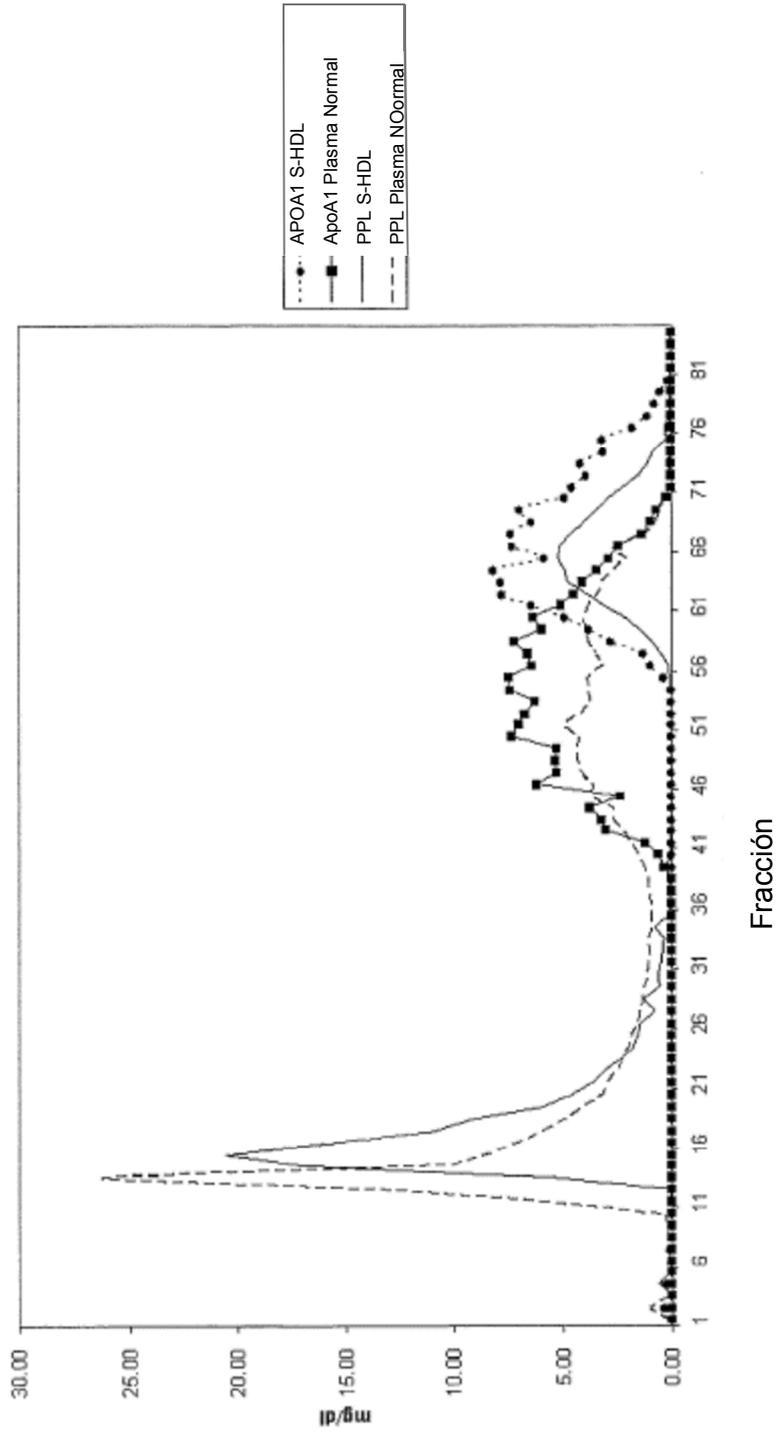


FIGURA 9

Perfil de FPLC de ApoB frente al de los fosfolípidos (PPL) para el método de deslipidación de tratamiento de plasma de banco normal con 95:5 sevoflurano:n-butanol

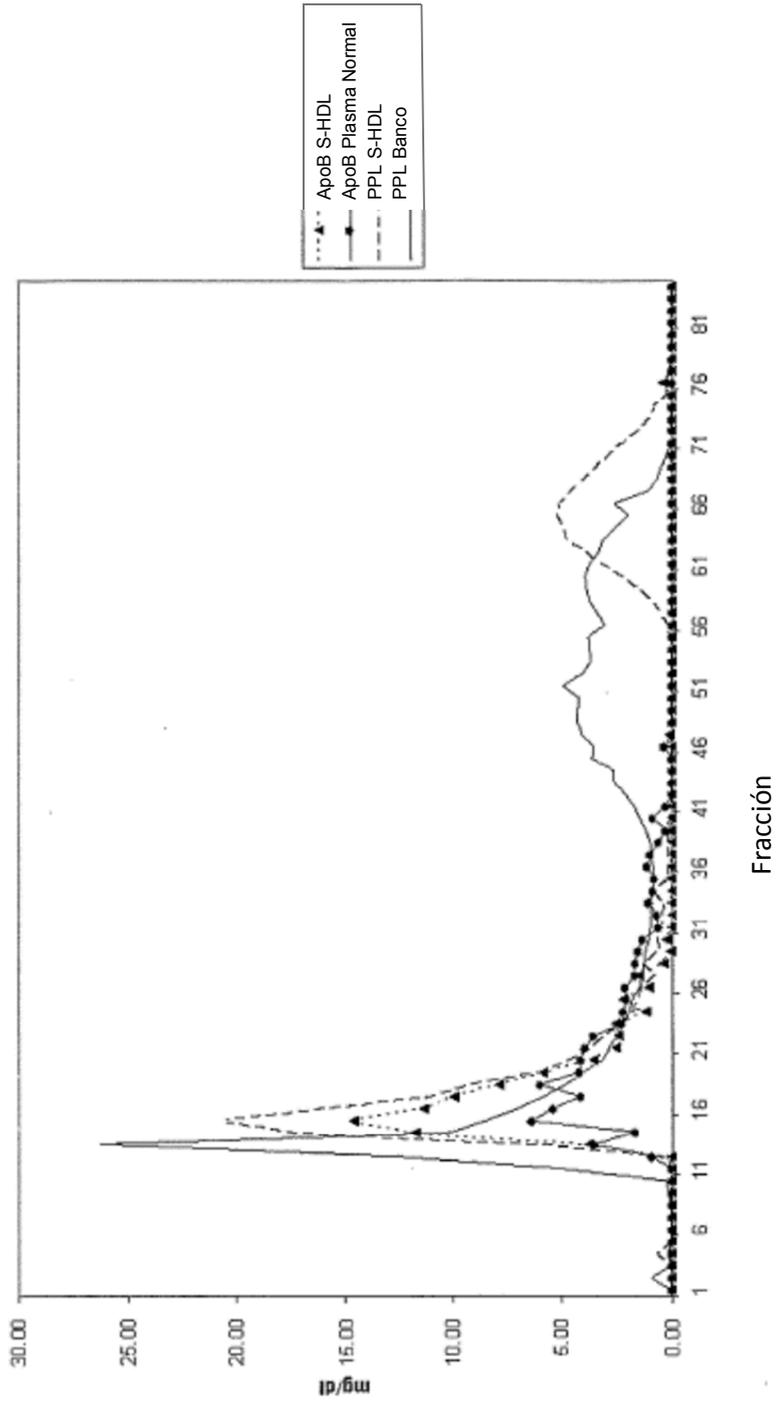


FIGURA 10

Efecto del tratamiento con disolvente sobre los parámetros clínicos

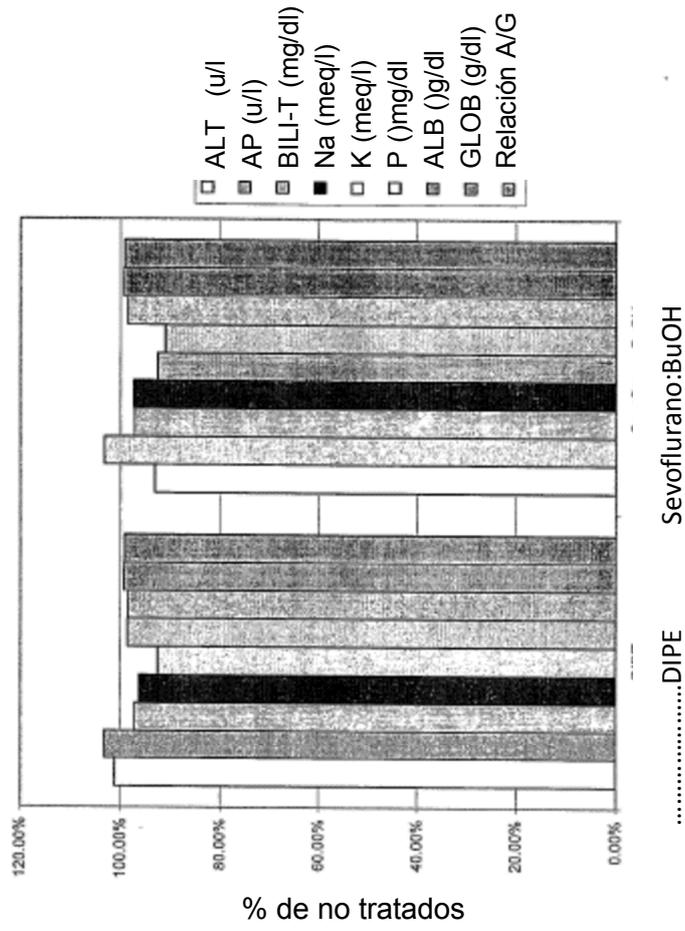


FIGURA 11  
Perfil de Superose 6 FPLC de plasma  
normal

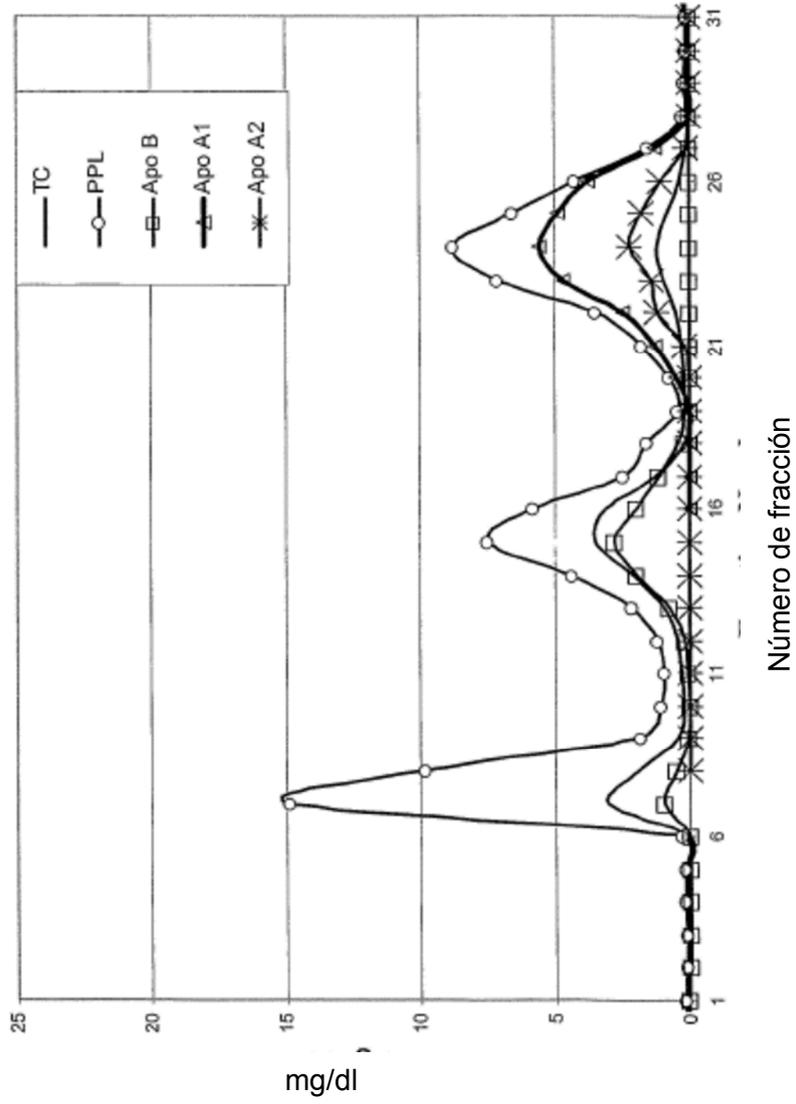


FIGURA 12  
Perfil de Superose 6 FPLC de plasma normal  
tratado con DIPE al 100%

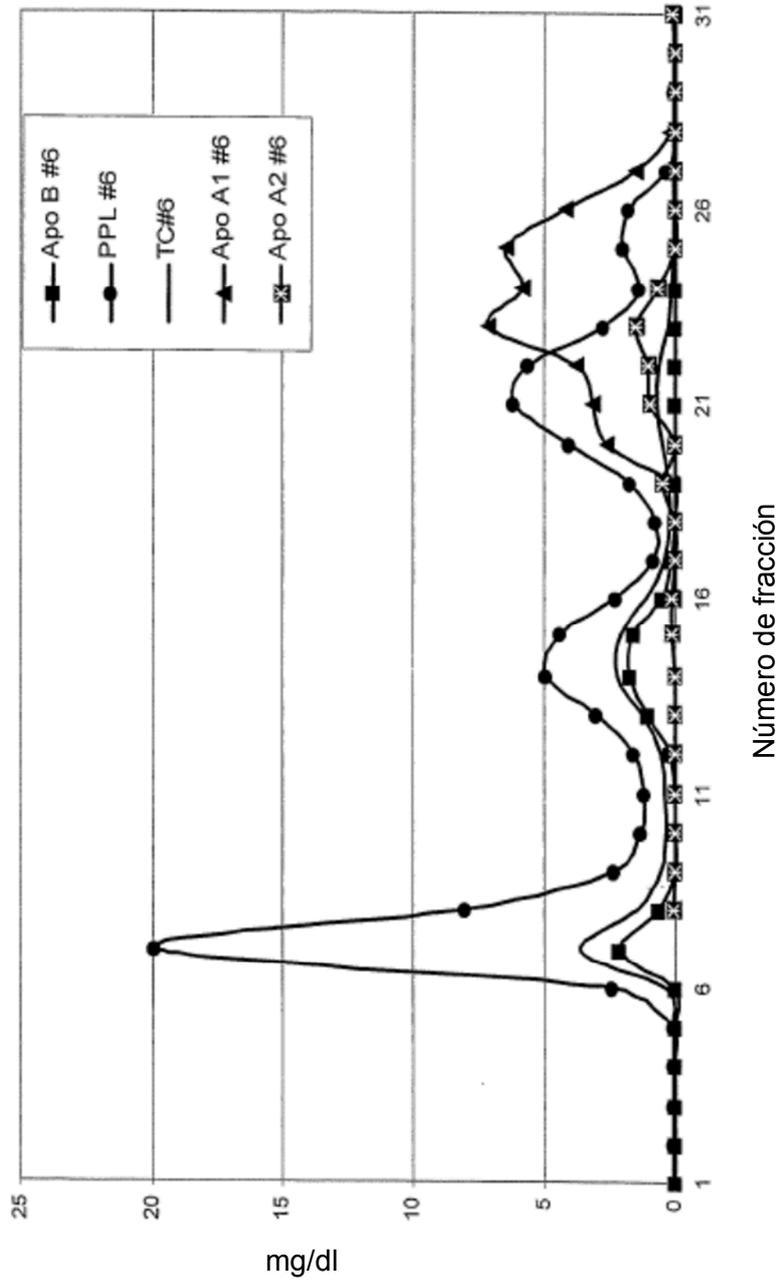


FIGURA 13

Perfil de Superose 6 FPLC de plasma normal tratado con una relación de disolvente de 95:5 sevoflurano a n-butanol

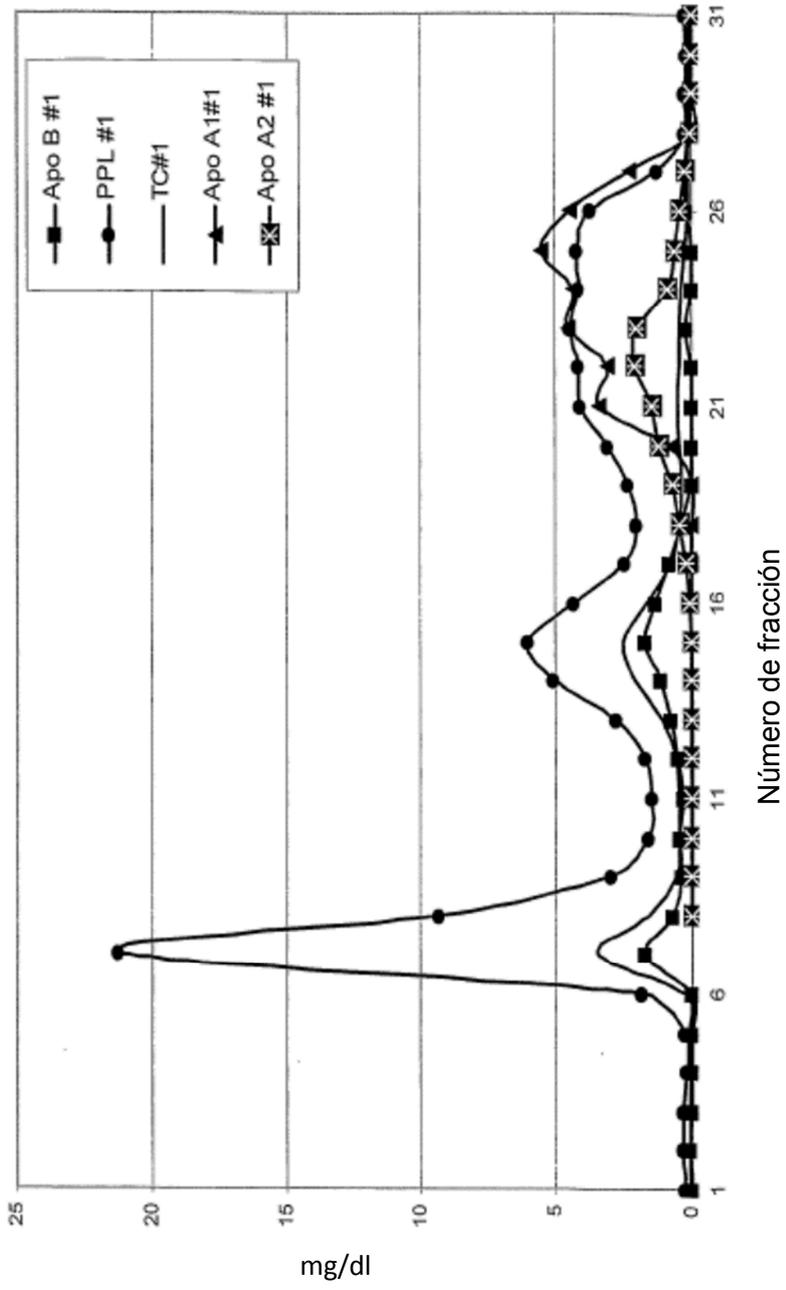


FIGURA 14

Perfil de Superose 6 FPLC de plasma normal tratada con una relación de disolvente de 75:25 DIPE a n-butanol

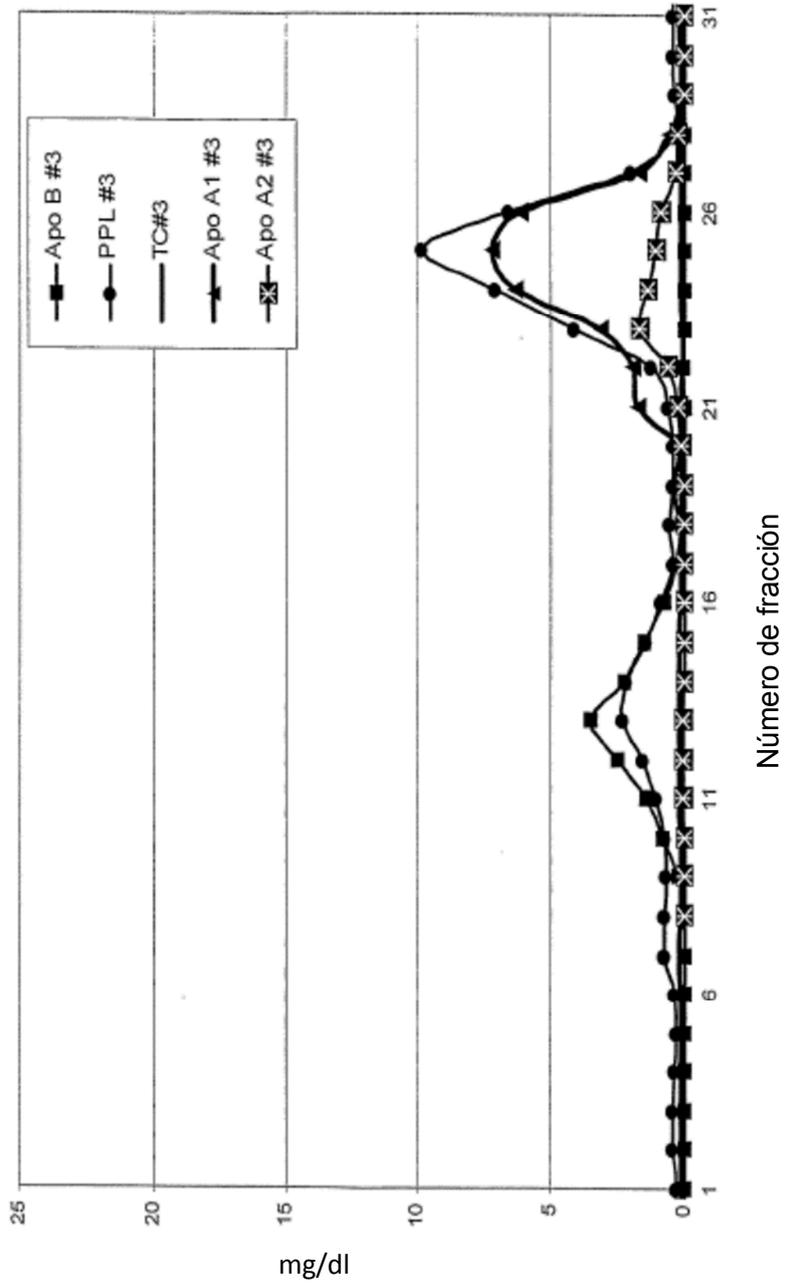


FIGURA 15  
Perfil de Superose 6 FPLC de plasma normal tratado con una relación de disolvente de 95:5 DIPE a n-butanol

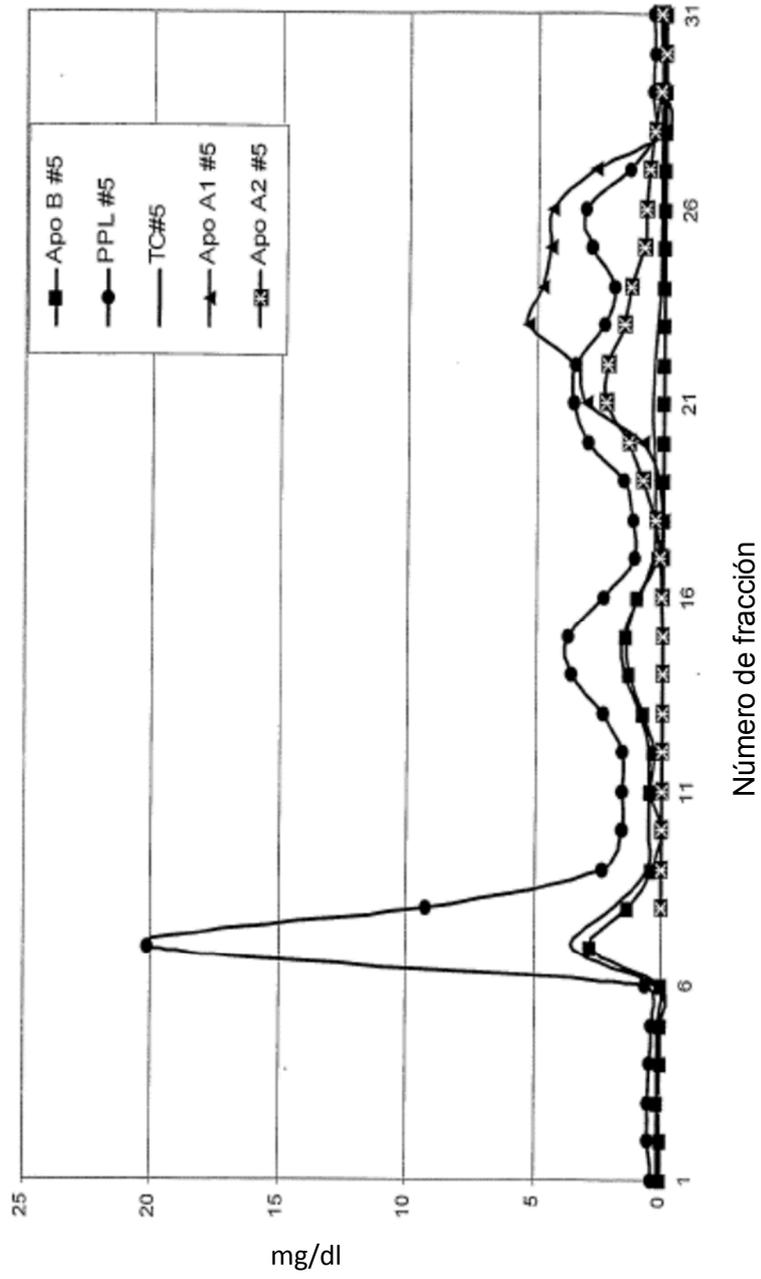
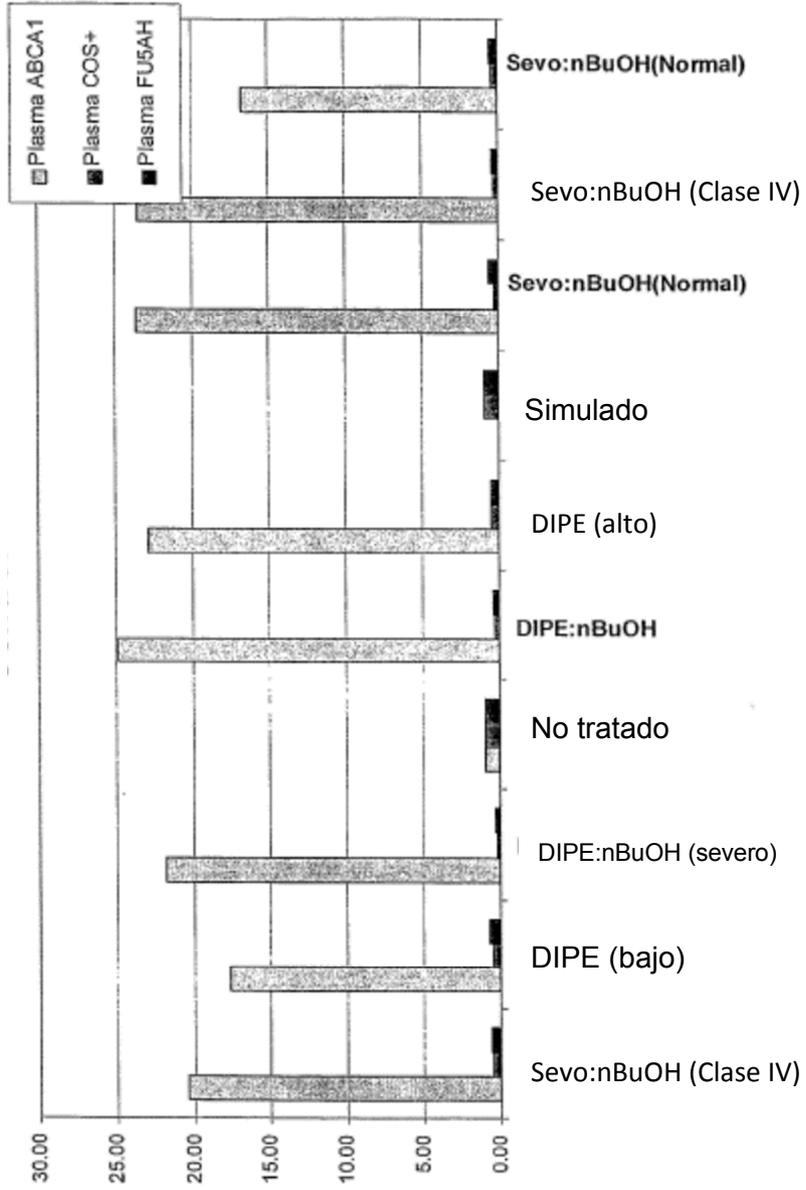


FIGURA 16

Flujo de salida de colesterol del plasma normalizada para control interno



Porcentaje de flujo de muestra/porcentaje de flujo de control

FIGURA 17

Subespecies de HDL que contienen ApoA-I determinadas por 3-16% de PAGE nativo, inmunotransferencia, y análisis de imagen

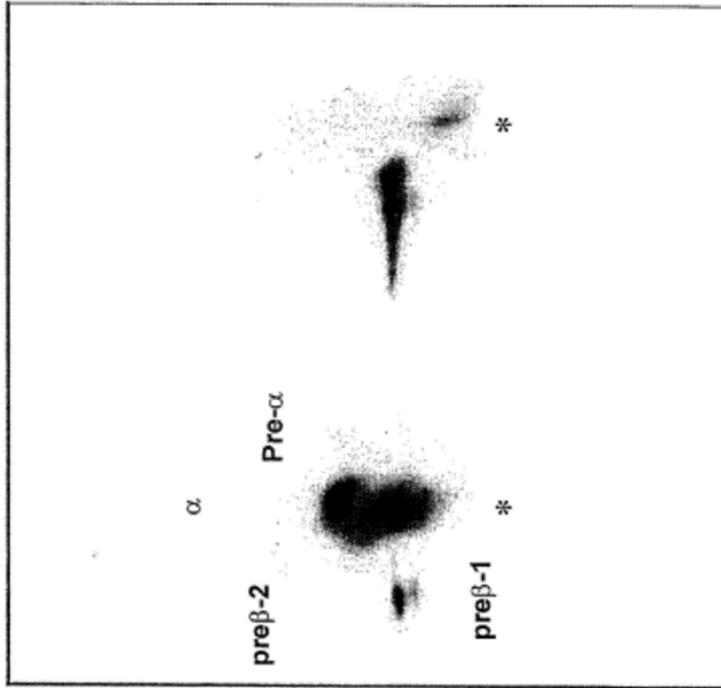


FIGURA 18

Subespecies de HDL que contienen ApoA-I determinadas por 3-16% de PAGE nativo, inmunotransferencia, y análisis de imagen

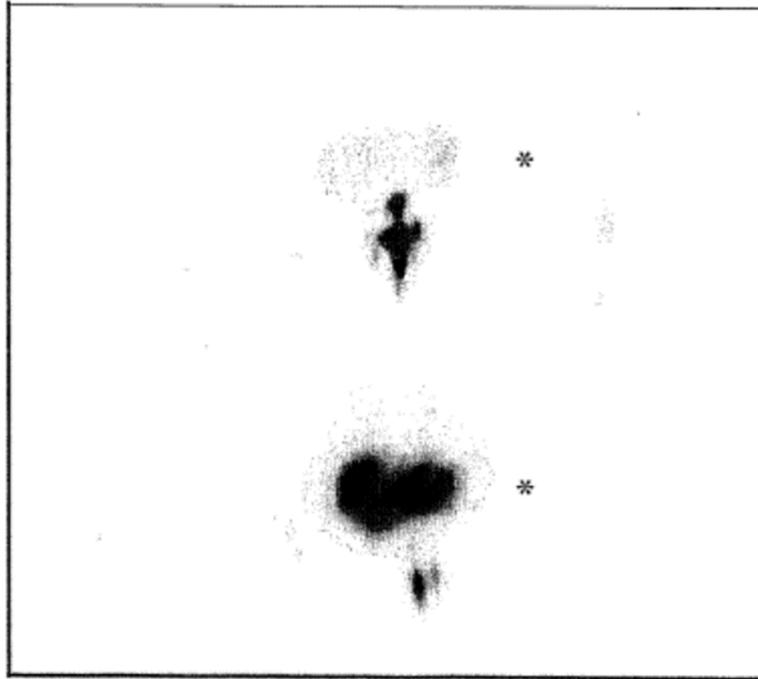
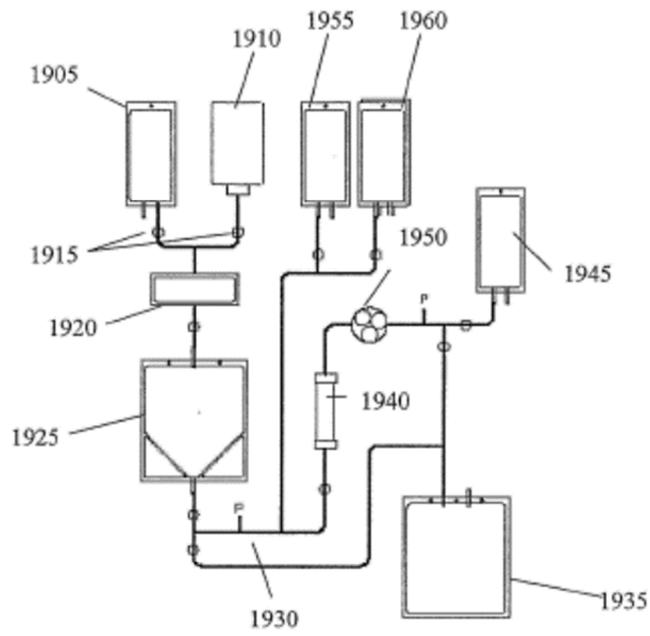


FIGURA 19



1900

FIGURA 20

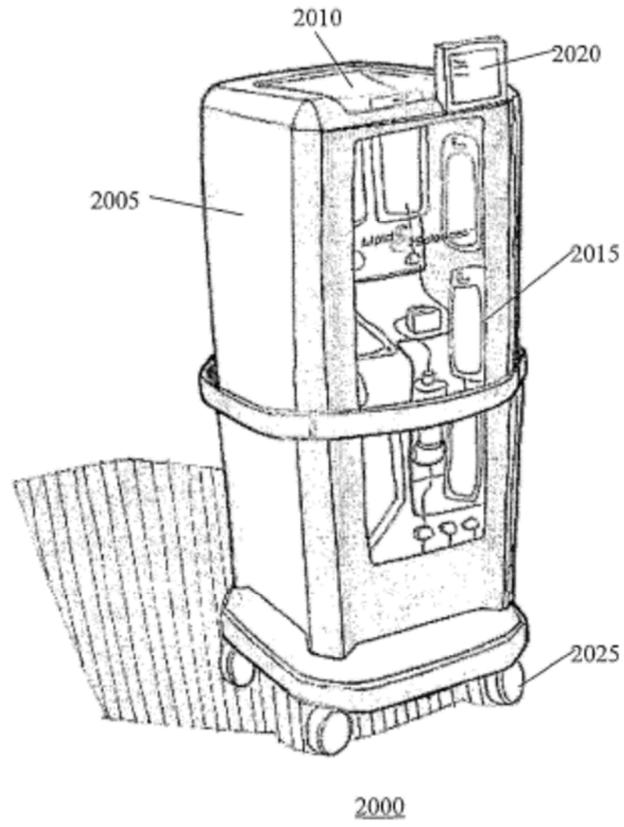


FIGURA 21

