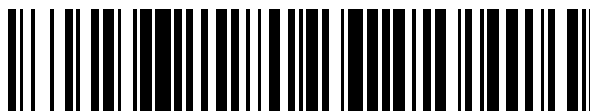


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 455**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/775** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2012** **PCT/US2012/024020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012** **WO12109162**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2012** **E 12703947 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018** **EP 2673296**

54 Título: **Complejos de lipoproteínas y fabricación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**07.02.2011 US 201161440371 P**  
**14.03.2011 US 201161452630 P**  
**17.05.2011 US 201161487263 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.06.2019**

73 Titular/es:

**CERENIS THERAPEUTICS HOLDING SA (100.0%)**  
**33-43 avenue Georges Pompidou, Bâtiment D**  
**31130 Balma, FR**

72 Inventor/es:

**DASSEUX, JEAN-LOUIS;**  
**ONICIU, DANIELA CARMEN y**  
**ACKERMANN, ROSE**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 717 455 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

Complejos de lipoproteínas y fabricación y usos de los mismos

## 1. CAMPO TÉCNICO

La presente descripción proporciona complejos de lipoproteínas, composiciones farmacéuticas que comprenden los complejos, procedimientos para producir y purificar apolipoproteínas para dichos complejos, procedimientos de preparación de los complejos y procedimientos de utilización de los complejos para tratar o prevenir enfermedades cardiovasculares, trastornos y/o afecciones asociadas con los mismos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Visión general

El colesterol circulante es transportado por lipoproteínas del plasma - partículas complejas de composición lipídica y proteica que transportan lípidos en la sangre. Cuatro clases principales de partículas de lipoproteínas circulan en el plasma y están involucradas en el sistema de transporte de grasas: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los quilomicrones constituyen un producto de vida corta de la absorción intestinal de grasas. Las VLDL y, particularmente, las LDL son responsables de la liberación de colesterol desde el hígado (donde se sintetiza o se obtiene de fuentes dietéticas) a los tejidos extrahepáticos, incluyendo las paredes arteriales. Las HDL, por el contrario, median en el transporte inverso de colesterol (RCT), la eliminación de lípidos de colesterol, en particular de los tejidos extrahepáticos al hígado, donde se almacena, cataboliza, elimina o se recicla. Las HDL también juegan un papel beneficioso en la inflamación, el transporte de lípidos oxidados y la interleucina, que pueden a su vez reducir la inflamación en las paredes de los vasos sanguíneos.

Las partículas de lipoproteínas tienen un núcleo hidrófobo compuesto de colesterol (normalmente en forma de un éster de colesterol) y triglicéridos. El núcleo está rodeado por una capa de superficie que comprende fosfolípidos, colesterol no esterificado y apolipoproteínas. Las apolipoproteínas median en el transporte de lípidos y algunos pueden interactuar con las enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos. Al menos diez apolipoproteínas se han identificado, incluyendo: ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V, ApoB, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoE, ApoJ y ApoH. Otras proteínas, tales como la LCAT (lecitina: colesterol aciltransferasa), CETP (proteína de transferencia de éster de colesterol), PLTP (proteína de transferencia de fosfolípidos) y PON (paraoxonasa) también se encuentran asociadas a las lipoproteínas.

Las enfermedades cardiovasculares, tales como enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad de la arteria coronaria y la aterosclerosis están vinculadas abrumadoramente a los niveles elevados de colesterol en suero. Por ejemplo, la aterosclerosis es una enfermedad lentamente progresiva caracterizada por la acumulación de colesterol dentro de la pared arterial. La evidencia persuasiva apoya la teoría de que los lípidos depositados en lesiones ateroscleróticas derivan principalmente de las LDL plasmáticas; por lo tanto, las LDL se han llegado a conocer popularmente como colesterol "malo". En cambio, los niveles séricos de HDL se correlacionan inversamente con la enfermedad cardíaca coronaria. De hecho, los niveles séricos elevados de HDL se consideran como un factor de riesgo negativo. Se plantea la hipótesis de que los altos niveles de HDL en plasma no sólo protegen contra la enfermedad de la arteria coronaria, sino que en realidad puede inducir la regresión de la placa aterosclerótica (véase, por ejemplo, Badimon et al, 1992, *Circulation* 86 (Suppl III): 86-94; Dansky y Fisher, 1999, *Circulation* 100: 1762-1763; Tangirala et al, 1999, *Circulation* 100 (17): 1816-1822; Fan et al, 1999, *Atherosclerosis* 147 (1): 139-45; Deckert et al., 1999, *Circulation* 100 (11): 1230-1235; Boisvert et al, 1999, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19 (3): 525-30; Benoit et al, 1999, *Circulation* 99 (1): 105-10; Holvoet et al, 1998, *J. Clin Invest* 102 (2): 379-85; Duverger et al, 1996, *Circulation* 94 (4): 713-17; Miyazaki et al, 1995, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 (11): 1882-1888; Mezdour et al, 1995, *Atherosclerosis* 113 (2): 237-46; Liu et al, 1994, *J. Lipid Res* 35 (12): 2263-67; Plump et al, 1994, *Proc Nat Acad Sci USA*. 91 (20): 9607-11; Paszty et al, 1994, *J. Clin Invest* 94 (2): 899-903; She et al, 1992, *Chin Med J. (Engl)* 105 (5): 369-73; Rubin et al, 1991, *Nature* 353 (6341): 265-67; She et al., 1990, *Ann. NY Acad. Sci.* 598: 339-51; Ran, 1989, Chung Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih (también traducido como: Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi) 18 (4): 257-61; Quezado et al., 1995, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272 (2): 604-11; Duverger et al., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (12): 1424-1429; Kopfler et al, 1994, *Circulation*; 90 (3): 1319-1327; Miller et al, 1985, *Nature* 314 (6006): 109-11; Ha et al., 1992, *Biochim. Biophys. Acta* 1125 (2): 223-29; Beitz et al., 1992, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 47 (2): 149-52). Como consecuencia, las HDL se han llegado a conocer popularmente como colesterol "bueno", (véase, por ejemplo, Zhang, et al, 2003 *Circulation* 108: 661-663).

El papel "protector" de las HDL se ha confirmado en varios estudios (por ejemplo, Miller et al, 1977, *Lancet* 1 (8019): 965-68; Wayne et al, 1981, *Atherosclerosis* 39: 411-19). En estos estudios, los niveles elevados de LDL parecen estar asociados con un mayor riesgo cardiovascular, mientras que altos niveles de HDL parecen conferir una protección cardiovascular. Estudios in vivo han demostrado además la función protectora de las HDL, que muestra que las infusiones de HDL en conejos pueden obstaculizar el desarrollo de lesiones arteriales inducidas por el colesterol (Badimon et al, 1989, *Lab Invest* 60: 455-61) y/o inducir su regresión (Badimon et al, 1990, *J. Clin Invest.*

85: 1234-1241).

## 2.2. Transporte inverso de colesterol, HDL y apolipoproteína A-I

5 La vía de transporte inverso del colesterol (RCT) funciona para eliminar el colesterol de los tejidos más extrahepáticos y es crucial para mantener la estructura y función de la mayoría de las células en el cuerpo. La RCT consiste principalmente en tres etapas: (a) expulsión de colesterol, es decir, la eliminación inicial del colesterol de diversos grupos de células periféricas; (b) esterificación de colesterol por la acción de la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), impidiendo una reentrada del colesterol expulsado de las células; y (c) la absorción de los HDL-colesterol y ésteres de colesterol a las células del hígado para la hidrólisis, a continuación, el reciclaje, el almacenamiento, la excreción en la bilis o el catabolismo a ácidos biliares.

LCAT, la enzima clave en la RCT, es producida por el hígado y circula en el plasma asociada con la fracción HDL. LCAT convierte el colesterol derivado de células en ésteres de colesterol, que son secuestrados en HDL destinado para la eliminación (ver Jonas 2000, *Biochim Biophys Acta* 1529 (1-3): 245-56). La proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP) y la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) contribuyen a una mayor remodelación de la población de HDL circulante. CETP mueve los ésteres de colesterol fabricados por LCAT a otras lipoproteínas, particularmente lipoproteínas que comprenden ApoB, tales como VLDL y LDL. PLTP suministra lecitina a HDL. Los triglicéridos de HDL son catabolizados por la triglicérido lipasa hepática extracelular y el colesterol de lipoproteínas se elimina por el hígado a través de varios mecanismos.

Las características funcionales de las partículas de HDL se determinan principalmente por sus componentes principales de apolipoproteínas, tales como ApoA-I y ApoA-II. También se han observado cantidades menores de ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoA-IV, ApoE y ApoJ asociadas con HDL. HDL existe en una amplia variedad de diferentes tamaños y de diferentes mezclas de los constituyentes mencionados anteriormente, dependiendo del estado de remodelación durante la cascada o vía metabólica de RCT.

Cada partícula de HDL generalmente comprende al menos 1 molécula, y por lo general de dos a 4 moléculas, de ApoA-I. Las partículas de HDL también pueden comprender solamente ApoE (partículas de gamma-LPE), que se sabe que también son responsables de la expulsión de colesterol, tal como se describe por el Prof. Gerd Assmann (véase, por ejemplo, von Eckardstein et al., 1994, *Curr Opin Lipidol.* 5 (6): 404-16). La ApoA-I es sintetizada por el hígado y el intestino delgado como preproApolipoproteína AI, que es secretada como proapolipoproteína AI (proApoA-I) y rápidamente se escinde para generar la forma en plasma de la ApoA-I, una única cadena polipeptídica de 243 aminoácidos (Brewer et al, 1978, *Biochem Biophys Res Commun* 80: 623-30). La preproApoA-I que se inyecta experimentalmente directamente en el torrente sanguíneo también se escinde en la forma en plasma de la ApoA-I (Klon et al, 2000, *Biophys J.* 79 (3): 1679-1685; Segrest et al, 2000, *Curr Opin Lipidol* 11 (2): 105-15; Segrest et al, 1999, *J. Biol Chem* 274 (45): 31755-58).

La ApoA-I comprende de 6 a 8 diferentes hélices alfa de 22 aminoácidos o repeticiones funcionales espaciadas por un resto enlazador que es frecuentemente prolina. Las unidades de repetición existen en conformación helicoidal anfipática (Segrest et al, 1974, *FEBS Lett.* 38: 247-53) y confieren las principales actividades biológicas de la ApoA-I, es decir, unión a lípidos y activación de lecitina:colesterol acil transferasa (LCAT).

ApoA-I forma tres tipos de complejos estables con lípidos: complejos pequeños, pobres en lípidos, que se refieren como HDL pre-beta-1; partículas discoidales aplanadas que comprenden lípidos polares (fosfolípidos y colesterol) que se refieren como pre-beta-2 HDL; y partículas esféricas, que comprenden lípidos tanto polares como no polares, que se refieren como HDL como esférica o madura (HDL<sub>3</sub> y HDL<sub>2</sub>). La mayoría de las HDL en la población circulante comprende tanto ApoA-I como ApoA-II (la "fracción AI/AII-HDL"). Sin embargo, la fracción de HDL que comprende solamente ApoA-I (la "fracción AI-HDL") parece ser más eficaz en la RCT. Ciertos estudios epidemiológicos apoyan la hipótesis de que la fracción de ApoA-I-HDL es anti-aterogénica (Parra et al, 1992, *Arterioscler Thromb* 12: 701-07; Decossin et al, 1997, *Eur J. Clin Invest.* 27: 299-307).

Las partículas de HDL están producidas de varias poblaciones de partículas que tienen diferentes tamaños, composición de lípidos y composición de apolipoproteína. Pueden separarse de acuerdo con sus propiedades, incluyendo su densidad hidratadas, composición de apolipoproteína y características de carga. Por ejemplo, la fracción pre-beta-HDL se caracteriza por una carga superficial más baja que alfa-HDL madura. Debido a esta diferencia de carga, pre-beta-HDL y alfa-HDL madura tienen diferentes movilidades electroforéticas en gel de agarosa (David et al, 1994, *J. Biol Chem* 269 (12): 8959-8965).

El metabolismo de la pre-beta-HDL y alfa-HDL madura también difiere. Pre-beta-HDL tiene dos destinos metabólicos: la eliminación del plasma y catabolismo por el riñón o remodelación a HDL de tamaño medio que son preferentemente degradados por el hígado (Lee et al, 2004, *J. Lipid Res* 45 (4): 716-728).

Aunque el mecanismo para la transferencia de colesterol desde la superficie celular (es decir, salida de colesterol) es desconocido, se cree que el complejo pobre en lípidos, pre-beta-1 HDL, es el aceptor preferido para el colesterol transferido desde el tejido periférico involucrado en RCT (ver Davidson et al, 1994, *J. Biol Chem* 269: 22975-82;

Bielicki et al, 1992, J. Lipid Res. 33: 1699-1709; Rothblat et al, 1992, J. Lipid Res. 33: 1091-1097; y Kawano et al, 1993, Biochemistry 32: 5025-28; Kawano et al, 1997, Biochemistry 36: 9816-25). Durante este proceso de reclutamiento de colesterol desde la superficie celular, pre-beta-1 HDL se convierte rápidamente en pre-beta-2 HDL. PLTP puede aumentar la velocidad de formación del disco de pre-beta-2 HDL, pero se carecen de datos que indiquen un papel para PLTP en el RCT. LCAT reacciona preferentemente con HDL discoidales, pequeñas (pre-beta) y esféricas (es decir, madura), transfiriendo el grupo 2-acilo de la lecitina u otros fosfolípidos al residuo hidroxilo libre del colesterol para generar ésteres de colesterilo (retenido en la HDL) y lisolecitina. La reacción de la LCAT requiere ApoA-I como activador; es decir, ApoA-I es el cofactor natural para la LCAT. La conversión de colesterol secuestrado en la HDL en su éster impide la reentrada del colesterol en la célula, siendo el resultado neto de que el colesterol se elimina de la célula.

Los ésteres de colesterilo en las partículas de HDL maduras en la fracción ApoAI-HDL (es decir, que comprende apoAI y no ApoA-II) se eliminan por el hígado y son procesados en la bilis más eficazmente que los derivados de HDL que comprenden tanto ApoAI como ApoA-II (la fracción de AI/AII-HDL). Esto puede ser debido, en parte, a la unión más eficaz de ApoAI-HDL a la membrana de hepatocitos. Se ha planteado la hipótesis de la existencia de un receptor de HDL y se ha identificado un receptor atrapador ("scavenger"), clase B, tipo I (SR-BI) como un receptor de HDL (Acton et al, 1996, Science 271: 518-20; Xu et al., 1997, Lipid Res. 38: 1289-1298). SR-BI se expresa de forma más abundante en los tejidos esteroideogénicos (por ejemplo, las glándulas suprarrenales) y en el hígado (Landschulz et al, 1996, J. Clin Invest 98: 984-95; Rigotti et al, 1996, J. Biol. Chem. 271: 33545-49). Para una revisión de los receptores de HDL, véase Broutin et al., 1988, Anal. Biol. Chem. 46: 16-23.

La lipidación inicial por transprotador de casete de unión a ATP AI parece ser crítica para la formación de HDL en plasma y para la capacidad de las partículas pre-beta-HDL para efectuar expulsión de colesterol (Lee y Parks, 2005, Curr Opin Lipidol 16 (1): 19-25). Según estos autores, esta lipidación inicial permite a pre-beta-HDL funcionar más eficientemente como un aceptor de colesterol y previene la ApoA-I de asociarse rápidamente con las partículas de HDL en plasma preexistentes, lo que resulta en una mayor disponibilidad de las partículas pre-beta-HDL para la salida de colesterol.

CETP también puede desempeñar un papel en RCT. Los cambios en la actividad de CETP o sus aceptores, VLDL y LDL, juegan un papel en la "remodelación" de la población de la HDL. Por ejemplo, en ausencia de CETP, las HDL se convierten en partículas agrandadas que no se depuran. (Para revisiones de RCT y las HDLs, ver Fielding y Fielding, 1995, J. Lipid Res 36: 211-28; Barrans et al, 1996, Biochem Biophys Acta 1300: 73-85; Hirano et al, 1997, Arterioscler Thromb Vasc Biol 17 (6): 1053-1059).

HDL también juega un papel en el transporte inverso de otros lípidos y moléculas apolares, y en la desintoxicación, es decir, el transporte de lípidos desde células, órganos y tejidos al hígado para el catabolismo y la excreción. Tales lípidos incluyen esfingomielina (SM), lípidos oxidados y lisofosfatidilcolina. Por ejemplo, Robins y Fasulo (1997, J. Clin Invest 99: 380-84) han demostrado que las HDL estimulan el transporte de esteroles vegetales por el hígado en las secreciones biliares.

El componente principal de HDL, ApoA-I, puede asociarse con SM in vitro. Cuando ApoA-I se reconstituye in vitro con SM de cerebro bovino (BBSM), se produce una tasa máxima de reconstitución a 28°C, la temperatura se aproxima a la temperatura de transición de fase para BBSM (Swaney, 1983, J. Biol. Chem. 258 (2), 1254-1259). En proporciones BBSM:ApoA-I de 7,5:1 o menos (peso/peso), se forma una única partícula de HDL homogénea reconstituida que comprende tres moléculas de ApoA-I por partícula y que tiene una relación molar BBSM:ApoA-I de 360:1. Aparece en el microscopio electrónico como un complejo similar al obtenido por recombinación de ApoA-I con fosfatidilcolina a relaciones elevadas de fosfolípido/proteína discoidal. A relaciones BBSM:ApoA-I de 15:1 (peso/peso), sin embargo, se forman complejos discoidales de mayor diámetro que tienen una relación molar fosfolípido:proteína superior (535:1). Estos complejos son significativamente más grandes, más estables y más resistentes a la desnaturalización que los complejos de ApoA-I formados con fosfatidilcolina.

La esfingomielina (SM) es elevada en los aceptores de colesterol tempranos (pre-beta-HDL y lipoproteína que comprende ApoE de migración gamma), lo que sugiere que SM podría mejorar la capacidad de estas partículas para promover la expulsión de colesterol (Dass y Jessup, 2000, J. Pharm. Pharmacol. 52: 731-61; Huang et al, 1994, Proc Natl Acad Sci USA. 91: 1834-1838; Fielding y Fielding 1995, J. Lipid Res. 36: 211-28)..

### 2.3. Mecanismo de protección de HDL y ApoA-I

Los estudios sobre el mecanismo o mecanismos de protección de HDL se han centrado en la apolipoproteína AI (ApoA-I), el principal componente de HDL. Los altos niveles plasmáticos de ApoA-I están asociados con la ausencia o reducción de las lesiones coronarias (Maciejko et al, 1983, N. Engl J. Med 309: 385-89; Sedlis et al, 1986, Circulation 73: 978- 84).

La infusión de ApoA-I o de HDL en animales de experimentación ejerce cambios bioquímicos significativos, así como reduce la extensión y la gravedad de las lesiones ateroscleróticas. Después de un informe inicial por Maciejko y Mao (1982, Arteriosclerosis 2: 407a), Badimon et al, (1989, Lab Invest. 60: 455-61; 1989, J. Clin Invest 85: 1234-1241)

encontraron que podían reducir significativamente la extensión de las lesiones ateroscleróticas (reducción de 45%) y su contenido en éster de colesterol (reducción de 58,5%) en conejos alimentados con colesterol, mediante la infusión de HDL (d = 1,063-1,325 g/ml). También encontraron que las infusiones de HDL conducían a cerca de una regresión del 50% de las lesiones establecidas. Esper et al. (1987, *Arteriosclerosis* 7: 523a) han demostrado que las infusiones de HDL pueden cambiar marcadamente la composición de lipoproteínas en plasma de conejos Watanabe con hipercolesterolemia heredada, que desarrollan lesiones arteriales tempranas. En estos conejos, las infusiones de HDL pueden más que duplicar la relación entre la HDL protectora y la LDL aterogénica.

El potencial de las HDL para prevenir la enfermedad arterial en modelos animales ha sido apoyada por la observación de que ApoA-I puede ejercer una actividad fibrinolítica in vitro (Saku y otros, 1985, *Thromb Res* 39: 1-8). Ronneberger (1987, X Int. Congr. Pharmacol., Sydney, 990) demostró que la ApoA-I puede aumentar la fibrinólisis en perros Beagle y en monos cinomolgos. Una actividad similar se puede observar in vitro en plasma humano. Ronneberger fue capaz de confirmar una reducción de la deposición de lípidos y la formación de placa arterial en animales tratados con ApoA-I.

Los estudios in vitro indican que los complejos de ApoA-I y lecitina pueden promover la salida de colesterol libre desde células de músculo liso arterial cultivadas (Stein et al, 1975, *Biochem Biophys Acta*, 380: 106-18). Por este mecanismo, las HDL también puede reducir la proliferación de estas células (Yoshida et al, 1984, *Exp Mol Pathol* 41: 258-66).

La terapia de infusión con HDL que comprende ApoA-I o péptidos miméticos de ApoA-I también se ha demostrado que regula los niveles de HDL en plasma por el transportador de ABC1, lo que conduce a una eficacia en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular (véase, por ejemplo, Brewer et al., 2004, *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 24: 1755-1760).

Dos polimorfismo humano de la ApoA-I de origen natural humano se han aislado en el que un residuo de arginina se sustituye con cisteína. En Apolipoproteína AI<sub>Milano</sub> (ApoA-I<sub>M</sub>), esta sustitución se produce en el residuo 173, mientras que en la Apolipoproteína AI<sub>Paris</sub> (ApoA-I<sub>P</sub>), esta sustitución se produce en el residuo 151 (Franceschini et al., 1980, *J. Clin. Invest.* 66 : 892-900; Weisgraber et al, 1983, *J. Biol Chem* 258: 2508-13; Bruckert et al, 1997, *arteriosclerosis* 128: 121-28; Daum et al, 1999, *J. Mol Med.* 77: 614-22; Klon et al, 2000, *Biophys J.* 79 (3): 1679-85). Sin embargo, se ha aislado un polimorfismo humano natural adicional de ApoA-I, en el que una leucina está sustituida con una arginina en la posición 144. Este polimorfismo se ha denominado apolipoproteína AI<sub>Zaragoza</sub> (ApoA-I<sub>Z</sub>) y se asocia con hipoalfalipoproteinemia severa y un efecto mejorado del transporte inverso del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Recalde et al, 2001, *arteriosclerosis* 154 (3): 613-623; Fiddymment et al, 2011, *Protein Expr Purif* 80 (1): 110-116).

Las partículas de HDL reconstituidas que comprenden homodímeros enlazados por disulfuro de cualquiera de ApoA-I<sub>M</sub> o ApoA-I<sub>P</sub> son similares a las partículas de HDL reconstituidas que comprenden ApoA-I de tipo salvaje en su capacidad para depurar emulsiones de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y su capacidad para promover el eflujo de colesterol (Calabresi et al, 1997b, *Biochemistry* 36: 12428-33; Franceschini et al, 1999, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1257-1262; Daum et al, 1999, *J. Mol Med* 77: 614-22). En ambas mutaciones, los individuos heterocigotos han disminuido los niveles de HDL pero, paradójicamente, se encuentran en un riesgo reducido de aterosclerosis (Franceschini et al, 1980, *J. Clin Invest* 66: 892-900; Weisgraber et al, 1983, *J. Biol. Chem.* 258: 2508-13; Bruckert et al, 1997, *arteriosclerosis* 128: 121-28). Las partículas de HDL reconstituidas que comprenden una variante son capaces de activación de la LCAT, aunque con una disminución de la eficiencia en comparación con las partículas de HDL reconstituidas que comprenden ApoA-I de tipo salvaje (Calabresi et al, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 232: 345-49 ; Daum et al, 1999, *J. Mol Med.* 77: 614-22).

La mutación ApoA-I<sub>M</sub> se transmite como un rasgo autosómico dominante; se han identificado ocho generaciones de portadores dentro de una familia (Gualandri et al, 1984, *Am J. Hum Genet* 37: 1083-97). El estado de un individuo portador de ApoA-I<sub>M</sub> se caracteriza por una notable reducción en el nivel de HDL-colesterol. A pesar de esto, los individuos portadores aparentemente no mostraron ningún aumento del riesgo de enfermedad arterial. De hecho, mediante el examen de registros genealógicos, parece que estos sujetos pueden estar "protegidos" de la aterosclerosis (Sirtori et al, 2001, *Circulation*, 103: 1949-1954; Roma et al, 1993, *J. Clin Invest* 91 (4): 1445-520).

El mecanismo del posible efecto protector de la ApoA-I<sub>M</sub> en los portadores de la mutación parece estar ligada a una modificación de la estructura del mutante ApoA-I<sub>M</sub>, con pérdida de una hélice alfa y una exposición aumentada de residuos hidrófobos (Franceschini et al, 1985, *J. Biol Chem* 260: 1632-1635). La pérdida de la estructura apretada de las múltiples hélices alfa conduce a una mayor flexibilidad de la molécula, que se asocia más fácilmente con los lípidos, en comparación a la ApoA-I normal. Por otra parte, los complejos de lipoproteínas son más susceptibles a la desnaturalización, lo que sugiere que la liberación de los lípidos también se mejora en el caso del mutante.

Bielicki, et al. (1997, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (9): 1637 a 1643) ha demostrado que ApoA-I<sub>M</sub> tiene una capacidad limitada para reclutar colesterol de la membrana en comparación con ApoA-I de tipo salvaje. Además, la HDL recién formada por la asociación de ApoA-I<sub>M</sub> con los lípidos de membrana eran predominantemente partículas de 7,4 nm en lugar de complejos más grandes de 9 y 11 nm formados por ApoA-I de tipo salvaje. Estas

observaciones indican que la sustitución Arg<sub>173</sub> → Cys<sub>173</sub> en la secuencia primaria de ApoA-I interfería con el proceso normal de reclutamiento de colesterol celular y la formación de HDL nascente. La mutación está aparentemente asociada con una disminución de la eficiencia para la eliminación de colesterol de las células. Por lo tanto, sus propiedades antiaterogénicas pueden no estar relacionadas con RCT.

El cambio estructural más llamativo atribuido a la sustitución Arg<sub>173</sub> → Cys<sub>173</sub> es la dimerización de ApoA-I<sub>M</sub> (Bielski et al, 1997, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (9): 1637-1643). ApoA-I<sub>M</sub> puede formar homodímeros con sí mismo y heterodímeros con ApoA-II. Los estudios de fracciones de la sangre que comprenden una mezcla de apolipoproteínas indican que la presencia de dímeros y complejos en la circulación puede ser responsable de un aumento de la vida media de eliminación de apolipoproteínas. Tal aumento de la vida media de eliminación se ha observado en estudios clínicos de portadores de la mutación (Gregg et al, 1988, NATO ARW on Human Apolipoprotein Mutants: From Gene Structure to Phenotypic Expression, Limone SG). Otros estudios indican que los dímeros de ApoA-I<sub>M</sub> (ApoA-I<sub>M</sub>/ApoA-I<sub>M</sub>) actúan como un factor inhibidor en la interconversión de las partículas de HDL in vitro (Franceschini et al, 1990, *J. Biol Chem.* 265: 12 224 -31).

## 2.4. Tratamientos actuales para la dislipidemia y trastornos relacionados

Los trastornos dislipidémicos son enfermedades asociadas con niveles de colesterol y de triglicéridos elevados en suero y proporciones disminuidas de HDL:LDL en suero, e incluyen hiperlipidemia, especialmente hipercolesterolemia, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad arterial coronaria, enfermedades vasculares y perivasculares, y enfermedades cardiovasculares, tales como aterosclerosis. Los síndromes asociados con la aterosclerosis, tales como ataque isquémico transitorio o claudicación intermitente, causada por insuficiencia arterial, también están incluidos. Un número de tratamientos están disponibles actualmente para bajar el colesterol y los triglicéridos elevados en suero asociados con trastornos dislipidémicos. Sin embargo, cada uno tiene sus propios inconvenientes y limitaciones en términos de eficacia, efectos secundarios y la calificación de población de pacientes.

Las resinas de unión a ácidos biliares son una clase de fármacos que interrumpen el reciclaje de ácidos biliares desde el intestino al hígado; por ejemplo, colestiramina (Questran Light®, Bristol-Myers Squibb), clorhidrato de colestipol (Colestid®, The Upjohn Company), y clorhidrato de colesevelam (Welchol®, Daiichi-Sankyo Company). Cuando se toma oralmente, estas resinas cargadas positivamente se unen a los ácidos biliares cargados negativamente en el intestino. Debido a que las resinas no pueden ser absorbidas por el intestino, se excretan portando los ácidos biliares con ellas. El uso de tales resinas, como mucho, sin embargo, sólo disminuye los niveles de colesterol sérico en aproximadamente un 20%, y se asocia con efectos secundarios gastrointestinales, incluyendo estreñimiento y ciertas deficiencias de vitaminas. Además, puesto que las resinas se unen a otros fármacos, otras medicaciones orales deben tomarse al menos una hora antes o de cuatro a seis horas posterior a la ingestión de la resina; complicando de este modo los regímenes de medicamentos de los pacientes del corazón.

Las estatinas son agentes reductores del colesterol que bloquean la síntesis de colesterol mediante la inhibición de la HMG-CoA reductasa, la enzima clave implicada en la ruta biosintética del colesterol. Las estatinas, por ejemplo, lovastatina (Mevacor®), simvastatina (Zocor®), pravastatina (Pravachol®), fluvastatina (Lescor®) y atorvastatina (Lipitor®), se utilizan a veces en combinación con resinas de unión a ácidos biliares. Las estatinas reducen significativamente el colesterol sérico y los niveles de LDL en suero, y la progresión lenta de la aterosclerosis coronaria. Sin embargo, los niveles de colesterol HDL en suero se incrementan sólo moderadamente. El mecanismo del efecto la reducción de LDL puede implicar tanto la reducción de la concentración de VLDL como la inducción de la expresión celular del receptor de LDL, lo que conduce a la producción reducida y/o un aumento del catabolismo de las LDL. Los efectos secundarios, incluyendo disfunción hepática y renal, están asociados con el uso de estos fármacos (The Physicians Desk Reference, 56a Ed., 2002, Medical Economics).

La niacina (ácido nicotínico) es un complejo de vitamina B soluble en agua que se usa como un suplemento dietético y agente antihiperlipidémico. La niacina disminuye la producción de VLDL y es eficaz en la reducción de LDL. En algunos casos, se utiliza en combinación con resinas de unión a ácidos biliares. La niacina puede aumentar las HDL cuando se usa a dosis adecuadas, sin embargo, su utilidad está limitada por efectos secundarios graves cuando se usa a dosis tan altas. Niaspan® es una forma de niacina de liberación prolongada que produce menos efectos secundarios que la niacina pura. La niacina/Lovastatina (Nicostatin®) es una formulación que contiene tanto la niacina como la lovastatina y combina los beneficios de cada fármaco.

Los fibratos son una clase de fármacos hipolipemiantes usados para tratar diversas formas de hiperlipidemia (es decir, triglicéridos séricos elevados) que también pueden estar asociados con hipercolesterolemia. Los fibratos parecen reducir la fracción de VLDL y modestamente aumentan las HDL, sin embargo el efecto de estos fármacos sobre el colesterol sérico es variable. En los Estados Unidos, los fibratos tales como clofibrato (Atromid-S®), fenofibrato (Tricor®) y bezafibrato (Bezalip®) han sido aprobados para su uso como fármacos antilipémicos, pero no han recibido la aprobación como agentes contra la hipercolesterolemia. Por ejemplo, el clofibrato es un agente antilipidémico que actúa (a través de un mecanismo desconocido) para disminuir los triglicéridos séricos mediante la reducción de la fracción de VLDL. Aunque el colesterol sérico puede reducirse en ciertas subpoblaciones de pacientes, la respuesta bioquímica al fármaco es variable, y no siempre es posible predecir qué pacientes obtendrán

resultados favorables. Atromid-S® no ha demostrado ser eficaz para la prevención de la enfermedad coronaria. El fármaco relacionado relacionada química y farmacológicamente, gemfibrozil (Lopid®) es un agente regulador de lípidos que disminuye moderadamente los triglicéridos séricos y el colesterol VLDL, y aumenta moderadamente el colesterol HDL – las subfracciones HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>, así como tanto la ApoA-I como A-II (es decir, la fracción AI/AMT-HDL). Sin embargo, la respuesta lipídica es heterogénea, especialmente entre las diferentes poblaciones de pacientes. Por otra parte, mientras que se observó prevención de la enfermedad coronaria en pacientes varones entre 40-55 sin historial o síntomas de enfermedad coronaria existente, no está claro hasta qué punto estos resultados pueden extrapolarse a otras poblaciones de pacientes (por ejemplo, mujeres, mayores y hombres más jóvenes). De hecho, no se observó eficacia en pacientes con enfermedad coronaria establecida. Efectos secundarios graves están asociados con el uso de fibratos, incluyendo toxicidad, tal como tumores malignos (cáncer especialmente gastrointestinal), enfermedad de la vesícula biliar y un aumento de la incidencia en la mortalidad no coronaria.

La terapia de reemplazo de estrógeno oral puede ser considerada para la hipercolesterolemia moderada en mujeres post-menopáusicas. Sin embargo, los aumentos en HDL pueden estar acompañados con un incremento en los triglicéridos. El tratamiento con estrógeno está, por supuesto, limitado a una población específica de pacientes (mujeres post-menopáusicas) y se asocia con efectos secundarios graves incluyendo la inducción de neoplasmas malignos, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad tromboembólica, adenoma hepático, presión sanguínea elevada, intolerancia a la glucosa, e hipercalcemia.

Otros agentes útiles para el tratamiento de la hiperlipidemia incluyen ezetimibe (Zetia®; Merck), que bloquea o inhibe la absorción de colesterol. Sin embargo, los inhibidores de ezetimibe se han mostrado que muestran ciertas toxicidades.

Las HDL, así como formas recombinantes de ApoA-I complejadas con fosfolípidos, pueden servir como atrapadores/eliminadores de moléculas apolares o anfipáticas, por ejemplo, colesterol y derivados (oxiesteroles, esteroides oxidados, esteroides vegetales, etc.), ésteres de colesterol, fosfolípidos y derivados (fosfolípidos oxidados), triglicéridos, productos de oxidación, y lipopolisacáridos (LPS) (véase, por ejemplo, Casas et al, 1995, J. Surg Res noviembre 59 (5): 544-52). Las HDL también pueden servir como un atrapador para el TNF-alfa y otras linfocinas. Las HDL también pueden servir como un portador para paraoxonasas en suero humano, por ejemplo, PON-1, -2, -3. La paraoxonasa, una esterasa asociada con HDL, es importante para la protección de componentes celulares frente a la oxidación. La oxidación de LDL, que se produce durante el estrés oxidativo, aparece directamente ligada al desarrollo de la aterosclerosis (Aviram, 2000, Free Radic Res 33 Suppl: S85-97). La paraoxonasa parece jugar un papel en la susceptibilidad a la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular (Aviram, 1999, Mol Med Today 5 (9): 381-86). La paraoxonasa sérica humana (PON-1) se une a lipoproteínas de alta densidad (HDLs). Su actividad está inversamente relacionada con la aterosclerosis. PON-1 hidroliza organofosfatos y puede proteger contra la aterosclerosis mediante la inhibición de la oxidación de HDL y lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Aviram, 1999, Mol Med Today 5 (9): 381-86). Los estudios experimentales sugieren que esta protección está asociada con la capacidad de PON-1 para hidrolizar los peróxidos lipídicos específicos en lipoproteínas oxidadas. Las intervenciones que conservan o mejoran la actividad de PON-1 pueden ayudar a retrasar la aparición de la aterosclerosis y la enfermedad cardíaca coronaria.

HDL tiene además una función como un agente antitrombótico y reductor de fibrinógeno y como un agente en el choque hemorrágico (Cockerill et al., WO 01/13939, publicada el 1 de marzo de 2001). Se ha observado que HDL, y ApoA-I, en particular, facilita el intercambio de lipopolisacárido producido por sepsis por partículas de lípidos que comprenden ApoA-I, lo que resulta en la neutralización funcional del lipopolisacárido (Wright et al., WO9534289, publicado el 21 de diciembre de 1.995; Wright et al, Patente de Estados Unidos No. 5.928.624 concedida el 27 de julio de 1999; Wright et al, patente de EE.UU. nº 5.932.536, concedida el 3 de agosto, 1999).

Hay una variedad de procedimientos disponibles para la fabricación de complejos de lipoproteínas in vitro. Las patentes de Estados Unidos Nos. 6.287.590 y 6.455.088 describen un procedimiento que implica la coliofilización de soluciones de apolipoproteínas y lípidos en disolvente orgánico (o mezclas de disolventes) y la formación de complejos de lipoproteínas cargadas durante la hidratación del polvo liofilizado. Los complejos de lipoproteínas también se pueden formar mediante un procedimiento de diálisis en detergente; por ejemplo, una mezcla de un lípido, una lipoproteína y un detergente, tal como colato, se dializa y se reconstituye para formar un complejo (véase, por ejemplo, Jonas et al, 1986, Methods Enzymol 128: 553-82). El ejemplo 1 de la Publicación de Estados Unidos 2004/0067873 da a conocer un procedimiento de dispersión en colato, en el que una dispersión de lípidos se combina con colato en condiciones para formar micelas, y éstas a su vez se incuban con una solución de apolipoproteína para formar complejos. En última instancia, el colato, que es tóxico, tiene que ser eliminado, por ejemplo, por diálisis, ultrafiltración o absorción adsorción sobre una perla o resina de afinidad. La patente de Estados Unidos nº 6.306.433 da a conocer la formación de complejos de lipoproteínas sometiendo una mezcla fluida de una proteína y lípido a homogeneización a alta presión. Sin embargo, las proteínas que son sensibles a las altas fuerzas de cizallamiento pueden perder actividad cuando se exponen a alta presión de homogeneización.

De este modo, los procedimientos de fabricación disponibles en la actualidad dan lugar a un desperdicio de materiales de partida, tales como la degradación de proteínas, y/o requieren la purificación del producto resultante,

tal como la eliminación de un agente tóxico, y por lo tanto son ineficaces y costosos. Además, las preparaciones de complejos de lipoproteínas pueden ser heterogéneas, conteniendo una mezcla de complejos que varían en tamaño y en la composición. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.876.968. Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar nuevos procedimientos para la producción de complejos de lipoproteínas que sean

eficientes con un rendimiento de los complejos más homogéneo, preferiblemente con un alto grado de pureza. Dichos procesos podrían permitir la producción más económica a gran escala, a la vez que la generación de un producto aceptable farmacéuticamente más uniforme con menos riesgos de efectos secundarios debido a contaminantes.

Además, el uso terapéutico de ApoA-I, ApoA-I<sub>M</sub>, ApoA-I<sub>p</sub> y otras variantes, así como HDL reconstituida, es limitado en la actualidad, sin embargo, por la gran cantidad de apolipoproteína requerida para la administración terapéutica y por el coste de la producción de proteínas, teniendo en cuenta el rendimiento global bajo de la producción y la aparición de la degradación de proteínas en cultivos de proteínas expresadas de forma recombinante. (Véase, por ejemplo, Mallory et al, 1987, J. Biol Chem 262 (9): 4241-4247; Schmidt et al, 1997, Protein Expression & Purification 10: 226-236). Se ha sugerido por los primeros ensayos clínicos que el intervalo de dosis es entre 1,5-4 g de proteína por infusión para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. El número de infusiones necesarias para un tratamiento completo es desconocido. (Véase, por ejemplo, Eriksson et al, 1999, Circulation 100 (6): 594-98; Carlson, 1995, Nutr Metab Cardiovasc Dis 5: 85-91; Nanjee et al, 2000, Arterioscler Thromb Vasc Biol 20 (9): 2148-55; Nanjee et al, 1999, Arterioscler Thromb Vasc Biol 19 (4): 979-89; Nanjee et al, 1996, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 16 (9): 1203-1214).

La ApoA-I recombinante humana se ha expresado en huéspedes heterólogos, sin embargo, el rendimiento de proteína madura ha sido insuficiente para aplicaciones terapéuticas a gran escala, especialmente cuando se acopla a procedimientos de purificación que reducen aún más los rendimientos y dan lugar a un producto impuro.

Weinberg et al, 1988, J. Lipid Research 29: 819-824, describe la separación de las apolipoproteínas AI, A-II y A-IV y sus isoformas purificadas a partir de plasma humano por cromatografía líquida de alta presión de fase inversa.

WO 2009/025754 describe la separación y purificación de proteínas de la alfa-1-antitripsina y ApoA-I a partir de plasma humano.

Hunter et al., 2009, Biotechnol. Prog. 25 (2): 446-453, describe la purificación a gran escala de la variante de ApoA-I Milano que se expresa de forma recombinante en *E. coli*.

Caparon et al., 2009, Biotechnol. And Bioeng. 105 (2): 239-249 describe la expresión y la purificación de ApoA-I Milano a partir de un huésped de *E. coli* que se modifica mediante ingeniería genética para eliminar dos proteínas de la célula huésped con el fin de reducir los niveles de estas proteínas en el producto de apolipoproteína purificada.

La patente de Estados Unidos No. 6.090.921 describe la purificación de ApoA-I o de la apolipoproteína E (ApoE) a partir de una fracción de plasma humano que contiene ApoA-I y ApoE, usando la cromatografía de intercambio aniónico.

Brewer et al., 1986, Meth. Enzymol. 128: 223-246 describe el aislamiento y caracterización de apolipoproteínas a partir de sangre humana usando técnicas cromatográficas.

Weisweiler et al, 1987, Clinica Chimica Acta 169: 249-254 describe el aislamiento de ApoA-I y ApoA-II de HDL humana utilizando cromatografía líquida de proteína rápida.

deSilva et al., 1990, J. Biol. Chem. 265 (24): 14292-14297 describe la purificación de apolipoproteína J por cromatografía de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa.

Las lipoproteínas y complejos de lipoproteínas se están desarrollando actualmente para uso clínico, con estudios clínicos que utilizan diferentes agentes basados en lipoproteínas que establecen la viabilidad de la terapia con lipoproteínas (Tardif, 2010, Journal of Clinical Lipidology 4: 399-404). Un estudio evaluó HDL deslipidada autóloga (Waksman et al, 2010, J Am Coll Cardiol 55: 2727-2735). Otro estudio evaluó ETC-216, un complejo de ApoA-I recombinante y palmitoil-oleoil-PC (POPC) (Nissen et al, 2003, JAMA 290: 2292-2300). CSL-111 es una ApoA-I humana purificada reconstituida a partir de plasma complejo con fosfatidilcolina de soja (SBPC) (Tardif et al, 2007, JAMA 297: 1675-1682). Los fármacos de exploración actuales han demostrado eficacia en la reducción de la placa aterosclerótica, pero el efecto fue acompañado por efectos secundarios, tales como aumento de las transaminasas o formación de anticuerpos de ApoA-I (Nanjee et al, 1999, Arterioscler Vasc Throm Biol 19: 979 -89; Nissen et al, 2003, JAMA 290: 2292-2300; Spieker et al, 2002, Circulation. 105: 1399-1402; Nieuwdorp y otros, 2004, Diabetologia. 51: 1081-4; a Drew et al, 2009, Circulation 119, 2103-11; Shaw et al, 2008, Circ Res. 103: 1084-1091; Tardif et al, 2007, JAMA 297: 1675-1682; Waksman, 2008, Circulation 118: S 371; Cho patente de Estados Unidos N° 7.273.849 B2, concedida el 25 de septiembre, 2007). Por ejemplo, el ensayo clínico ERASE (Tardiff et al, 2007, JAMA 297: 1675-1682) utilizó dos dosis de CSL-111: 40 mg/kg y 80 mg/kg de ApoA-I. El grupo de dosis de 80 mg/kg tuvo que ser parado debido a la toxicidad del hígado (como se muestra por elevación de las transaminasas

grave). Incluso en el grupo de dosis de 40 mg/kg varios pacientes experimentaron una elevación de las transaminasas.

Por tanto, existe la necesidad de fármacos más seguros que sean más eficaces en la reducción de colesterol sérico, el aumento de los niveles séricos de HDL, prevención y/o tratamiento de la dislipidemia y/o enfermedades, afecciones y/o trastornos asociados con la dislipidemia. Hay una necesidad en la técnica para las formulaciones de lipoproteínas que no estén asociadas con toxicidad hepática, y preferiblemente induzcan solamente un incremento mínimo (o nulo) de los triglicéridos, LDL-triglicéridos o VLDL-triglicéridos, así como de procedimientos de producción robustos que puedan ser utilizados para producir de forma fiable formulaciones de lipoproteínas en una escala comercial.

### 3. CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

1. La presente invención proporciona una composición que comprende una población de complejos de lipoproteínas, comprendiendo cada una

(a) una fracción lipídica que comprende al menos un lípido neutro y al menos un lípido cargado negativamente; y  
(b) una fracción de apolipoproteína que consiste esencialmente en una apolipoproteína AI ("ApoA-I"), en la que

(i) al menos 80% de la apolipoproteína en la composición está en forma de complejo;

(ii) al menos 80% del lípido en la composición está en forma de complejo;

(iii) no más del 20% de los residuos de metionina en la apolipoproteína están oxidados;

(iv) la distribución del tamaño de los complejos de lipoproteínas es al menos un 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 97% homogénea, tal como se refleja por un solo pico en la cromatografía de permeación en gel, y  
(v) la población no contiene ningún detergente.

También proporciona una dosificación unitaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención.

La presente descripción proporciona poblaciones de complejos de lipoproteínas, que comprende cada una una fracción lipídica y una fracción de apolipoproteína que consiste esencialmente en una apolipoproteína A-I ("ApoA-I"), en la que la distribución del tamaño de los complejos de lipoproteínas es al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 97% homogénea, tal como se refleja por un solo pico en la cromatografía de permeación en gel. Las poblaciones de la invención son especialmente adecuadas para el tratamiento y/o prevención de la dislipidemia y enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con la dislipidemia. Se ha descubierto que las poblaciones de complejos que tienen una mayor pureza y/u homogeneidad, y/o comprenden proporciones particulares de lípidos y proteínas, tal como se describe en el presente documento, tienen una capacidad aumentada de movilizar el colesterol combinado con un menor riesgo de efectos secundarios.

Los complejos de lipoproteínas comprenden una fracción de proteína (por ejemplo, una fracción de apolipoproteína) y una fracción de lípidos (por ejemplo, una fracción de fosfolípidos). La fracción de proteína incluye una o más proteínas de unión a lípidos, tales como apolipoproteínas, péptidos o análogos de péptidos de la apolipoproteína o miméticos capaces de movilizar el colesterol cuando está presente en un complejo de lipoproteínas. Los ejemplos no limitantes de tales apolipoproteínas y péptidos de apolipoproteína incluyen preproApoA-I, preproApoA-I, ApoA-I, preproApoA-II, proApoA-II, ApoA-II, preproApoA-IV, proApoA-IV, ApoA-IV, ApoA-V, preproApoE, proApoE, ApoE, preproApoA-III, proApoA-III, ApoA-III, preproApoA-Ip, proApoA-Ip, ApoA-Ip, preproApoA-Iz, proApoA-Iz, y ApoA-Iz. La o las apolipoproteínas pueden estar en la forma de monómeros, dímeros o trímeros, o mezclas de los mismos. En una realización específica, la fracción de apolipoproteína consiste esencialmente en ApoA-I, lo más preferiblemente de una sola isoforma. ApoA-I en complejos de lipoproteínas puede tener al menos 90% o al menos 95% de identidad de secuencia con una proteína correspondiente a los aminoácidos 25 a 267 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, ApoA-I comprende además un ácido aspártico en la posición correspondiente al aminoácido 25 de ApoA-I de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 (y la posición 1 de la proteína madura). Preferiblemente, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de la ApoA-I se procesa correctamente, la proteína madura (es decir, que carece de las secuencias señal y el propéptido) y no está oxidada, desamidada y/o truncada.

La presente descripción también proporciona células de mamífero huésped manipuladas para expresar la ApoA-I, cultivos celulares que comprenden ApoA-I, y procedimientos de producción ApoA-I madura, biológicamente activa. Se ha descubierto que es posible diseñar células huésped de mamífero para expresar grandes cantidades de ApoA-I madura, que está sustancialmente libre de formas inmaduras de ApoA-I (proApoA-I) y truncadas de ApoA-I generadas por la degradación por proteasas. Estos resultados son sorprendentes. En primer lugar, se podría esperar que la maquinaria de la célula huésped para el procesamiento de la proteína esté abrumada por la sobreexpresión de una proteína heteróloga tal como ApoA-I, lo que lleva a la producción de la proteína no procesada, inmadura. En segundo lugar, ApoA-I secretada en el medio de cultivo está sujeta a la degradación por proteasas y, sin embargo, sólo bajos niveles de ApoA-I truncada se observan en el medio de cultivo. Las células huésped de mamífero, cultivo de células y los procedimientos de producción de ApoA-I son particularmente adecuados para la producción de proteína madura, útiles en aplicaciones terapéuticas, en cantidades comercialmente relevantes.

Tal como se describe en este documento, una célula huésped de mamífero está diseñada para expresar una proteína que comprende preferiblemente (o consiste en) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99 %, o 100% de identidad con las posiciones 25 a 267 de la SEQ ID NO: 1. La proteína tiene preferiblemente un residuo de ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 25 de la SEQ ID NO: 1. La célula huésped de mamífero puede secretar además opcionalmente dicha proteína. En algunos casos, la proteína expresada y/o secretada por la célula huésped de mamífero puede comprender además una secuencia de señal de 18 aminoácidos (MKAAVLTLAVLFLTGSQA, SEQ ID NO: 2) y o una secuencia de propéptido de 6 aminoácidos (RHFQQ, SEC ID NO: 3). En algunos casos, la célula huésped está diseñada para expresar una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

La célula huésped puede ser de cualquier línea celular de mamífero, incluyendo, pero no limitado a, ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1 o CHO-S), VERO, BHK, BHK 570, HeLa, COS-1, COS-7, MDCK, 293, 3T3, PC12 y W138, o de una célula o línea celular de mieloma (por ejemplo, una célula o línea celular de mieloma murino).

La célula huésped de mamífero puede contener, además, múltiples copias de un ácido nucleico que codifica una proteína ApoA-I, por ejemplo, una proteína que comprende o que consiste en las posiciones 25 a 267 de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la célula huésped de mamífero puede contener al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, o más copias, y hasta aproximadamente 10, 11, 12, 13, o 14 copias del ácido nucleico. El ácido nucleico adicional puede unirse operativamente a un promotor capaz de expresar la proteína en un alto nivel en la célula huésped de mamífero, tal como, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus de simio o más específicamente, el promotor de citomegalovirus de simio temprano inmediato.

Las células huésped de mamífero son preferiblemente capaces de producir al menos aproximadamente 0,5, 1, 2, o 3 g/litro ApoA-I en el cultivo y/o hasta aproximadamente 20 g/litro ApoA-I en cultivo, por ejemplo, hasta 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, o 15 g/litro ApoA-I en cultivo. El cultivo puede ser de cualquier escala, que varía de aproximadamente 150 ml a aproximadamente 500 litros, 1000 litros, 2000 litros, 5000 litros, 10.000 litros, 25.000 litros o 50.000 L o más. En realizaciones diferentes, el volumen de cultivo puede variar de 10 litros a 50 litros, de 50 litros a 100 litros, de 100 litros a 150 litros, de 150 litros a 200 litros, de 200 litros a 300 litros, de 300 litros a 500 litros, de 500 litros a 1000 litros, de 1.000 litros a 1500 litros, de 1.500 litros a 2.000 litros, de 2.000 litros a 3.000 litros, de 3.000 litros a 5.000 litros, de 5.000 litros a 7.500 litros, de 7.500 litros a 10.000 litros, de 10.000 litros a 20.000 litros, de 20.000 litros a 40.000 litros, de 30.000 litros a 50.000L. En algunos casos, el cultivo es un cultivo a gran escala, tales como 15 litros, 20 litros, 25 litros, 30 litros, 50 litros, 100 litros, 200 litros, 300 litros, 500 litros, 1.000 litros, 5.000 litros, 10.000 litros, 15.000 litros, 20.000 litros, 25.000 litros, hasta 50.000 litros o más.

Las células huésped de mamífero de la presente descripción se pueden desarrollar en cultivo. Por lo tanto, la presente descripción proporciona además un cultivo de células de mamífero que comprende una pluralidad de células huésped de mamífero, tal como se describe anteriormente o en la sección 6.1.2 a continuación. El cultivo celular puede incluir una o más de las siguientes características: (a) el cultivo (que es opcionalmente un cultivo discontinuo a gran escala de al menos 10 litros, al menos 20 litros, al menos 30 litros, al menos 50 litros, al menos 100 litros, 300 litros, 500 litros, 1000 litros, 5000 litros, 10,000 litros, 15,000 litros, 20,000 litros, 25,000 litros, hasta 50.000 litros o un cultivo continuo de al menos 10 litros, al menos 20 litros, al menos 30 litros, al menos 50 litros, al menos 100 litros, 300 litros, 500 litros, 1000 litros, 5000 litros, o hasta 10.000L) comprende al menos aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 g/litro o más de proteína ApoA-I madura que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 25 a 267 de SEQ ID NO: 1; (b) al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos el 99% de la proteína en el medio de cultivo es una proteína ApoA-I que carece de una secuencia señal; (c) al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos el 99% de la proteína en el medio de cultivo es una proteína ApoA-I madura que carece de una secuencia señal y una secuencia de propéptido; y (d) al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% de la ApoA-I madura no está truncada, oxidada o desamidada.

La presente descripción también proporciona procedimientos para producir ApoA-I madura, biológicamente activa. Generalmente, los procedimientos comprenden el cultivo de cualquiera de las células huésped de mamíferos descritas anteriormente o en la Sección 5.1.2 en condiciones en las que ApoA-I se expresa y secreta. El procedimiento puede incluir además una etapa de recuperación a partir del sobrenadante de una célula huésped de mamífero en cultivo, y, opcionalmente, purificar la ApoA-I madura, biológicamente activa (tal como mediante los procedimientos descritos en las Secciones 5.1.3 y 5.1.4 a continuación).

La ApoA-I obtenida u obtenible por los procedimientos descritos anteriormente además puede formar complejos con lípidos para formar un complejo de lipoproteínas, tal como se describe en el presente documento, y/o incorporarse en composiciones farmacéuticas en cantidades terapéuticamente eficaces. Las composiciones farmacéuticas son preferiblemente soluciones tamponadas con fosfato que también contienen sacarosa y/o manitol como excipientes.

Además, se ha descubierto que, mediante la purificación de ApoA-I usando una nueva combinación de cromatografía y etapas de filtración, se pueden producir grandes cantidades de ApoA-I pura que contiene niveles de proteínas de células huésped, ADN de células huésped, endotoxinas y formas truncadas de la proteína que son lo suficientemente bajos para conferir uno o más atributos, incluyendo la reducción del riesgo de efectos secundarios y baja o ninguna toxicidad, lo que hace que la proteína sea particularmente adecuada para usos terapéuticos. Preferiblemente, la ApoA-I purificada mediante los procedimientos descritos en el presente documento se produce de forma recombinante en células de mamíferos y se secreta en el medio de crecimiento. Por consiguiente, la presente descripción se refiere a un procedimiento de purificación de ApoA-I que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene ApoA-I con una matriz de intercambio aniónico en condiciones tales que la ApoA-I no se une a la matriz; (b) filtrar la solución que contiene ApoA-I obtenida en la etapa (a) a través de una membrana que tiene un tamaño de poro suficiente para eliminar los virus o partículas virales; (c) hacer pasar el filtrado obtenido en la etapa (b) a través de una primera columna de cromatografía de fase inversa bajo condiciones tales que la ApoA-I se une a la matriz; (d) eluir a partir de la primera matriz de cromatografía de fase inversa un primer eluato que contiene de fase inversa de ApoA-I usando un gradiente de concentraciones crecientes de un disolvente orgánico; (e) pasar el primer eluato de fase inversa de ApoA-I de la etapa (d) a través de una segunda columna de cromatografía de fase inversa bajo condiciones tales que la ApoA-I se une a la matriz; y (f) eluir de la segunda matriz de cromatografía de fase inversa un segundo eluato de fase inversa que contiene ApoA-I usando un gradiente de concentraciones crecientes de un disolvente orgánico. El orden en que se realizan las etapas no es crítico, por ejemplo, en una realización de ejemplo la etapa de filtración a través de una membrana para eliminar los virus o partículas virales se realiza después de la etapa (f) anterior, en lugar de después de la etapa (a).

También se describe en el presente documento un producto de ApoA-I sustancialmente puro obtenido u obtenible por los procedimientos de purificación descritos en este documento en el que la concentración de ApoA-I es al menos 10 g/litro. El producto de ApoA-I sustancialmente puro producido por los procedimientos de purificación descritos en este documento preferiblemente comprende menos de aproximadamente 10 pg de ADN de la célula huésped por mg de ApoA-I, menos de aproximadamente 100 ng de proteínas de células huésped por mg de ApoA-I, y/o menos de 0,1 UE de endotoxina por mg de ApoA-I. El producto ApoA-I puede ser al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro o al menos 99% puro.

Además, el producto de ApoA-I sustancialmente puro se puede incorporar en cualquiera de las composiciones farmacéuticas y/o complejos de lipoproteínas descritos en este documento que comprenden ApoA-I.

La fracción lipídica incluye típicamente uno o más fosfolípidos que pueden ser neutros, con carga negativa, carga positiva, o una combinación de los mismos. Las cadenas de ácidos grasos en los fosfolípidos son preferiblemente de 12 a 26 o 16 a 26 carbonos de longitud y pueden variar en el grado de saturación de saturado a monoinsaturado. Los fosfolípidos de ejemplo incluyen fosfolípidos de cadena de alquilo pequeña, fosfatidilcolina de huevo, fosfatidilcolina de soja, dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina, 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidiletanolamina dioleoilfosfatidilcolina, dilauroilfosfatidilglicerol fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol tales como dimiristoilfosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilglicerol, diestearoilfosfatidilglicerol, dioleoilfosfatidilglicerol, ácido dimiristoilfosfatídico, ácido dipalmitoilfosfatídico, dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidilserina, dipalmitoilfosfatidilserina, fosfatidilserina del cerebro, esfingomielina de cerebro, esfingomielina de huevo, esfingomielina de leche, palmitoil esfingomielina, fitoesfingomielina, dipalmitoilesfingomielina, diestearoilesfingomielina, sal de dipalmitoilfosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, dilaurilfosfatidilcolina, (1,3)-D-manosil-(1,3)diglicérido, aminofenilglucósido, glicolípidos de 3-colesterol-6'-(glicosil) hexil éter, y colesterol y sus derivados. Las fracciones de fosfolípidos que incluyen SM y palmitoilesfingomielina pueden incluir opcionalmente pequeñas cantidades de cualquier tipo de lípidos, incluyendo, pero no limitado a lisofosfolípidos, esfingomielinas distintas de palmitoilesfingomielina, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, glicéridos, triglicéridos, y colesterol y sus derivados.

Más preferiblemente, la fracción lipídica contiene al menos un fosfolípido neutro y, opcionalmente, uno o más fosfolípidos cargados negativamente. En complejos de lipoproteínas que incluyen tanto fosfolípidos neutros como cargados negativamente, los fosfolípidos neutros y cargados negativamente pueden tener cadenas de ácidos grasos con el mismo o diferente número de átomos de carbono y el mismo o diferente grado de saturación. En algunos casos, los fosfolípidos neutros y cargados negativamente tendrán la misma cola de acilo, por ejemplo, una cadena de acilo C16:0, o palmitoil.

Cuando el componente lipídico del complejo comprende o consiste en fosfolípidos neutros y cargados negativamente, la relación peso:peso (p:p) de fosfolípido(s) neutros con respecto a cargado negativamente está preferiblemente en una proporción de peso:peso que varía de aproximadamente 99:1 a aproximadamente 90:10, más preferiblemente de aproximadamente 99:1 a aproximadamente 95:5, y lo más preferiblemente de aproximadamente 98:2 a aproximadamente 96:4. En una realización, el o los fosfolípidos neutros y el o los fosfolípidos cargados negativamente están presentes en una relación peso-peso (p:p) de fosfolípido o fosfolípidos

neutros con respecto a fosfolípido o fosfolípidos de carga negativa de aproximadamente 97:3.

El fosfolípido neutro puede ser natural o sintético. Preferiblemente, el fosfolípido es una esfingomielina ("SM"), tal como palmitoil esfingomielina, una fitoesfingomielina, una difitoesfingomielina, un fosfoesfingolípido o un glicoesfingolípido, opcionalmente con ácidos grasos saturados o monoinsaturados con longitudes de cadena de 16 a 26 átomos de carbono. SM puede ser de cualquier fuente. Por ejemplo, el SM se puede obtener de la leche, el huevo, el cerebro o sintéticamente. En una realización específica, el SM se obtiene a partir de huevo de gallina ("SM de huevo"). En otra realización específica, el SM es palmitoilesfingomielina.

Cualquier fosfolípido que lleva al menos una carga negativa parcial a pH fisiológico puede ser utilizado como el fosfolípido cargado negativamente. Ejemplos no limitativos incluyen formas cargadas negativamente, por ejemplo, sales, de fosfatidilinositol, una fosfatidilserina, un fosfatidilglicerol y un ácido fosfatídico. En una realización específica, el fosfolípido cargado negativamente es 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)], o DPPG, un fosfatidilglicerol. Las sales preferidas incluyen sales de potasio y sodio.

Los fosfolípidos utilizados para fabricar los complejos de la descripción son preferiblemente al menos 95% puros y son más preferiblemente al menos 99% puros, y/o tienen niveles de oxidación menores de 4 meq O/kg, más preferiblemente de menos de 3 meq O/kg (por ejemplo, menos de 2 meq O/kg). El principal producto de la reacción inicial de oxígeno y ácidos grasos es hidroperóxido. Usando un procedimiento yodométrico, es posible medir los niveles de oxidación mediante el ensayo de la presencia de peróxido en una muestra.

Los complejos de lipoproteínas de la presente descripción tienen preferiblemente proporciones de apolipoproteína con respecto a lípido que dan lugar a la formación de complejos más completos y homogéneos, tal como se muestra en los ejemplos siguientes. Los complejos de lipoproteínas se caracterizan por una relación molar de fracción de apolipoproteína: fracción lipídica que van desde 1:80 a 1:120, de 1:100 a 1:115, o de 1:105 a 1:110, en donde la apolipoproteína se expresa en equivalentes de ApoA-I. En realizaciones específicas, la relación molar de la fracción de apolipoproteína: fracción lipídica es 1:80 a 1:90 (por ejemplo, 1:82, 1:85 o 1:87), de 1:90 a 1:100 (por ejemplo, 1:95 o 1:98), de 1:100 a 1:110 (por ejemplo, 1:105 o 1:108).

En realizaciones específicas, particularmente aquellas en las que SM de huevo se utiliza como el lípido neutro, la relación en peso de la fracción de apolipoproteína:fracción lipídica varía de aproximadamente 1:2,7 a aproximadamente 1:3 (por ejemplo, 1:2,7).

Los complejos de lipoproteínas de la presente descripción también se pueden utilizar como portadores para suministrar agentes activos hidrófobos, lipófilos o apolares. Para tales aplicaciones, la fracción lipídica puede incluir además, o el complejo de lipoproteína se puede cargar con, uno o más agentes activos hidrófobos, lipófilos o apolares, incluyendo, pero no limitado a, los ácidos grasos, fármacos, ácidos nucleicos, vitaminas, y/o nutrientes. Ejemplos específicos de agentes activos se describen en la Sección 5.2.

La presente descripción también proporciona poblaciones de complejos de lipoproteínas. Típicamente:

- las poblaciones contienen una pluralidad de complejos de lipoproteínas, comprendiendo cada una una fracción de proteínas y una fracción de lípidos;
- las fracciones de proteína contienen una lipoproteína o un análogo de lipoproteína, tal como se describe anteriormente, y en la Sección 5.1 o en la Sección 5.5.3; más preferiblemente una fracción de proteína comprende o consiste esencialmente en lipoproteína (por ejemplo, proteína ApoA-I) que se obtiene o es obtenible por los procedimientos descritos en la Sección 5.1.2 y/o se purifica por los procedimientos descritos en la Sección 5.1.4;
- las fracciones de lípidos contienen un lípido como se describió anteriormente, y en la Sección 5.2 o en la Sección 5.5.2;
- los complejos de lipoproteínas se producen preferiblemente por los procedimientos de ciclado térmico descritos en la Sección 5.5.4.

Los solicitantes han descubierto varias características que se cree que contribuyen de forma individual o en combinación con la potencia y el perfil de seguridad de las poblaciones de complejos de lipoproteínas. Estas características incluyen:

- la homogeneidad en el tamaño de los complejos en una población, mayormente oscila entre 4 nm y 15 nm (por ejemplo, entre 5 nm y 12 nm, entre 6 nm y 15 nm, o entre 8 nm y 10 nm);
- la pureza de la apolipoproteína utilizada para producir el complejo (por ejemplo, la falta de formas oxidadas, desamidadas, truncadas y/o inmaduras de apolipoproteína y/o la falta de endotoxina, y/o falta de proteínas distintas de la apolipoproteína o apolipoproteínas (tal como proteínas de la célula huésped), y/o el ADN de la célula huésped que a menudo están presentes en la producción recombinante);
- la pureza de los propios complejos en la población (caracterizada por la falta de contaminantes, tales como disolventes o detergentes utilizados para preparar los complejos, la falta de lípidos oxidados, la falta de proteínas desamidadas, oxidadas o truncadas; y/o cantidades reducidas o falta de apolipoproteína y/o lípidos no complejados).

De estas características, se cree que la homogeneidad de los complejos y la prevalencia de apolipoproteína madura, sin modificar en los complejos, aumentan la potencia. La pureza de las apolipoproteínas, lípidos, y los complejos

reduce el riesgo de efectos secundarios, tales como daño hepático reflejado por el aumento de las enzimas hepáticas (por ejemplo, transaminasas). Además, los inventores han hecho factible producir poblaciones de complejos de lipoproteínas por procedimientos que dan lugar a la incorporación de la mayor parte de la apolipoproteína en complejos, y la reducción en la cantidad de apolipoproteína no complejada también es beneficioso ya que reduce el riesgo de una respuesta inmunogénica en un sujeto que podría ser causada por la administración de una proteína heteróloga.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona poblaciones de complejos de lipoproteínas que se caracterizan por uno o más, o incluso la totalidad, de las siguientes características:

- (a) al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% en peso de la lipoproteína, típicamente ApoA-I, en dicha población está en forma madura;
- (b) no más de 25%, no más de 20%, no más de 15%, no más de 10% o no más de 5% en peso de la lipoproteína, típicamente ApoA-I, en dicha población está en forma inmadura;
- (c) la población contiene no más de 100 picogramos, no más de 50 picogramos, no más de 25 picogramos, no más de 10 picogramos o no más de 5 picogramos de ADN de la célula huésped por miligramo de la lipoproteína, típicamente ApoA-I;
- (d) la población no contiene más de 500 nanogramos, más de 200 nanogramos, más de 100 nanogramos, más de 50 nanogramos o más de 20 nanogramos de proteína de la célula huésped por miligramo de la lipoproteína, típicamente ApoA-I;
- (e) no más de 25%, no más de 20%, no más de 15%, no más de 10% o no más de 5% en peso de la lipoproteína, típicamente ApoA-I, en la población está en forma truncada ;
- (f) el componente de lipoproteína comprende o consiste en ApoA-I madura, y no más de 20%, no más de 15%, no más de 10%, no más de 5%, no más de 3%, no más de 2 % o no más de 1% de cada uno de metionina 112 y metionina 148 en dicha ApoA-I en dicha población está oxidada;
- (g) al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de los complejos de lipoproteína están en forma de partículas de 4 nm a 15 nm de tamaño, por ejemplo, 6 nm a 15 nm de tamaño, u 8 a 12 nm de tamaño, aún más preferentemente, de 5 nm a 12 nm de tamaño, medido por cromatografía de permeación en gel ("GPC") o dispersión de luz dinámica ("DLS");
- (i) la población no contiene más de 1 UE, más de 0,5 UE, más de 0,3 UE o más de 0,1 UE de endotoxina por miligramo de la lipoproteína, típicamente ApoA-I;
- (j) no más de 15%, no más de 10%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2% o no más de 1% de los aminoácidos en la lipoproteína, típicamente ApoA-I, en dicha población están desamidados;
- (k) no más de 15%, no más de 10%, no más de 5%, no más de 2% o 0% en peso del lípido en la fracción lipídica en dichos complejos es colesterol;
- (l) la población no contiene más de 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm de un disolvente no acuoso;
- (m) la población no contiene ningún detergente (por ejemplo, colato);
- (n) la población puede ser al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% homogénea, tal como se mide mediante el porcentaje de la población en un solo pico en cromatografía de permeación en gel;
- (o) la población está en una composición en la que al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 97% de la proteína está en forma de complejo;
- (p) no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2% o no más de 1% del lípido en dicha población está oxidado; y
- (q) no más de 15%, no más de 10%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2% o no más de 1% de residuos de metionina y/o triptófano en dicha población están oxidados.

En realizaciones específicas, la población tiene características seleccionadas de los siguientes grupos:

- Grupo I: características (a), (b) y (e) anteriores;
- Grupo II: características (c), (d) y (i) anteriores;
- Grupo III: características (f), (j), (e), (p) y (q) anteriores;
- Grupo IV: características (g), (n) y (o) anteriores;
- Grupo V: características (l) y (m) anteriores; y
- Group VI: característica (k) anterior.

En ciertos aspectos, la población se caracteriza por uno o dos características seleccionadas independientemente de cada uno del Grupo I y Grupo IV; opcionalmente, la población se caracteriza por tres características seleccionadas independientemente de cada uno del Grupo I y el Grupo IV. La población, además, se puede caracterizar por uno, dos o tres características seleccionadas independientemente de cada uno de Grupo II y/o Grupo III. La población puede caracterizarse además por una o dos características seleccionados independientemente del Grupo V y/o una característica seleccionada independientemente del Grupo VI.

Ciertos componentes de lípidos y proteínas pueden formar una pluralidad de complejos de lipoproteínas diferentes pero homogéneos. En consecuencia, la presente descripción también describe composiciones que comprenden dos, tres, o cuatro poblaciones de complejos de lipoproteínas que comprenden diferentes cantidades de moléculas de apolipoproteína (por ejemplo, dos, tres o cuatro moléculas de ApoA-I o equivalentes de ApoA-I). En una realización

ejemplar, una composición comprende dos poblaciones de complejos de lipoproteínas, que comprende una primera población de complejos de lipoproteínas que tienen 2 moléculas de ApoA-I o equivalentes de ApoA-I por complejo lipoproteína, una segunda población que comprende complejos de lipoproteínas que tienen 3 o 4 moléculas de ApoA-I o equivalentes de ApoA-I por complejo de lipoproteínas y, opcionalmente, una tercera población que comprende complejos de lipoproteínas que tiene 4 o 3 moléculas de ApoA-I o equivalentes de ApoA-I por complejo de lipoproteína, respectivamente.

Las composiciones que comprenden dos o más poblaciones de complejos de lipoproteínas tienen preferiblemente bajos niveles de lipoproteína y/o lípido no complejo. Por consiguiente, preferiblemente no más de 15%, no más de 12%, no más del 10%, no más de 9%, no más de 8%, no más de 7%, no más de 6%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, o no más de 1% del lípido en la composición está en forma no complejada y/o no más de 15%, no más de 12%, no más de un 10%, no más de 9%, no más de 8%, no más de 7%, no más de 6%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2 % o no más de 1% de la lipoproteína en la composición está en forma no complejada.

La descripción proporciona procedimientos para fabricar complejos de lipoproteínas. Los procedimientos se basan, entre otras cosas, en el descubrimiento de que sometiendo una suspensión que contiene lípidos no complejados y proteínas o péptidos que se unen a lípidos a condiciones de ciclo térmico da lugar a la formación de complejos de lipoproteínas con resultados ventajosos con respecto a otros procedimientos, tales como en los que los complejos de lipoproteínas se producen mediante la incubación del componente a una temperatura fija.

La presente descripción proporciona procedimientos de termociclado para la preparación de complejos de lipoproteínas, tales como los descritos en las secciones 5.5.1 a 5.5.4. Los procedimientos comprenden típicamente someter una suspensión que comprende partículas de lípidos (un "componente lipídico") y proteínas o péptidos de unión a lípidos (un "componente proteico") a una pluralidad de ciclos térmicos hasta que la mayoría del componente proteico se incorpora en complejos de lipoproteínas. Los procedimientos generalmente implican el ciclado de la suspensión entre una temperatura en un primero, intervalo de temperatura, más alto, y una temperatura en un segundo intervalo de temperatura, más bajo, hasta que se forman complejos de lipoproteínas. Los intervalos de alta y baja temperatura del proceso de termociclado se basan en las temperaturas de transición de fase de los componentes lipídicos y proteicos de los complejos de lipoproteínas. Alternativamente, cuando el componente lipídico no presenta una transición de fase definida o discreta, como podría ocurrir cuando se utilizan fosfolípidos que tienen cadenas de ácidos grasos insaturados o una mezcla de fosfolípidos, los intervalos de alta y baja temperatura del termociclo difieren en al menos aproximadamente 20°C, hasta aproximadamente 40°C o incluso más. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los intervalos de alta y baja temperatura difieren en 20°C-30°C, 20°C-40°C, 20°C-50°C, 30°C-40°C, 30°C-50°C, 25°C-45°C, 35°C-55°C.

Para un lípido, la transición de fase implica un cambio de una estructura ordenada estrechamente empaquetada, conocida como el estado de gel, a una estructura menos ordenada sin estar apretada, conocida como el estado fluido. Los complejos de lipoproteínas se forman típicamente en la técnica mediante la incubación de partículas de lípidos y apolipoproteínas a temperaturas cercanas a la temperatura de transición del lípido particular, o mezcla de lípidos utilizados. La temperatura de transición de fase del componente lipídico (que puede determinarse por calorimetría) +/- 12°C, más preferiblemente de +/- 10°C, representa el intervalo de "baja" temperatura en los procedimientos de la descripción. En ciertas realizaciones, el intervalo de baja temperatura es de +/- 3°C, +/- 5°C, o +/- 8°C de la temperatura de transición de fase del componente lipídico. En una realización específica, el intervalo de baja temperatura es de no menos de 5°C o no menos de 10°C por debajo a 5°C por encima de la temperatura de transición de fase del componente lipídico.

Para una proteína, la temperatura de transición de fase implica un cambio de la estructura terciaria a la estructura secundaria. La temperatura de transición de fase del componente proteico +/- 12°C, más preferiblemente de +/- 10°C, representa el intervalo de temperatura "alta" en los procedimientos de la descripción. En realizaciones específicas, el intervalo de alta temperatura es de +/- 3°C, +/- 5°C, o +/- 8°C de la temperatura de transición de fase del componente proteico. En una realización específica, el intervalo de baja temperatura es de 10°C por debajo de a no más de 5°C, no más de 10°C, o no más de 15°C por encima de la temperatura de transición de fase del componente proteico.

El componente lipídico de la suspensión de partida, es decir, una suspensión que todavía no ha sido sometida a ciclo térmico, preferiblemente comprende partículas de lípidos, por ejemplo, está compuesto predominantemente de lípidos que no están complejados con proteínas de unión a lípidos. La producción del componente lipídico es generalmente como se describe en la Sección 5.5.2 a continuación.

El componente proteico de la suspensión de partida contiene preferiblemente péptidos y/o proteínas de unión a lípidos que no están complejados a los lípidos, o se combinan con los lípidos en una proporción de proteína/péptido a lípido que es al menos 5 veces mayor (por ejemplo, al menos 5 veces, al menos 10 veces o al menos 20 veces mayor) que la proporción proteína/péptido a lípido en el complejo deseado. La producción del componente proteico es generalmente como se describe en la Sección 5.1 y en la Sección 5.5.3 a continuación. El componente proteico se produce preferiblemente de acuerdo con los procedimientos descritos en la Sección 5.1.2 y/o se purifica de

acuerdo con los procedimientos descritos en la Sección 5.1.3 o 5.1.4.

En los procedimientos de la descripción, una suspensión que contiene el componente proteico y componente lipídico típicamente se cicla térmicamente entre el intervalo de alta temperatura y el intervalo de baja temperatura, preferiblemente a partir de una temperatura en el intervalo de alta temperatura, hasta que se forman complejos de lipoproteínas. El uso de cantidades adecuadas de los componentes de lípidos y proteínas (por ejemplo, como se describe en la Patente US de No. de publicación 2006-0217312 A1), se puede alcanzar una complejación sustancialmente completa de los componentes de lípidos y de proteínas después de varios ciclos. Se describen detalles adicionales de la proteína y el lípido estequiometría adecuada para los procedimientos de ciclo térmico en la Sección 5.5.4.

Los complejos producidos por los procedimientos son típicamente agregados supramoleculares en forma de micelas, vesículas, partículas esféricas o en forma de disco en el que el componente proteico está unido físicamente al componente lipídico en un intervalo estequiométrico específico y con una distribución de tamaño homogénea. Los presentes procedimientos ventajosamente dan como resultado la formación de complejos sustancialmente completa de los lípidos y/o proteínas en la suspensión de partida, que da lugar a una composición que es sustancialmente sin lípidos libres y/o proteína libre, tal como se observa por procedimientos de separación, tales como la cromatografía. Por lo tanto, los procedimientos de la descripción pueden llevarse a cabo en ausencia de una etapa de purificación.

El componente lipídico en la suspensión de partida está típicamente en forma de partículas. Se prefiere que las partículas sean predominantemente al menos 45 nm, al menos 50 nm, al menos 55 nm o al menos 60 nm de tamaño que van hasta 65 nm, hasta 70 nm, hasta 75 nm, hasta 80 nm de tamaño, hasta 100 nm, hasta 120 nm, hasta 150 nm, hasta 200 nm, hasta 250 nm, hasta 300 nm, hasta 500 nm, por ejemplo, en el intervalo de 45 nm a 100 nm o 45 a 250 nm de tamaño, más preferiblemente en el intervalo de 50 nm a 90 nm de tamaño, y más preferiblemente en el intervalo de tamaño de 55 nm a 75 nm. En una realización preferida, las partículas lipídicas están compuestas predominantemente de esfingomiélin de huevo y son de 55 a 75 nm de tamaño. En otra realización preferida, las partículas lipídicas están compuestas predominantemente de una o más esfingomiélin sintética (por ejemplo, palmitoilesfingomiélin o fitoesfingomiélin) y son de 175 nm a 250 nm de tamaño. En aún otra realización preferida, las partículas lipídicas están compuestas predominantemente de uno o más lípidos sintéticos (por ejemplo, palmitoil esfingomiélin o fitoesfingomiélin) y son de 250 nm a 1000 nm de tamaño. En aún otra realización preferida, las partículas lipídicas están compuestas predominantemente de uno o más lípidos sintéticos (por ejemplo, palmitoil esfingomiélin o fitoesfingomiélin) y son de 1000 nm a 4000 nm de tamaño. Los tamaños a los que se hace referencia en el presente documento son tamaños promedio zeta (Z), tal como se determina por dispersión de luz dinámica. La homogeneización a alta presión, por ejemplo microfluidización, ventajosamente produce partículas lipídicas de tamaños adecuados. Otros procedimientos para formar partículas se describen en la Sección 6.5.2 más adelante, y se pueden utilizar como una alternativa a la homogeneización. Si tales procedimientos producen partículas fuera de los intervalos de tamaño preferidos, las partículas pueden estar sujetas a filtración por tamaño para obtener partículas de un tamaño adecuado.

Los procedimientos de preparación de complejos de lipoproteínas descritos en este documento producen ventajosamente complejos que son homogéneos en su distribución de tamaño, eludiendo la necesidad de fraccionamiento por tamaño. Por otra parte, los procedimientos de la descripción dan lugar a la incorporación sustancialmente completa (por ejemplo, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%) de la proteína de partida en partículas de lipoproteínas. Por consiguiente, la descripción proporciona una composición que comprende complejos de lipoproteínas y en la que al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de la proteína de unión a lípidos en la composición se compleja a lípido, por ejemplo tal como se determina usando cromatografía de permeación en gel. En realizaciones específicas, la descripción menciona una composición que comprende complejos de lipoproteínas que tienen de 4 nm a 20 nm de tamaño promedio zeta, por ejemplo, un tamaño promedio zeta de 4 nm a 20 nm, un tamaño promedio zeta de 4 nm a 15 nm, un 4 nm a 12 tamaño promedio zeta nm, un tamaño promedio zeta de 5 nm a 15 nm, un tamaño promedio zeta de 5 nm a 12 nm, un tamaño promedio zeta de 5 nm a 10 nm, un tamaño promedio zeta de 5 nm a 20 nm, un tamaño promedio zeta de 6 nm a 15 nm, o un tamaño promedio zeta de 8 nm a 12 nm, y en el que al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de la proteína de unión a lípidos en la composición está complejada a lípido, por ejemplo, tal como se determina usando cromatografía de permeación en gel. Someter partículas lipídicas a ciclos térmicos con una lipoproteína de acuerdo con los procedimientos descritos aquí típicamente da lugar a una población de partículas de lipoproteínas de 4 nm a 15 nm de tamaño, por ejemplo una población de partículas de lipoproteínas de 6 nm a 15 nm de tamaño, 5 nm a 12 nm de tamaño, o 8 nm a 12 nm de tamaño. El tamaño de las partículas lipídicas sometidas a ciclos térmicos puede variar desde 50 nm a 250 nm. En una realización preferida, las partículas lipídicas están compuestas predominantemente de esfingomiélin de huevo y son de 55 a 75 nm de tamaño. En otra realización preferida, las partículas lipídicas están compuestas predominantemente de uno o más esfingomiélin sintético (por ejemplo, fitoesfingomiélin) y son 175 nm a 250 nm de tamaño.

Una o más etapas en los procedimientos de preparación de complejos de lipoproteínas pueden llevarse a cabo bajo un gas inerte. Si se hace, puede reducir o evitar la oxidación de las apolipoproteínas y/o lípidos, reduciendo de este

modo el riesgo de efectos secundarios, tales como daños en el hígado. Los gases inertes adecuados incluyen nitrógeno, helio, y argón.

- 5 Los complejos de lipoproteínas obtenidos o que pueden obtenerse por los procedimientos descritos anteriormente son particularmente adecuados para usos terapéuticos porque no se necesita ninguna etapa de purificación adicional después de que se formen los complejos.

10 La presente descripción también proporciona poblaciones de complejos de lipoproteínas, y composiciones farmacéuticas que comprenden complejos de lipoproteínas o poblaciones de los mismos, tal como se describe en el presente documento, y puede incluir opcionalmente uno o más portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se envasan en cantidades de dosificación unitarias adecuadas para la administración. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones comprenden cantidades de dosificación unitarias de complejos de lipoproteínas secos (por ejemplo liofilizados) envasados en viales sellados. Tales composiciones son adecuadas para la reconstitución con agua, solución fisiológica (tal como solución salina) o tampón, y la administración a través de inyección. Tales composiciones pueden incluir opcionalmente uno o más agentes anti-apelmazamiento y/o anti-aglomerante para facilitar la reconstitución de los complejos cargados, o uno o más agentes tampón, agentes de isotonicidad (por ejemplo, sacarosa y/o manitol), azúcares o sales (por ejemplo, cloruro de sodio) diseñados para ajustar el pH, la osmolalidad y/o salinidad de la suspensión reconstituida. Las poblaciones de complejos de lipoproteínas y/o composiciones farmacéuticas descritas anteriormente se pueden fabricar bajo condiciones que minimizan la oxidación, reduciendo de este modo el riesgo de efectos secundarios, tales como daños en el hígado, causada por productos oxidados. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar bajo un gas inerte, tal como nitrógeno, helio, o argón.

25 Para aplicaciones comerciales, es útil para realizar preparaciones a gran escala de los complejos de lipoproteínas y composiciones farmacéuticas. En consecuencia, la presente descripción también menciona una preparación de al menos 1 litro, 2 litros, 5 litros o 10 litros y hasta 15 litros, 20 litros, 30 litros, 50 litros, o más (por ejemplo, una preparación de 5 litros a 30 litros, 10 litros a 15 litros o 30 litros a 50 litros) que comprende complejos de lipoproteínas en una cantidad suficiente para alcanzar una concentración de proteína de unión a lípidos de al menos aproximadamente 3 mg/ml, al menos aproximadamente 4 mg/ml, o al menos aproximadamente 5 mg/ml, y hasta aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, o aproximadamente 20 mg/ml, preferiblemente que varía de aproximadamente 8 mg/ml a aproximadamente 12 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 8 mg/ml. En una realización específica, la preparación tiene un volumen de 15 litros a 25 litros y contiene de aproximadamente 100 g a aproximadamente 250 g de ApoA-I. En otra realización específica, la preparación tiene un volumen de 30 litros a 50 litros y contiene de aproximadamente 240 g a aproximadamente 780 g de ApoA-I.

40 Los complejos de lipoproteínas descritos en este documento son útiles para tratar trastornos dislipidémicos en los animales, lo más preferiblemente en humanos. Tales condiciones incluyen, pero no se limitan a hiperlipidemia, y especialmente hipercolesterolemia (incluyendo la hipercolesterolemia familiar homocigótica y heterocigota) y enfermedad cardiovascular tal como aterosclerosis (incluyendo el tratamiento y la prevención de la aterosclerosis) y las manifestaciones clínicas miríada de la aterosclerosis, tales como, por ejemplo, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico, ataque isquémico transitorio, infarto de miocardio, síndrome coronario agudo, angina de pecho, claudicación intermitente, isquemia crítica de las extremidades, estenosis de la válvula, y la esclerosis de la válvula atrial; reestenosis (por ejemplo, prevención o tratamiento de placas ateroscleróticas que se desarrollan como consecuencia de procedimientos médicos tales como angioplastia con balón); y otros trastornos, tales como endotoxemia, que a menudo resulta en un shock séptico.

50 Se han encontrado complejos de lipoproteínas y composiciones que se describen en este documento para efectuar y/o facilitar la salida de colesterol cuando se administran en dosis más bajas que las utilizadas para otros complejos de lipoproteínas en estudios hasta la fecha. Véase, por ejemplo, Spieker et al, 2002, Circulation 105: 1399-1402 (utilizando una dosis de 80 mg/kg); Nissen et al, 2003, JAMA 290: 2292-2300 (usando dosis de 15 mg/kg o 40 mg/kg); Tardif et al, 2007 JAMA 297: 1675-1682 (usando dosis de 40 mg/kg a 80 mg/kg), usando dosis que van desde 15 mg/kg a 80 mg/kg. Además, se ha encontrado que los complejos de lipoproteínas como se describe en el presente documento tienen efectos secundarios reducidos. Tal como se muestra en los ejemplos siguientes, se ha descubierto que los complejos de lipoproteínas de la descripción movilizan eficazmente el colesterol a dosis tan bajas como 2 mg/kg, y, en cambio, los complejos de lipoproteínas previamente administrados a pacientes humanos, no aumentan significativamente los niveles de triglicéridos, VLD y las enzimas hepáticas tales como las transaminasas (cf, Nanjee et al, 1999, Arterioscler Throm Vasc Biol 19: 979-89). Además, se observan efectos secundarios reducidos incluso si las dosis se aumentan hasta aproximadamente 15 mg/kg (falta de elevación de triglicéridos) o incluso tan alta como 45 mg/kg (la falta de aumento de transaminasas) en sujetos normales con hígado y/o función del riñón normal. Por lo tanto, la capacidad de los complejos de la presente descripción que se debe administrar sin efectos secundarios se evalúa preferiblemente en un individuo con la función normal del hígado, la función renal normal, o ambos.

65 Sin estar ligado por la teoría, los inventores atribuyen los beneficios de los complejos de lipoproteínas de la descripción a una distribución de tamaños más homogénea de complejos y cantidades reducidas de proteína y/o

lípidos dañados (por ejemplo, proteína oxidada, proteína desamidada y lípido oxidado) en comparación con tratamientos previos. Se cree además que los fosfolípidos cargados negativamente que comprenden la fracción lipídica proporcionarán a los complejos y composiciones descritos en el presente documento propiedades terapéuticas mejoradas sobre complejos de lipoproteínas convencionales. Una de las principales diferencias entre las partículas pre-beta de HDL pequeñas discoidales, que se degradan en el riñón, y las HDL grandes discoidales y/o esféricas, que son reconocidas por el hígado, donde su colesterol se almacena, recicla, metaboliza (como ácidos biliares) o elimina (en la bilis), es la carga de las partículas. Las partículas pre-beta de HDL pequeñas discoidales tienen una carga superficial negativa más baja que las partículas de HDL grandes discoidales y/o esféricas que están cargadas negativamente. Se cree que la carga negativa más alta es uno de los factores que desencadenan el reconocimiento de las partículas por el hígado, y que por lo tanto evita el catabolismo de las partículas por el riñón. Además, se ha demostrado que el riñón no absorbe fácilmente partículas cargadas (véase Hacker et al, 2009, Pharmacology: Principles and Practice, 183). Por lo tanto, debido en parte a la presencia del fosfolípido o fosfolípidos cargados, se cree que los complejos de lipoproteínas con carga negativa y composiciones descritas en el presente documento se mantendrán en la circulación más tiempo que los complejos de lipoproteínas convencionales, o que la carga afectará a la vida media de la lipoproteína de una manera dependiente con la carga. Se espera que su tiempo de circulación (residencia) más largo, combinado con una reducción de la velocidad y/o grado en el que se agregan los complejos y se fusionan con HDL existente como resultado de la carga negativa, facilitará la movilización del colesterol (al dar a los complejos más tiempo para acumular colesterol) y la esterificación (al proporcionar más tiempo para la LCAT para catalizar la reacción de esterificación). La carga también puede aumentar la velocidad de captura y/o eliminación de colesterol, facilitando así la eliminación del colesterol en cantidades más grandes. Como consecuencia, se espera que los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente y composiciones descritos en este documento proporcionarán un beneficio terapéutico sobre las terapias con lipoproteínas convencionales, ya que deberán administrarse menos complejo y/o composición, y con menos frecuencia, con efectos secundarios reducidos.

En consecuencia, los procedimientos descritos en la presente memoria generalmente implican administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de lipoproteína, una población de complejos de lipoproteínas, o composición farmacéutica descrita en el presente documento para tratar o prevenir un trastorno dislipidémico. El complejo de lipoproteína se puede administrar a una dosis que varía de aproximadamente 0,25 mg/kg equivalentes de ApoA-I a aproximadamente 45 mg/kg, por ejemplo, una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg de equivalentes de ApoA-I hasta aproximadamente 15 mg/kg de equivalentes de ApoA-I por inyección. La dosis más se puede adaptar para que el individuo sea tratado mediante la selección de una dosis que reduce al mínimo el aumento en el nivel de triglicéridos, VLDL-colesterol y/o VLDL-triglicéridos. En realizaciones específicas, la dosis es de aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, o aproximadamente 12 mg/kg.

Los procedimientos comprenden además administrar el complejo de lipoproteína en un intervalo que va de 5 a 14 días, o de 6 a 12 días, como un intervalo de una o dos semanas. Los procedimientos pueden comprender además la administración del complejo de lipoproteínas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o hasta 52 veces en cualquiera de los intervalos descritos anteriormente, y preferiblemente en un intervalo de una semana. Por ejemplo, en una realización, el complejo de lipoproteína se administra seis veces, con un intervalo de 1 semana entre cada administración. Para las condiciones crónicas, pueden llevarse a cabo más de 52 administraciones. Opcionalmente, los procedimientos pueden ir precedidos por una fase de inducción inicial en el que se administra más frecuentemente el complejo de lipoproteínas.

Los complejos y/o composiciones farmacéuticas de los mismos se pueden administrar parenteralmente, por ejemplo, por vía intravenosa. La administración intravenosa puede realizarse como una infusión durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 1 a 4 horas, aproximadamente 0,5 a 2 horas, o aproximadamente 1 hora.

Los siguientes ejemplos muestran pequeños aumentos en los niveles de triglicéridos después de la administración de dosis 30 mg/kg y 45 mg/kg, que se explica por el aumento en VLDL y LDL resultante del alto grado de movilización de colesterol. Estos parámetros pueden ser controlados durante el tratamiento, ya que se miden de forma rutinaria en laboratorios de hospitales con paneles de lípidos estándar. En base de los ejemplos a continuación, la selección de la dosis se puede lograr para minimizar el aumento en el nivel de triglicéridos y VLDL-colesterol y VLDL-triglicéridos que dependen de la reacción del paciente al medicamento, que permite un medicamento de tipo personalizado.

Los complejos y/o composiciones pueden administrarse solos (como monoterapia) o, alternativamente, pueden ser administrados conjuntamente con otros agentes terapéuticos útiles para tratar y/o prevenir la dislipidemia y/o sus afecciones, enfermedades y/o trastornos asociados. Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos con los que los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente y composiciones descritos en el presente documento se pueden administrar conjuntamente incluyen resinas de unión a ácidos biliares, inhibidores de HMG CoA-reductasa (estatinas), niacina, resinas, inhibidores de la absorción de colesterol, inhibidores de la agregación de plaquetas, fibratos, anticoagulantes, inhibidores de la CETP (por ejemplo, anacetrapib y dalcetrapib), y/o anticuerpos PCSK9 o ligandos.

#### 4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: la secuencia de aminoácidos de prepro-apolipoproteína A-I humana (SEQ ID NO: 1; GenBank No. de acceso AAB59514.1). Los aminoácidos 1-18, en negrita, corresponden a la secuencia señal de ApoA-I, y los aminoácidos 19-24 corresponden a la secuencia de propéptido, subrayada. La secuencia señal y el propéptido se escinden en células para producir la ApoA-I humana madura de longitud completa (aminoácidos 25-267).

FIG. 2: Títulos de ApoA-I en cultivos de lotes alimentados durante 12 días de células S-CHO recombinantes que expresan ApoA-I. Las células se cultivaron de forma continua mediante pases en serie desde generación 0 a generación 43. La producción de ApoA-I se monitorizó en las generaciones 4, 8, 14, 19, 25, 21, 36 y 43 mediante HPLC de fase inversa. La cantidad de ApoA-I en el medio de cultivo varió de 1259 mg/L a 1400 mg/L.

FIGS. 3A-3B: FIG. 3A muestra la densidad de células viables en un cultivo de 13 días de 200 L de células S-CHO recombinantes que expresan ApoA-I. La densidad de células viables alcanzó su punto máximo el día 9 en 33,20 x 10<sup>5</sup> células/ml con una viabilidad de 92,5%. FIG. 3B muestra la concentración de ApoA-I en el medio de cultivo del cultivo de 13 días. La concentración de ApoA-I en el medio de cultivo alcanzó su punto máximo el día 12 a aproximadamente 2 mg/mL.

FIG. 4: gel de poliacrilamida de SDS de ApoA-I purificada mediante los procedimientos descritos en el presente documento. El carril de la izquierda muestra marcadores de peso molecular. El carril de la derecha muestra ApoA-I purificada que tiene un peso molecular de aproximadamente 28 kD.

FIGS. 5A-5D: Cromatogramas de HPLC de complejos proApoA-I/SM en proporciones en peso de proteína:lipido de 1:2,5 (Fórmula A; FIG. 5A.), 1:2,7 (Fórmula B; FIG. 5B.), 1:3,1 (Fórmula C; FIG. 5C), y complejos de proApoA-I/SM/DPPC en una proporción en peso de proteína:lipido de 1:2,7 (Fórmula D; FIG. 5D).

FIGS. 6A-6D: Cromatogramas de HPLC de complejos de lipoproteína de Fórmula D a los 10, 20, 30, y 60 minutos, respectivamente.

FIGS. 7A-7D: Cromatogramas de HPLC de complejos de lipoproteína de Fórmula B a los 10, 20, 30, y 50 minutos, respectivamente.

FIGS. 8A-8D: Cromatogramas de HPLC de complejos de lipoproteína de fórmula F a los 20, 40, 60, y 120 minutos, respectivamente.

FIG. 9: Gráfico de formación de complejo HDL pre-beta con el tiempo que ilustra la formación de complejos de lipoproteína con una proporción peso:peso de lipoproteína: fosfolípido total de 1:2,7 que comprende proApoA-I y SM (Fórmula B), proApoA-I, SM, DPPC y DPPG con una proporción peso:peso de SM:DPPC:DPPG de 48:48:4 (Fórmula F), y proApoA-I, SM, DPPC y DPPG con una proporción peso:peso de SM:DPPC:DPPG de 73:23:4 (Fórmula G).

FIG. 10A-10D: Cromatogramas de HPLC para las Fórmulas E, H, I, y J, respectivamente.

FIG. 11: Diagrama esquemático de proceso de ejemplo para la fabricación de complejos de lipoproteínas.

FIG. 12: Aparato de ciclado térmico de ejemplo utilizado para los ciclos de ciclado térmico de escala no comercial.

FIGS. 13A-13E: Cromatograma de permeación en gel de complejos de SM/DPPG/proteínaApoA-I con aumento del número de ciclos térmicos. Los componentes estaban sujetos a ciclados térmicos entre 57°C y 37°C durante 5 minutos a cada temperatura durante un total de 30 minutos (FIG. 13A), 60 minutos (FIG. 13B), 120 minutos (FIG. 13C), 180 minutos (FIG. 13D) o 210 minutos (FIG. 13E).

FIG. 14: Cromatograma de permeación en gel de complejos SM/ApoA-I.

FIG. 15: Cromatograma de permeación en gel de complejos de N-palmitoil-4-hidroxi esfingonina-1-fosfocolina (una forma de SM o fitoesfingomielina de plantas)/DPPG/ApoA-I.

FIG. 16: Cromatograma de permeación en gel de complejos de palmitoil SM sintética/DPPG/ApoA-I.

FIG. 17: Cromatograma de permeación en gel de complejos de pfitoesfingomielina/DPPG/apoA-I.

FIG. 18: Cromatograma de permeación en gel de complejos de péptido de SM/DPPC/DPPG/ApoA-I.

FIG. 19A-19D: Caracterización de partículas lipídicas por un sistema de dispersión de luz dinámica utilizando un Malvern Instruments Zetasizer (Malvern Instruments Inc.). En la FIG. 19A, el promedio de Z es de 84,49 nm (las "partículas de 84 nm"); en FIG. 19B, el promedio de Z es de 76,76 nm (las "partículas de 77 nm"); en FIG. 19C, el promedio de Z es de 66,21 nm (las "partículas de 66 nm"); y en FIG. 19D, el promedio de Z es de 59,50 nm (las "partículas de 60 nm").

FIGS. 20A-20D: Cromatogramas de permeación en gel de complejos después de cinco ciclos térmicos con partículas lipídicas de 84 nm (FIG. 20A.), 77 nm (FIG. 20B), 66 nm (FIG. 20C) y 60 nm (FIG. 20D).

FIGS. 21A-21B: Cromatogramas de permeación en gel de complejos después de seis ciclos térmicos que comienzan con partículas lipídicas de 450 nm (FIG. 21A) y 40 nm (FIG. 21B).

FIG. 22: Cromatograma de permeación en gel de complejos después de seis ciclos térmicos que comienzan con partículas lipídicas de 65 nm, con el primer ciclo iniciado a la "baja temperatura" de 37°C.

FIG. 23: Diagrama esquemático de realización de ejemplo para la fabricación de composiciones farmacéuticas que comprenden complejos de lipoproteínas, que incluyen formular los complejos de lipoproteínas producidos utilizando los procedimientos de la descripción en composiciones farmacéuticas útiles comercialmente.

FIG. 24: Aumento de los niveles de VLDL-colesterol total en plasma después de la infusión de un complejo de lipoproteína de acuerdo con Fórmula B y Fórmula H. Los complejos de lipoproteínas de acuerdo con Fórmula H (■) y Fórmula B (▼) se perfundieron en conejos en ayunas en dosis de 5 mg/kg. Los valores basales, que oscilan entre 0,03 y 0,3 g/L para los tres grupos, se restaron para determinar el aumento de niveles de VLDL-colesterol total en plasma.

FIG. 25: Aumento de niveles de triglicéridos en plasma después de la infusión de un complejo de lipoproteína de acuerdo con Fórmula B y Fórmula H. Los complejos de lipoproteína de acuerdo con Fórmula H (■) y Fórmula B (▲)

se perfundieron en conejos en ayunas en dosis de 5 mg/kg. Los valores basales, que oscilan entre 0,31 y 0,71 g/L para los tres grupos, se restaron para determinar el aumento de los niveles de triglicérido en plasma.

FIG. 26A-26D: Aumento de colesterol total en plasma (FIG. 26A), triglicéridos (FIG. 26B), fosfolípidos (FIG. 26C) y ApoA-I (FIG. 26D) después de la infusión de 5 mg/kg o 20 mg/kg y 20 mg/kg en conejos de complejos de ApoA-I/SM de huevo (●, ▲) o complejos de ApoA-I/SM sintética (◆, ▼), en comparación con diluyente (■). Los valores basales variaron de la siguiente manera para los diferentes lípidos plasmáticos medidos: de 0,28 a 0,4 g/L para el colesterol en plasma, de 0,23 a 0,29 g/L para triglicéridos en plasma, y entre 0,45 y 0,61 g/L para fosfolípidos en plasma.

FIG. 27A-27C: Aumento de HDL-colesterol total en plasma (FIG. 27A), LDL-colesterol total (FIG. 27B) y VLDL-colesterol total (FIG. 27C) después de infusión en conejos de 5 mg/kg de complejos de ApoA-I/SM de huevo (●) y complejos de ApoA-I/SM sintética (◆) en comparación con diluyente (■). Valores basales oscilaron de la siguiente manera: entre 0,20 y 0,31 g/L para HDL-colesterol total en plasma, entre 0,06 y 0,09 g/L para LDL-colesterol total en plasma, y entre 0,007 y 0,011 g/L para VLDL-colesterol total en plasma.

## 5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción proporciona complejos de lipoproteínas, poblaciones de los mismos, junto con procedimientos de fabricación de la lipoproteína. Los complejos, y las poblaciones y las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) de las mismas son útiles para, entre otras cosas, el tratamiento y/o profilaxis de la dislipidemia y/o enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con la dislipidemia. Tal como se discutió en la sección de características de la invención, los complejos de lipoproteínas comprenden dos fracciones principales, una fracción de apolipoproteína y una fracción de fosfolípidos, preferiblemente en proporciones en peso o molar definidas, y que incluye preferentemente una cantidad especificada de un fosfolípido neutro y, opcionalmente, uno o más fosfolípidos cargados negativamente.

### 5.1. La fracción proteica

La presente descripción proporciona complejos de lipoproteínas que comprenden una fracción de proteína. La presente descripción proporciona procedimientos de fabricación de complejos de lipoproteínas. El componente proteico de los complejos de lipoproteínas no es crítico para el éxito en los presentes procedimientos. Prácticamente cualquier proteína de unión a lípidos, tal como una apolipoproteína y/o derivado o análogo de la misma que proporcione un beneficio terapéutico y/o profiláctico pueden ser incluidos en los complejos. Por otra parte, cualquier péptido o análogo de péptido de hélice alfa, o cualquier otro tipo de molécula que "imite" la actividad de una apolipoproteína (tales como, por ejemplo ApoA-I) en que puede activar LCAT o formar partículas discoidales cuando se asocia con los lípidos, pueden ser incluidos en los complejos de lipoproteínas, y está abarcado por el término "proteína de unión a lípidos."

#### 5.1.1. Proteínas de unión a lípidos

La presente descripción proporciona además procedimientos de purificación de proteína producida de forma recombinante, por ejemplo, para su uso en la fabricación de complejos de lipoproteínas. La proteína producida de forma recombinante es más adecuadamente una apolipoproteína. Las proteínas adecuadas incluyen apolipoproteínas ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V y ApoE; preferiblemente en forma madura. Las proteínas de unión a lípido también activan formas polimórficas, isoformas, variantes y mutantes, así como las formas truncadas de las apolipoproteínas anteriores, la más común de las cuales son la apolipoproteína AI<sup>Milano</sup> (ApoA-I<sub>M</sub>), apolipoproteína AI<sup>Paris</sup> (ApoA-I<sub>P</sub>), y apolipoproteína AI<sup>Zaragoza</sup> (ApoA-I<sub>Z</sub>). Mutantes de apolipoproteínas que contienen residuos de cisteína también son conocidos y también se pueden utilizar (véase, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos N° 2003/0181372). Las apolipoproteínas pueden estar en forma de monómeros o dímeros, que pueden ser homodímeros o heterodímeros. Por ejemplo, los homo- y heterodímeros (cuando sea posible) de ApoA-I (Duverger et al, 1996, Arterioscler Thromb Vasc Biol 16 (12): 1424-1429), ApoA-I<sub>M</sub> (Franceschini et al. , 1985, J. Biol Chem. 260: 1632-1635), ApoA-I<sub>P</sub> (Daum et al, 1999, J. Mol Med 77: 614-22), ApoA-II (Shelness et al, 1985, J. Biol Chem 260 (14): 8637-46; Shelness et al, 1984, J. Biol Chem 259 (15): 9929-35), ApoA-IV (Duverger et al, 1991, Euro J. Biochem 201 (2): 373-83), ApoE (McLean et al, 1983, J. Biol Chem 258 (14): 8993-9000), ApoJ y ApoH pueden ser utilizados. Las apolipoproteínas pueden incluir residuos correspondientes a elementos que facilitan su aislamiento, tales como etiquetas de His, u otros elementos diseñados para otros fines, siempre que la apolipoproteína retenga alguna actividad biológica cuando se incluye en un complejo.

Tales apolipoproteínas se pueden purificar a partir de fuentes animales (y en particular de fuentes humanas) o producirse de manera recombinante tal como se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, Chung et al., 1980, J. Lipid Res. 21 (3): 284-91; Cheung et al., 1987, J. Lipid Res. 28 (8): 913-29. Véanse también las patentes de Estados Unidos Nos. 5.059.528, 5.128.318, 6.617.134; publicación de Estados Unidos Nos. 20002/0156007, 2004/0067873, 2004/0077541 y 2004/0266660; y las publicaciones PCT Nos. WO/2008/104890 y WO/2007/023476. Son también posibles otros procedimientos de purificación, por ejemplo tal como se describe en las Secciones 6.1.3 y 6.1.4 a continuación.

Ejemplos no limitantes de péptidos y análogos de péptidos que corresponden a apolipoproteínas, así como agonistas que imitan la actividad de ApoA-I, ApoA-I<sub>M</sub>, ApoA-II, ApoA-IV, y ApoE, que son adecuados para su uso

como apolipoproteínas en los complejos y composiciones descritos en el presente documento se dan a conocer en las patentes de los Estados Unidos. Nos. 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166 (concedida a Dasseux et al.), la patente de Estados Unidos. No. 5.840.688 (concedida a TSO), la Publicación de Estados Unidos Nos. 2004/0266671, 2004/0254120, 2003/0171277 y 2003/0045460 (para Fogelman), la Publicación de Estados Unidos N° 2003/0087819 (a Bielicki) y N° de publicación PCT WO/2010/093918 (a Dasseux et al.). Estos péptidos y análogos de péptidos pueden estar compuestos de L-aminoácidos o D-aminoácidos o mezcla de L- y D-aminoácidos. También pueden incluir uno o más enlaces no peptídicos o amidas, tales como uno o más isómeros de péptido/amida bien conocidos. Tales apolipoproteínas de "péptido y/o miméticos de péptidos" pueden ser sintetizados o fabricados usando cualquier técnica para la síntesis de péptidos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las técnicas descritas en las Patentes de los Estados Unidos. Nos. 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166.

Los complejos pueden incluir un único tipo de proteína de unión a lípidos, o mezclas de dos o más diferentes proteínas de unión a lípidos, que pueden derivarse de la misma o diferentes especies. Aunque no es necesario, los complejos de lipoproteínas comprenderán preferiblemente proteínas de unión a lípidos que se derivan de, o corresponden en secuencia de aminoácidos a, la especie animal a tratar, a fin de evitar la inducción de una respuesta inmunitaria a la terapia. Por lo tanto, para el tratamiento de pacientes humanos, las proteínas de unión a lípidos de origen humano se utilizan preferiblemente en los complejos de la descripción. El uso de apolipoproteínas miméticas de péptidos también puede reducir o evitar una respuesta inmunitaria.

En ciertas realizaciones preferidas, la proteína de unión a lípidos es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 95% de identidad de secuencia con una proteína ApoA-I humana madura, por ejemplo, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 25 a 267 de SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, la proteína ApoA-I humana madura tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con las posiciones 25 a 267 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína ApoA-I humana madura tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un ácido aspártico en la posición 1 (es decir, la posición correspondiente a la posición 25 de la SEQ ID NO: 1). En una realización específica, la proteína ApoA-I humana madura tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 25 a 267 de la SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, la proteína ApoA-I se produce de forma recombinante en células huésped de mamífero, lo más preferiblemente células de ovario de hámster chino ("CHO"), tal como se describe en la siguiente subsección.

### 5.1.2. Expresión recombinante de apolipoproteínas

La presente descripción proporciona procedimientos de expresión recombinante para la producción de proteínas de unión a lípidos tales como ApoA-I, y ácidos nucleicos relacionados, células huésped de mamífero, cultivos de células. La proteína de unión a lípidos recombinante resultante se puede purificar y/o incorporarse en complejos de lipoproteínas tal como se describe en el presente documento.

Generalmente, para la producción recombinante, una secuencia de polinucleótido que codifica una proteína o péptido de unión a lípidos se inserta en un vehículo de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada, o en el caso de un vector viral de ARN, los elementos necesarios para la replicación y la traducción. El vector de expresión puede derivarse de virus, tales como adenovirus, virus adeno-asociado, herpesvirus, retrovirus o lentivirus. El vehículo de expresión se transfecta en una célula diana adecuada que expresará la proteína o péptido. Las células huésped adecuadas incluyen, pero no se limitan a, especies de bacterias, sistemas de células huésped de mamífero o de insectos que incluyen sistemas de baculovirus (véase, por ejemplo, Luckow y col., Bio/Technology, 6, 47 (1988)), y líneas celulares establecidas, tales como 293, COS-7, C127, 3T3, CHO, HeLa, BHK, etc. Dependiendo del sistema de expresión usado, el péptido expresado se aísla mediante procedimientos bien establecidos en la técnica. Los procedimientos para la producción de proteína y péptido recombinante son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al, 1989, Manual de Molecular Cloning A Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York; Y Ausubel et al, 1989, Current Protocols in Molecular Biología, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, NY).

Cuando ApoA-I es la proteína de unión a lípidos, la proteína ApoA-I se expresa a partir de una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica ApoA-I. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica la ApoA-I es humana. Los ejemplos no limitantes de las secuencias de nucleótidos de ApoA-I se dan a conocer en las patentes de Estados Unidos N° 5.876.968; 5.643.757; y 5.990.081, y el documento WO 96/37608. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína ApoA-I madura, preferiblemente unida operativamente a una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 1-18 de la SEQ ID NO: 1) para la secreción de la ApoA-I de la célula huésped y/o una secuencia de proproteína (por ejemplo, los aminoácidos 19-25 de la SEQ ID NO: 1). Otras secuencias señal adecuadas para la secreción dirigida de ApoA-I pueden ser heterólogas a ApoA-I, por ejemplo, un péptido señal de albúmina humana o un péptido señal de IL-2 humana, u homóloga a ApoA-I.

Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido ApoA-I humano madura, por ejemplo un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos

98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 25 a 267 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en el que la secuencia de aminoácidos comprende un ácido aspártico en la posición 25. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos también puede codificar un polipéptido que tiene una

secuencia de aminoácidos que es al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína ApoA-I tal como se establece en GenBank números de acceso. NP\_000030, AAB59514, P02647, CAA30377, AAA51746 o AAH05380.1, que comprende opcionalmente un ácido aspártico en la posición correspondiente al primer aminoácido de la proteína ApoA-I humana madura.

Los polinucleótidos que codifican ApoA-I pueden ser optimizados en codones para la expresión en células huésped recombinantes. Las células huésped preferidas son células huésped de mamífero, incluyendo, pero no limitado, células de ovario de hámster chino (por ejemplo CHO-K1; ATCC No. CCL 61; CHO-S (GIBCO Life Technologies Inc., Rockville, MD, nº de catálogo 11619012)), células VERO, BHK (ATCC No. CRL 1632), BHK 570 (ATCC No. CRL 10314), células HeLa, COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC No. CRL 1651), células MDCK, células 293 (ATCC No. CRL 1573; Graham et al, J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977), células 3T3, células de mieloma (especialmente murinas), células PC12 y células W138. En ciertas realizaciones, las células de mamífero, tales como células CHO-S (Invitrogen <sup>TM</sup>, Carlsbad CA), están adaptadas para el crecimiento en medio libre de suero. Líneas celulares adecuadas adicionales son conocidas en la técnica y están disponibles a partir de depósitos públicos tales como la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Para la expresión recombinante de ApoA-I, los polinucleótidos que codifican la ApoA-I están unidos operativamente a una o más secuencias de control, por ejemplo, un promotor o terminador, que regulan la expresión de la ApoA-I en la célula huésped de interés. La secuencia o secuencias de control pueden ser nativas o exógenas a la secuencia de codificación de ApoA-I y también nativas o exógenas a la célula huésped en la que se expresa la ApoA-I. Las secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, promotores, sitios de unión al ribosoma, líderes, secuencias de poliadenilación, secuencias de propéptido, secuencias de péptido señal, y terminadores de la transcripción. En algunas realizaciones, las secuencias de control incluyen un promotor, sitio de unión de ribosoma, y señales de parada transcripcionales y traduccionales. Las secuencias de control pueden incluir también uno o más enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica la ApoA-I.

Los promotores que dirigen la expresión recombinante de ApoA-I pueden ser promotores constitutivos, promotores regulados, o promotores inducibles. Las secuencias promotoras apropiadas se pueden obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares que son endógenos o heterólogos a la célula huésped. Los procedimientos para el aislamiento, identificación y manipulación de promotores de fuerzas variables están disponibles en o son fácilmente adaptables de la técnica. Véase, por ejemplo, Nevoigt et al. (2006) Appl. Rein. Microbiol. 72: 5.266-5.273.

Una o más de las secuencias de control pueden derivar de fuentes virales. Por ejemplo, en ciertos aspectos, los promotores derivan de poliovirus o promotor tardío principal de adenovirus. En otros aspectos, el promotor deriva de virus de simio 40 (SV40), que se puede obtener como un fragmento que también contiene el origen viral de replicación de SV40 (Fiers et al, 1978, Nature 273: 113-120), o de citomegalovirus, por ejemplo, promotor temprano inmediato de citomegalovirus de simio. (Véase la patente de los Estados Unidos. Nº 4.956.288). Otros promotores adecuados incluyen los genes de metalotioneína (Véase las patentes de los Estados Unidos. Nos. 4.579.821 y 4.601.978).

También se describen en el presente documento vectores de expresión recombinante de ApoA-I. Un vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector, por ejemplo, un plásmido o un virus, que puede ser manipulado por técnicas de ADN recombinante para facilitar la expresión de una ApoA-I heteróloga en una célula huésped recombinante. El vector de expresión puede integrarse en el cromosoma de la célula huésped recombinante y comprende uno o más genes heterólogos operativamente unidos a una o más secuencias de control útiles para la producción de ApoA-I. En otras realizaciones, el vector de expresión es una molécula extracromosómica replicativa de ADN, por ejemplo, un plásmido lineal o circular cerrado, que se encuentra en un número de copias bajo (por ejemplo, desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 copias por equivalente de genoma) o en un número alto de copias (por ejemplo, más de aproximadamente 10 copias por equivalente de genoma). En diversas realizaciones, el vector de expresión incluye un marcador seleccionable, tal como un gen que confiere resistencia a los antibióticos (por ejemplo, resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina) al organismo huésped recombinante que comprende el vector. En aspectos particulares, las construcciones de ADN, vectores y polinucleótidos son adecuados para la expresión de ApoA-I en células de mamífero. Los vectores para la expresión de ApoA-I en células de mamífero pueden incluir un origen de replicación, un promotor y los sitios de unión al ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitio de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción necesarios que son compatibles con los sistemas de células huésped. En algunos aspectos, un origen de replicación es heterólogo a la célula huésped, por ejemplo, es de origen viral (por ejemplo, SV40, poliovirus, adeno, VSV, BPV). En otros aspectos, un origen de replicación es proporcionado por el mecanismo de replicación cromosómica de la célula huésped.

Los procedimientos, reactivos y herramientas para la introducción de ADN exógeno en células huésped de mamífero

se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler et al, 1978, Cell 14: 725; Corsaro et al, 1981, Somatic Cell Genetics 7: 603; Graham et al, 1973, Virology 52: 456), electroporación (Neumann et al, 1982, EMBO J. 1: 841-5), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel et al. (eds.), Short Protocols in Molecular Biology, tercera edición (John Wiley & Sons 1995)), y transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson et al, 1993, Focus 15:73; Ciccarone et al, 1993, Focus 15:80).

Para la producción de alto rendimiento, se prefiere la expresión estable de ApoA-I. Por ejemplo, tras la introducción de ADN exógeno en las células huésped, las células huésped pueden crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped pueden ser transformadas con el vector que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de codificación de ApoA-I controlada por elementos de control de la expresión apropiados y un marcador seleccionable. El marcador seleccionable en el vector confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el vector en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Se puede utilizar un conjunto de sistemas de selección, incluyendo, pero no limitado a, genes de la timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler et al, 1977, Cell 11: 223), Hipoxantina-guanina (Szybalska y Szybalski, 1962, Proc Natl Acad. Sci. USA 48: 2026), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al, 1980, Cell 22: 817) que se pueden emplear en células tk<sup>-</sup>, hgp<sup>+</sup> o apr<sup>+</sup>, respectivamente. También, la resistencia antimetabolito se puede usar como la base de selección usando, por ejemplo, dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al, 1980, Natl Acad Sci USA. 77: 3567; O'Hare et al., 1981, Proc Natl Acad Sci USA. 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA. 78: 2072; neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin et al, 1981, J. Mol Biol. 150: 1); y/o hyg, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al, 1984, gene 30: 147).

La expresión estable, de alto rendimiento también se puede lograr usando vectores retrovirales que se integran en el genoma de la célula huésped (véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº 2008/0286779 y 2004/0235173). Alternativamente, la expresión estable con alto rendimiento de ApoA-I puede lograrse mediante procedimientos de activación de genes, que implican la activación de la expresión y la amplificación de un gen endógeno de ApoA-I en el ADN genómico de una célula de mamífero de elección, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 1994/012.650. El aumento del número de copias de un gen de la ApoA-I (que contiene una secuencia de codificación de ApoA-I y uno o más elementos de control) puede facilitar la expresión de alto rendimiento de ApoA-I. Preferiblemente, la célula huésped de mamífero en las que se expresa ApoA-I tiene un índice de copias de genes de ApoA-I de al menos 2, al menos 3, al menos 4, o al menos 5. En realizaciones específicas, la célula huésped de mamífero en la que se expresa ApoA-I tiene un índice de copias de genes de ApoA-I de al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10.

En ciertas realizaciones, las células de mamífero están adaptadas para producir ApoA-I en cantidades de al menos 0,5 g/litro, al menos 1 g/litro, al menos 1,5 g/litro, al menos 2 g/litro, al menos 2,5 g/litro, al menos 3 g/litro, al menos 3,5 g/litro, y opcionalmente hasta 4 g/litro, hasta 4,5 g/litro, hasta 5 g/litro, hasta 5,5 g/litro, o hasta 6 g/litro. Las células huésped de mamífero son preferiblemente capaces de producir al menos aproximadamente 0,5, 1, 2, o 3 g/litro de ApoA-I en el cultivo y/o hasta aproximadamente 20 g/litro de ApoA-I en el cultivo, por ejemplo, hasta 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, o 15 g/litro de ApoA-I en el cultivo.

En ciertas realizaciones, las células de mamífero están adaptadas para el crecimiento en medio libre de suero. En estas realizaciones, la ApoA-I se secreta de las células. En otras realizaciones, la ApoA-I no se secreta de las células.

Las células huésped de mamífero descritas en este documento pueden usarse para producir ApoA-I. Generalmente, los procedimientos comprenden el cultivo de una célula huésped de mamífero, tal como se describe en el presente documento, en condiciones en las que se expresa ApoA-I. Además, los procedimientos pueden comprender la recuperar y, opcionalmente, purificar la ApoA-I madura a partir del sobrenadante del cultivo de células de mamífero.

Las condiciones de cultivo, incluyendo el medio de cultivo, temperatura, pH, pueden ajustarse a la célula huésped de mamífero que se cultiva y el modo de cultivo elegido (matraz de agitación, biorreactor, botella giratoria, etc ...). Las células de mamífero se pueden cultivar en un cultivo por lotes a gran escala, en cultivo continuo o semicontinuo.

También se describe en el presente documento un cultivo de células de mamífero que comprende una pluralidad de células huésped de mamíferos productoras de ApoA-I descritas en este documento. En algunas realizaciones, el cultivo de células de mamíferos comprende al menos 0,5 g/litro, al menos 1 g/litro, al menos 1,5 g/litro, al menos 2 g/litro, al menos 2,5 g/litro, al menos 3 g/litro, al menos 3,5 g/litro, y opcionalmente hasta 4 g/litro, hasta 4,5 g/litro, hasta 5 g/litro, hasta 5,5 g/litro o hasta 6 g/litro de ApoA-I. El cultivo puede ser de cualquier escala, que varía de aproximadamente 150 ml a aproximadamente 500 ml, 1 litro, 10 litros, 15 litros, 50 litros, 100 litros, 200 litros, 250 litros, 300 litros, 350 litros, 400 litros, 500 litros, 750 litros, 1.000 litros, 1.500 litros, 2.000 litros, 2.500 litros, 3.000 litros, 5.000 litros, 7.500 litros, 10.000 litros, 15.000 litros, 20.000 litros, 25.000 litros, 50.000 litros o más. En algunos casos, el cultivo es un cultivo a gran escala, tales como 15 litros, 20 litros, 25 litros, 30 litros, 50 litros, 100 litros, 200 litros, 300 litros, 500 litros, 1000 litros, 5000 litros, 10000 litros, 15000 litros, 20.000 litros, 25.000 litros, hasta 50000 litros o más.

### 5.1.3. Purificación de apolipoproteínas

La presente descripción se refiere a procedimientos de obtención de apolipoproteína altamente purificada, que es útil en la fabricación de complejos de lipoproteínas y composiciones de los mismos, tal como se describe en el presente documento. Los procedimientos pueden ser aplicados a cualquier apolipoproteína, incluyendo pero no limitados a, ApoA-I, -II, -III o -IV; ApoB48 y Apo B100; ApoC-I, -II, -III o -IV; ApoD; ApoE, ApoH; ApoJ. Más específicamente, la presente descripción se refiere a procedimientos de obtención de ApoA-I altamente purificada. En algunas realizaciones, la ApoA-I es una proteína humana que tiene una secuencia seleccionada de, pero no limitado a, las secuencias expuestas en el Genbank N° de Acceso. NP\_000030, AAB59514, P02647, CAA30377, AAA51746 y AAH05380.1. En ciertas realizaciones, la ApoA-I es una proteína humana como se describe anteriormente en la Sección 6.1.2. En otras realizaciones, los procedimientos de la presente descripción se pueden utilizar para purificar ApoA-I obtenidas de animales no humanos (véase, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos N° 2004/0077541), por ejemplo, vacas, caballos, ovejas, monos, babuinos, cabras, conejos, perros, erizos, tejones, ratones, ratas, gatos, cobayas, hamsters, pato, pollo, salmón y anguila (Brouillette et al, 2001, Biochim Biophys Acta 1531: 4-46; Yu et al., 1991, Cell Struct Funct 16 (4): 347-55; Chen y Albers, 1983, Biochim Biophys Acta 753 (1): 40-6; Luo et al, 1989, J Lipid Res. 30 (11): 1735-1746; Blaton et al, 1977, Biochemistry 16: 2157-63; Sparrow y otros, 1995, J Lipid Res 36 (3): 485-95; Beaubatie et al, 1986, J. Lipid Res. 27: 140-49; Januzzi et al, 1992, Genomics 14 (4): 1081-8; Goulinet y Chapman, 1993, J. Lipid Res 34 (6): 943-59; Collet et al, 1997, J Lipid Res 38 (4): 634-44; y Frank y Marcel, 2000, J. Lipid Res 41 (6): 853-72).

Los ejemplos de proteínas ApoA-I que se pueden purificar por los procedimientos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, la forma preproapolipoproteína de ApoA-I, las formas pro y maduras de ApoA-I, y formas polimórficas activas, isoformas, variantes y mutantes, así como formas truncadas, por ejemplo, ApoA-Im, ApoA-Iz, y ApoA-IP. ApoA-Im es la variante molecular R173C de ApoA-I (véase, por ejemplo, Parolini et al, 2003, J Biol Chem 278 (7): 4740-6; Calabresi et al, 1999, Biochemistry 38: 16307-14; y Calabresi et al, 1997, Biochemistry 36: 12428-33). ApoA-Ip es la variante molecular R151C de ApoA-I (véase, por ejemplo, Daum et al, 1999, J Mol Med 77 (8): 614-22). ApoA-Iz es una variante molecular L144R de ApoA-I (ver Recalde et al, 2001, Atherosclerosis 154 (3): 613-623; Fiddym et al, 2011, Protein Expr Purif 80 (1): 110 -116). También se conocen mutantes de apolipoproteína AI que contienen residuos de cisteína y también se pueden purificar por los procedimientos descritos en este documento (véase, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos N° 2003/0181372). ApoA-I para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento puede estar en forma de monómeros, homodímeros, o heterodímeros. Por ejemplo, los homo- y heterodímeros de ApoA-I pro y madura que se pueden preparar incluyen, entre otros, ApoA-I (Duverger et al, 1996, Arterioscler Thromb Vasc Biol 16 (12): 1424 a 1429), ApoA-Im (Franceschini et al, 1985, J Biol Chem. 260: 1632-1635) (Daum et al, 1999, J Mol Med 77: 614-22), y ApoA-Ip.

Los procedimientos de purificación descritos en este documento se pueden realizar en cualquier escala conveniente para el médico experto.

En algunos aspectos, la proteína ApoA-I que puede purificarse mediante los procedimientos descritos en el presente documento tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica, al menos 80% idéntica, al menos 85% idéntica, al menos 90% idéntica, al menos 91% idéntica, al menos 92% idéntica, al menos 93% idéntica, al menos 94% idéntica, al menos 95% idéntica, al menos 96% idéntica, al menos 97% idéntica, al menos 98% idéntica, al menos 99% idénticos o al menos 100% idéntica a los aminoácidos 25-267 de la SEQ ID NO: 1.

La apolipoproteína puede ser de cualquier fuente, incluyendo de plasma sanguíneo o de la expresión recombinante en células procariotas o eucariotas. En realizaciones particulares, la apolipoproteína es ApoA-I, por ejemplo, ApoA-I humana. En algunos aspectos, la ApoA-I se expresa en el citoplasma o periplasma de las células huésped procariotas o eucariotas. En estas realizaciones, las células se rompen para liberar la ApoA-I en el sobrenadante antes de la purificación de la ApoA-I. Los procedimientos de disrupción celular son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos ejemplares de alteración de células incluyen, pero no se limitan a, procedimientos enzimáticos, sonicación, procedimientos con detergente y procedimientos mecánicos. En ciertos aspectos preferidos, ApoA-I se expresa en células de mamífero, preferiblemente células CHO, y se secreta en el medio de crecimiento. En estas realizaciones, ApoA-I se purificó a partir del medio libre de células aclarado. Se entenderá que, aunque se describen los procedimientos de purificación en detalle en este documento en relación con la ApoA-I, está dentro de la especialización en la técnica adaptar las condiciones de purificación de otras apolipoproteínas, así como a ApoA-I no humana, formas polimórficas, isoformas, variantes, mutantes y formas truncadas de ApoA-I u otras apolipoproteínas, dependiendo de las características de proteínas específicas que son fácilmente determinables por el experto en la materia (por ejemplo, peso molecular, punto isoelectrico, radio de Stokes, hidrofobicidad, estado multimérico, etc.).

Cuando ApoA-I se prepara a partir de plasma de sangre, puede separarse de plasma de la sangre mediante cualquier procedimiento conocido, incluyendo, pero no limitado a, los procesos de fraccionamiento en frío, tales como los descritos por Cohn et al., 1946, J. Am. Chem. Soc. 68: 459-475 ("proceso de Cohn") o por Oncley et al, 1949, J. Am. Chem. Soc. 71: 541-550 ("proceso de Cohn-Oncley"). Otros procedimientos para el aislamiento de la apolipoproteína del plasma sanguíneo incluyen variaciones de los procesos de Cohn y Cohn-Oncley, tales como el proceso de Kistler-Nitschmann. (Ver Nitschmann et al, 1954, Helv Chim Acta 37: 866-873; Kistler et al, 1962, Vox

Sang 7: 414-424.).

En estas realizaciones, la apolipoproteína se obtiene por precipitación a partir de plasma con alcohol frío, por ejemplo, etanol. Otros alcoholes para uso en el fraccionamiento en frío de plasma incluyen alcoholes C1-C6 de cadena lineal o ramificada, tales como metanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, sec-butanol, isobutanol y terc-butanol. En diversas realizaciones, se pueden utilizar agentes distintos de los alcoholes que reducen la solubilidad de proteínas para precipitar la apolipoproteína del plasma. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, éteres, sulfato de amonio, 7-etoxiacridina-3,9-diamina (rivanol) y polietilenglicoles. Las proteínas precipitadas pueden separarse del sobrenadante mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, sedimentación, centrifugación y filtración.

ApoA-I se puede recuperar de cualquier fracción de plasma sanguíneo que contiene la proteína. En algunas realizaciones, ApoA-I se recupera de una fracción de suero de plasma humano a partir del cual la cantidad de fibrinógeno se ha reducido por precipitación con aproximadamente el 8% (p/p) de etanol. En otras realizaciones, la apolipoproteína se recupera de una fracción de suero de plasma humano a partir del cual las concentraciones de otras proteínas séricas (por ejemplo,  $\beta$ -globulinas y globulinas  $\gamma$ -gamma) se han reducido por precipitación con aproximadamente 25% (p/p) de etanol. En aún otras realizaciones, la apolipoproteína es recuperada como un precipitado a partir de suero humano obtenido mediante el aumento de la concentración de etanol a aproximadamente 38% a aproximadamente 42% (p/p). En una realización particular, la apolipoproteína es recuperada como un precipitado a partir de suero humano obtenido mediante el aumento de la concentración de etanol a aproximadamente 40% (p/p) (fracción de Cohn IV). La ApoA-I precipitada se puede recuperar de fracciones de suero mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a centrifugación y filtración.

En algunas realizaciones, la temperatura de fracciones de plasma de las que se recupera la apolipoproteína es suficientemente baja para evitar la desnaturalización de la proteína. En estas realizaciones, la temperatura de las fracciones de ApoA-I varía de aproximadamente -10°C a aproximadamente 0°C, tal como de aproximadamente -8°C a aproximadamente -2°C. En diversas realizaciones, el pH de las fracciones de plasma de las que se recupera ApoA-I está en un intervalo que impide la desnaturalización de la proteína. En estas realizaciones, el pH de las fracciones que contienen ApoA-I oscila de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, tal como de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5.

#### 5.1.4. Procesos de purificación mejorados de lipoproteínas

Los solicitantes han descubierto además un procedimiento mejorado de purificación, descrito a continuación y se ilustra en los Ejemplos, que produce lipoproteínas que son maduras, intactas, y sustancialmente libres de contaminantes. Los procedimientos de purificación descritos en este documento se pueden realizar en cualquier escala conveniente para el médico experto.

Los procedimientos pueden ser aplicados a cualquier apolipoproteína, incluyendo, pero no limitados a, ApoA-I, -II, -III o -IV; ApoB48 y ApoB100; ApoC-I, -II, -III o -IV; ApoD; ApoE, ApoH; ApoJ. Más específicamente, la presente descripción se refiere a procedimientos de obtención de ApoA-I altamente purificada. En algunas realizaciones, la ApoA-I es una proteína humana que tiene una secuencia seleccionada de, pero no limitada a, las secuencias expuestas en el Genbank Nº de Acceso. NP\_000030, AAB59514, P02647, CAA30377, AAA51746 y AAH05380.1. En ciertas realizaciones, la ApoA-I es una proteína humana como se describe anteriormente en la Sección 6.1.2. En otras realizaciones, los procedimientos de la presente descripción se pueden utilizar para purificar ApoA-I obtenidas de animales no humanos (véase, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos 2004/0077541), por ejemplo, vacas, caballos, ovejas, monos, babuinos, cabras, conejos, perros, erizos, tejones, ratones, ratas, gatos, cobayas, hámsteres, pato, pollo, salmón y anguila (Brouillette et al, 2001, Biochim Biophys Acta 1531: 4-46; Yu et al, 1991, Cell Struct Funct 16 (4): 347-55; Chen y Albers, 1983, Biochim Biophys Acta 753 (1): 40-6; Luo et al, 1989, J Lipid Res 30 (11): 1735-1746; Blaton et al, 1977, Biochemistry 16: 2157-63; Sparrow y otros, 1995, J Lipid Res 36 (3): 485-95; Beaubatie et al, 1986, J Lipid Res 27: 140-49; Januzzi et al, 1992, Genomics 14 (4): 1081-8; Goulinet y Chapman, 1993, J Lipid Res 34 (6): 943-59; Collet et al, 1997, J Lipid Res. 38 (4): 634-44., y Frank y Marcel, 2000, J Lipid Res 41 (6): 853-72).

Los ejemplos de proteínas ApoA-I que se pueden purificar por los procedimientos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, la forma de preapoproteína de ApoA-I, las formas pro y maduras de ApoA-I, y formas polimórficas activas, isoformas, variantes y mutantes, así como formas truncadas, por ejemplo, ApoA-Im, ApoA-Iz, y ApoA-Ip. También se conocen mutantes de apolipoproteína AI que contienen residuos de cisteína, y también se pueden purificar por los procedimientos descritos en este documento (véase, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos 2003/0181372). ApoA-I para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento puede estar en forma de monómeros, homodímeros o heterodímeros. Por ejemplo, los homo- o heterodímeros de ApoA-I pro y madura que se pueden preparar incluyen, entre otros, ApoA-I (Duverger et al, 1996, Arterioscler Thromb Vasc Biol 16 (12): 1424 a 1429), ApoA-Im (Franceschini et al, 1985, J Biol Chem. 260: 1632-1635), y ApoA-Ip (Daum et al, 1999, J Mol Med. 77: 614-22).

En algunos aspectos, la proteína ApoA-I que puede ser purificada mediante los procedimientos descritos en el presente documento tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica, al menos 80% idéntica, al menos 85% idéntica, al menos 90% idéntica, al menos 91% idéntica, al menos 92% idéntica, al menos 93% idéntica, al menos 94% idéntica, al menos 95% idéntica, al menos 96% idéntica, al menos 97% idéntica, al menos 98% idéntica, al menos 99% idéntica o al menos 100% idéntica a los aminoácidos 25-267 de la SEQ ID NO: 1.

La apolipoproteína puede ser de cualquier fuente, incluyendo de plasma sanguíneo o de la expresión recombinante en células procariotas o eucariotas. En realizaciones particulares, la apolipoproteína es ApoA-I, por ejemplo, ApoA-I humana. En algunos aspectos, la ApoA-I se expresa en el citoplasma o periplasma de las células huésped procariotas o eucariotas. En estas realizaciones, las células se rompen para liberar la ApoA-I en el sobrenadante antes de la purificación de la ApoA-I. Los procedimientos de disrupción celular son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos ejemplares de alteración de células incluyen, pero no se limitan a, procedimientos enzimáticos, sonicación, procedimientos con detergente y procedimientos mecánicos. En ciertos aspectos preferidos, ApoA-I se expresa en células de mamífero, preferiblemente células CHO, y se secreta en el medio de crecimiento. En estas realizaciones, ApoA-I se purificó a partir del medio libre de células aclarado. Se entenderá que, aunque se describen los procedimientos de purificación en detalle en este documento en relación con la ApoA-I, está dentro de la especialización en la técnica adaptar las condiciones de purificación de otras apolipoproteínas, así como a ApoA-I no humana, formas polimórficas, isoformas, variantes, mutantes y formas truncadas de ApoA-I u otras apolipoproteínas, dependiendo de las características de proteínas específicas que son fácilmente determinables por el experto en la materia (por ejemplo, peso molecular, punto isoelectrico, radio de Stokes, hidrofobicidad, estado multimérico, etc.).

Generalmente, los procedimientos de purificación comprenden las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene ApoA-I con una matriz de intercambio aniónico en condiciones tales que la ApoA-I no se une a la matriz; (b) filtrar la solución que contiene ApoA-I obtenida en la etapa (a) a través de una membrana que tiene un tamaño de poro suficiente para eliminar los virus o partículas virales; (c) hacer pasar el filtrado obtenido en la etapa (b) a través de una primera columna de cromatografía de fase inversa bajo condiciones tales que la ApoA-I se une a la matriz; (d) eluir a partir de la primera matriz de cromatografía de fase inversa un primer eluato que contiene de fase inversa de ApoA-I usando un gradiente de concentraciones crecientes de un disolvente orgánico; (e) pasar el primer eluato de fase inversa de ApoA-I de la etapa (d) a través de una segunda columna de cromatografía de fase inversa bajo condiciones tales que la ApoA-I se une a la matriz; y (f) eluir de la segunda matriz de cromatografía de fase inversa un segundo eluato de fase inversa que contiene ApoA-I usando un gradiente de concentraciones crecientes de un disolvente orgánico. El orden en que se realizan las etapas no es crítico. Como será evidente para la persona de experiencia en la técnica, son posibles una variedad de permutaciones en el orden de las etapas, algunas de las cuales se describen a continuación.

En ciertos aspectos, la solución que contiene ApoA-I se acondiciona antes de ponerla en contacto con una matriz de intercambio aniónico en la etapa (a). El acondicionamiento se realiza para ajustar el pH de la solución de proteína de manera que está en un intervalo donde ApoA-I no se une a la matriz de intercambio aniónico en la etapa (a) (es decir, la proteína no tiene una carga neta negativa y la etapa (a) se ejecute en modo negativo). En estos aspectos, el pH de la solución que contiene ApoA-I es de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, preferiblemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,6. En aspectos particulares, el pH es de aproximadamente 5,1 a aproximadamente 5,5. En todavía otros aspectos, el pH es aproximadamente 5,3. Los ajustes en el pH se pueden llevar a cabo mediante la adición de un ácido apropiado (por ejemplo, ácido clorhídrico) o base (por ejemplo, hidróxido de sodio), hasta obtener un pH dentro del intervalo deseado. En algunas realizaciones, la solución que contiene ApoA-I se filtra antes de la etapa de acondicionamiento para eliminar las células y restos celulares. En otras realizaciones, cuando una etapa de acondicionamiento está ausente, la solución que contiene ApoA-I se filtra opcionalmente antes de la etapa (a) para eliminar las células y restos celulares.

En algunas realizaciones, la etapa (a) de poner en contacto una solución que contiene ApoA-I con una matriz de intercambio aniónico se lleva a cabo haciendo pasar la solución de proteína a través de una columna de cromatografía. En estas realizaciones, la columna está llena hasta una altura de lecho de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 50 cm, preferiblemente de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 30 cm, y más preferiblemente a una altura de lecho de aproximadamente 20 cm. En ciertos aspectos, la columna se carga con una solución de proteína que comprende de aproximadamente 10 g a aproximadamente 50 g, tal como de aproximadamente 10 g a aproximadamente 30 g, tal como de aproximadamente 25 g a aproximadamente 35 g de ApoA-I por litro. En realizaciones particulares, la columna se carga con una solución de proteína que comprende hasta aproximadamente 32 g de ApoA-I por litro. En otras realizaciones, la etapa (a) se realiza en modo por lotes, es decir, mediante la adición de una matriz de intercambio aniónico a una solución de proteína en un matraz, mezcla durante un período de tiempo suficiente para que la unión de los contaminantes a la matriz y a continuación separación del material de la matriz de la solución de proteína, por ejemplo, por filtración o centrifugación. En ciertas realizaciones, la solución de proteína se filtra para eliminar las partículas en la solución antes de ponerla en contacto con la matriz de intercambio aniónico.

Las matrices de intercambio aniónico para uso en la etapa (a) de los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser cualquier matriz de intercambio aniónico conocida en la técnica. Las matrices de intercambio aniónico adecuadas incluyen, pero no se limitan a, Q-Sepharose FF, Q-Spherosil, DEAE-Sepharose FF, Q-celulosa,

DEAE-celulosa y Q-Sepharose. En una realización particular, la matriz de intercambio aniónico es Q-Sepharose FF (GE Healthcare). En ciertos aspectos, antes de contactar la solución de proteína en la etapa (a) con una matriz de intercambio aniónico, la matriz se equilibró en un tampón que tiene un pH dentro de los intervalos preferidos discutidos anteriormente de tal manera que la ApoA-I no se une a la matriz. Tampones útiles para equilibrar matrices de intercambio aniónico antes de la etapa (a) y para realizar la etapa (a) son conocidos por el experto en la materia. En realizaciones particulares, el tampón es TAMP A (fosfato de sodio 20 mM, pH 5,3).

En diversas realizaciones, la etapa (a) se utiliza para purificar ApoA-I con respecto a proteínas distintas de ApoA-I (por ejemplo, proteínas de la célula huésped), el ADN de la célula huésped y endotoxinas, que se unen a la matriz de intercambio aniónico y están por lo tanto separadas de ApoA-I, que no se une a la matriz en las condiciones de pH y de sal descritas anteriormente. En algunos aspectos, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, o al menos 90% o más de la cantidad de ApoA-I en la solución de partida se recupera de la etapa de intercambio de aniones.

En diversas realizaciones, los procedimientos de purificación comprenden una etapa (b) en el que la solución de ApoA-I de la etapa (a) se filtra utilizando un filtro con un tamaño de poro que es suficiente para atrapar los virus y partículas virales. Opcionalmente, la etapa (b) de filtración a través de una membrana para eliminar los virus o partículas virales se realiza después de la etapa (f) anterior, en lugar que después de la etapa (a). En ciertos aspectos, el pH del eluato de la matriz de intercambio aniónico se ajusta antes de la etapa de filtración de virus (b) mediante la adición de hidróxido de sodio u otra base adecuada. La solución que contiene ApoA-I de la etapa (a) se ajusta a un pH de aproximadamente 7,8 a aproximadamente 8,2. En un aspecto particular, la solución que contiene ApoA-I se ajusta a un pH de aproximadamente 8,0. El filtro usado en la etapa (b) puede ser cualquier filtro con un tamaño de poro apropiado para capturar un virus, por ejemplo, con un tamaño de poros de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 75 nm. En realizaciones particulares, el tamaño de poro del filtro es de aproximadamente 20 nm (por ejemplo, Planova 20N, Asahi Kasei Medical). El experto entenderá que la velocidad de flujo de la solución de proteína a través del filtro viral se determina por las propiedades de la solución (por ejemplo, su viscosidad, la concentración de partículas, etc.). Un caudal típico para la filtración viral es de aproximadamente 12,5 L/h/m<sup>2</sup>, sin embargo, la velocidad de flujo se puede ajustar mayor o menor para mantener una presión de filtro de 1 bar o menos. El filtrado de la etapa (b) contiene ApoA-I. En ciertos aspectos, la recuperación de ApoA-I de la etapa de filtración viral es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% o más de la cantidad de la ApoA-I en el eluato de intercambio aniónico de la etapa (a).

En realizaciones particulares, los procedimientos de purificación descritos en este documento comprenden una etapa (c) después de la etapa (b) en la que se pasa el filtrado de la etapa (b) a través de una primera columna de cromatografía de fase inversa bajo condiciones de tampón y de sal que permita que la apolipoproteína AI se una a la matriz. En estas realizaciones, la ApoA-I se purifica con respecto al ADN de la célula huésped, proteínas de la célula huésped, endotoxina y formas truncadas usando un gradiente de concentraciones crecientes de disolvente orgánico. La cromatografía de fase inversa se puede realizar utilizando una amplia variante de matrices conocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitado a medios basados en sílice, poliestireno o agarosa reticulada sobre las cuales se injertan ligandos hidrófobos C4 a C18. Las matrices hidrófobas disponibles comercialmente útiles en los procedimientos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a Butil Sepharose-FF, octil Sepharose-FF, Dianon HP20SS, C18 Hypersil y Source 30 RPC. En realizaciones particulares, la matriz utilizada en la etapa (c) es Source 30 RPC (GE Healthcare). En ciertos aspectos, la columna de cromatografía de fase a la inversa tiene una altura de lecho de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 50 cm, tal como de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 30 cm. En un aspecto particular, la columna de cromatografía de fase a la inversa tiene una altura de lecho de aproximadamente 25 cm.

En algunas realizaciones, la ApoA-I filtrada procedente de la etapa de filtración de virus (b) se carga en la columna de fase inversa a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 g ApoA-I, tal como a una concentración de aproximadamente 1,5 g a aproximadamente 5 g de ApoA-I, y más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 2,5 g a aproximadamente 3,5 g ApoA-I por litro. En un aspecto particular, la ApoA-I filtrada de la etapa (b) se carga en la columna de fase inversa en una concentración de aproximadamente 3,4 g de ApoA-I por litro. Las condiciones del tampón que se pueden utilizar para equilibrar la columna de fase inversa antes de cargar ApoA-I y para asegurar que la proteína se une a la columna durante la carga será fácilmente determinable por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el tampón equilibrado de la columna es un tampón fuerte que puede reducir el pH de la columna a aproximadamente 9,5. En ciertas realizaciones, el tampón de equilibrio es TAMP D (carbonato de amonio 20 mM). Preferiblemente, después del equilibrio, el filtrado que contiene ApoA-I de la etapa (b) (a un pH de aproximadamente 8,0) se carga en la columna a un caudal de aproximadamente 0,5 cm a aproximadamente 5,0 cm por minuto, tal como de aproximadamente 2,0 cm a aproximadamente 4,0 cm por minuto. En una realización particular, el filtrado que contiene ApoA-I se carga en la columna a una velocidad de flujo de aproximadamente 2,8 cm por minuto.

Después de que ApoA-I se una a la matriz de fase inversa en la etapa (c), la proteína se eluye en la etapa (d) por la exposición a un gradiente de concentraciones crecientes de disolvente orgánico en solución tampón, tal como de aproximadamente 35% a aproximadamente 50% acetonitrilo en tampón TAMP D. En algunos aspectos, se puede utilizar un gradiente lineal de aproximadamente 35% a aproximadamente 50% de acetonitrilo durante un período de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 minutos, tal como aproximadamente 70 minutos o más preferiblemente

de aproximadamente 80 minutos para eluir la ApoA-I de la columna. En ciertos aspectos, el gradiente lineal es seguido por unos 10 minutos de elución isocrática con acetonitrilo al 50%. Las condiciones exactas para eluir ApoA-I de la columna de fase inversa serán fácilmente determinables por el experto en la materia. En diversas realizaciones, aproximadamente el 60%, tal como aproximadamente 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente 75% o aproximadamente 80% o más de ApoA-I en la carga de la columna está presente en el eluato de la columna en la etapa (d).

En ciertos aspectos, los procedimientos de purificación descritos en este documento comprenden además tras la etapa (d) una etapa (e) de pasar el eluato de fase inversa de la apolipoproteína AI de la etapa (d) a través de una segunda columna de cromatografía de fase inversa con el fin de eliminar adicionalmente el ADN, las proteínas de la célula huésped y formas truncadas de ApoA-I de la proteína de longitud completa. Preferiblemente, el eluato de fase inversa de la etapa (d) se carga en la segunda columna de fase inversa bajo condiciones que permiten que la apolipoproteína AI se una a la matriz. La matriz de fase inversa para uso en la etapa (e) puede ser el mismo tipo de matriz o un tipo diferente de matriz que como se usa en la etapa (d). En realizaciones particulares, la matriz de fase inversa usada en la etapa (e) es una matriz de sílice C18, tal como una matriz Daisogel SP-300-BIO C18 (300 Å, 10 m; Daiso Co., Ltd.). Las condiciones del tampón que se pueden utilizar para equilibrar la columna C18 antes de cargar ApoA-I y para asegurar que la proteína se une a la columna durante la carga serán fácilmente determinables por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el tampón de equilibrado de la columna es un tampón fuerte que puede reducir el pH de la columna a aproximadamente 9,5. En ciertas realizaciones, el tampón de equilibrio es TAMP E (carbonato de amonio 100 mM). En diversas realizaciones, la columna de fase inversa usada en la etapa (e) de los procedimientos de purificación descritos en el presente documento tiene una altura de lecho de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 50 cm, tal como de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 30 cm. En realizaciones particulares, la columna de fase inversa usada en la etapa (e) tiene una altura de lecho de aproximadamente 25 cm.

En diversas realizaciones, el eluato de ApoA-I de la etapa (d) se carga en la columna de fase inversa C18 en una concentración de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g ApoA-I, tal como a una concentración de aproximadamente 1 g a aproximadamente 10 g de ApoA-I, y más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 4 g a aproximadamente 5 g de ApoA-I por litro. En realizaciones particulares, el eluato de ApoA-I de la etapa (d) se carga en la columna de C18 en una concentración de aproximadamente 4,7 g de ApoA-I por litro. Preferiblemente, después del equilibrio, el eluato que contenga ApoA-I de la etapa (d) se carga en la columna a una velocidad de flujo de aproximadamente 0,5 cm a aproximadamente 5,0 cm por minuto, tal como de aproximadamente 1,0 cm a aproximadamente 3,0 cm por minuto. En una realización particular, el filtrado que contiene ApoA-I se carga en la columna a una velocidad de flujo de aproximadamente 2,1 cm por minuto.

Después de que ApoA-I se una a la matriz de fase inversa en la etapa (e), la proteína se eluye en la etapa (f) usando un gradiente de concentraciones crecientes de disolvente orgánico en solución tampón, tal como de aproximadamente 40% a aproximadamente 50% de acetonitrilo en tampón TAMP E. En algunos aspectos, se utiliza un gradiente lineal de aproximadamente 40% a aproximadamente 50% de acetonitrilo para eluir la ApoA-I de la columna durante un periodo de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 minutos, tal como aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 60 minutos o aproximadamente 70 minutos. En realizaciones particulares, un gradiente lineal de aproximadamente 40% a aproximadamente 50% de acetonitrilo en tampón TAMP E durante un periodo de aproximadamente 60 minutos se usa para eluir la ApoA-I de la matriz de fase inversa. En ciertos aspectos, el gradiente lineal es seguido por unos 15 minutos de elución isocrática con acetonitrilo al 50%. Las condiciones exactas para eluir ApoA-I de la columna de fase inversa serán fácilmente determinables por el experto en la materia. En diversas realizaciones, aproximadamente el 60%, tal como aproximadamente 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente 75% o aproximadamente 80% o más de ApoA-I en la carga de la columna se recupera en el eluato de la columna en la etapa (f).

En ciertas realizaciones, el disolvente orgánico se elimina del eluato que contiene ApoA-I obtenido en la etapa (f) de los procedimientos descritos en el presente documento. La eliminación del disolvente puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, la concentración del eluato que contiene ApoA-I obtenido en la etapa (f) y diafiltración del concentrado en un tampón acuoso. En ciertas realizaciones, el eluato de la etapa (f) se concentra aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4,5 veces o aproximadamente 5 veces en comparación con el volumen de material eluido de la columna de fase inversa en la etapa (f). En una realización particular, el eluato se concentra aproximadamente 2,5 veces y a continuación se diafiltra frente a aproximadamente 10, 15, o 20, preferiblemente de 15 volúmenes de un tampón acuoso adecuado. Los tampones acuosos adecuados son conocidos en la técnica. Un tampón particularmente preferido es TAMP C (fosfato de sodio 3 mM, pH 8,0).

En algunas realizaciones el orden de las columnas de cromatografía se invierte.

Opcionalmente, después de la concentración y el intercambio de tampón, la solución acuosa de ApoA-I se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico en modo negativo (es decir, en condiciones en que la ApoA-I no se une a la matriz de intercambio aniónico) para eliminar el ADN residual y otros contaminantes

cargados negativamente, tales como proteínas de la célula huésped. (Etapa (g)). En algunas realizaciones, la etapa de intercambio aniónico se realiza en modo por lotes. En otras realizaciones, la etapa de intercambio aniónico se lleva a cabo por cromatografía en columna. Las matrices de intercambio aniónico adecuadas para su uso en el modo por lotes o en cromatografía de columna incluyen, pero no se limitan a, Q Sepharose-FF o cualquiera de las matrices de intercambio aniónico descritas anteriormente para su uso en la etapa (a). En aspectos particulares, la etapa de intercambio aniónico se lleva a cabo haciendo pasar la solución ApoA-I a través de una membrana de intercambio aniónico, tal como una membrana que tiene una gran área superficial y una carga catiónica fuerte, por ejemplo, Sartobind Q o Mustang Q. Preferiblemente, la etapa de intercambio aniónico se realiza usando una membrana de intercambio aniónico Mustang Q (Pall Life Sciences). En ciertos aspectos, el pH de la solución acuosa de ApoA-I se reduce a aproximadamente 5,5, a aproximadamente 6,0 o a aproximadamente 6,5 antes de esta etapa de intercambio aniónico usando cualquier ácido adecuado. En aspectos particulares, el pH de la solución acuosa de ApoA-I se reduce a aproximadamente 6,0 usando ácido fosfórico diluido. En realizaciones preferidas, la solución de ApoA-I se hace pasar a través de un cartucho Mustang Q aproximadamente a 12,5 L/m<sup>2</sup>/h.

En algunas realizaciones, el filtrado de la membrana de intercambio aniónico se concentra y opcionalmente se diafiltra para intercambiar el disolvente a uno que sea adecuado para el almacenamiento o para un procesamiento adicional de la ApoA-I, tales como complejando con lípidos, tal como se describe a continuación en la Sección 6.5.1 y/o formulación en composiciones farmacéuticas, tal como se describe a continuación en la Sección 6.6. Los tampones adecuados para el almacenamiento o el procesamiento posterior de ApoA-I son fácilmente determinables por el técnico experto. En realizaciones particulares, la ApoA-I purificada se intercambia en tampón de TAMP C. Cualquier membrana de ultrafiltración se puede utilizar en esta etapa, a condición de que la membrana tenga un corte de peso molecular que esté por debajo del peso molecular de ApoA-I de longitud completa madura, tal que permita el paso del tampón, pero no proteína. En realizaciones particulares, se utiliza una membrana de polietersulfona (por ejemplo, serie Filtron Omega) de 10.000 de corte de peso molecular nominal. Preferiblemente, la concentración de ApoA-I en la solución después de la ultrafiltración es de al menos 10 g/litro, al menos 12 g/litro, al menos 15 g/litro, al menos 20 g/litro, al menos 25 g/litro, al menos 30 g/litro, al menos 35 g/litro, al menos 40 g/litro, al menos 45 g/litro, o al menos 50 g/litro.

#### 5.1.5. Productos de apolipoproteína

La presente descripción también proporciona apolipoproteínas maduras de longitud completa sustancialmente puras. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustancialmente pura" se refiere a una proteína que es al menos 95% pura. En ciertas realizaciones, la proteína sustancialmente pura es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, al menos 99,5%, al menos 99,9% o 100% pura. En ciertos aspectos, el producto apolipoproteína sustancialmente puro producido por los procedimientos de purificación descritos en este documento es una solución incolora de clara a ligeramente opalescente libre de partículas visibles cuando se inspecciona visualmente utilizando una fuente de luz sobre un fondo blanco. En diversas realizaciones, una apolipoproteína sustancialmente pura obtenida o que puede obtenerse por los procedimientos descritos en la Sección 6.1.4 anterior, comprende cantidades bajas o no detectables de uno o más de ADN de células huésped, proteínas distintas de la apolipoproteína (por ejemplo, proteínas de la célula huésped), endotoxina, disolvente residual, así como una baja carga biológica (es decir, bajo número de microbios sobre o en la muestra), tal como se describe en más detalle a continuación. La pureza del producto de apolipoproteína se puede determinar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, la secuenciación N-terminal de Edman, MALDI-MS, electroforesis en gel, HPLC, y/o inmunoensayo.

En diversas realizaciones, el producto de la apolipoproteína sustancialmente pura obtenida por los procedimientos descritos en el presente documento es ApoA-I madura de longitud completa humano que tiene una masa que es de aproximadamente 28,1 kilodaltons. La masa de ApoA-I en el producto puede ser determinada por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, MALDI-MS. En diversas realizaciones, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos el 99% de la proteína ApoA-I en el producto es ApoA-I madura de longitud completa (por ejemplo, ApoA-I que comprende los aminoácidos 25 a 267 de la SEC ID NO: 1). En ciertos aspectos, el producto ApoA-I sustancialmente puro comprende aproximadamente 15% o menos, aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 4% o menos, aproximadamente 3% o menos, aproximadamente 2% o menos, o aproximadamente 1 % o menos en peso de isoformas de ApoA-I extendidas en N-terminal (por ejemplo, proApoA-I). Como se apreciará por el experto en la materia, cualquier ApoA-I extendida en N-terminal en el producto se convertirá rápidamente a ApoA-I madura en la sangre después de la administración. En diversas realizaciones, el producto ApoA-I comprende aproximadamente 25% o menos, aproximadamente 20% o menos, aproximadamente 15% o menos, aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 4% o menos, aproximadamente 3% o menos, aproximadamente 2% o menos, aproximadamente 1% o menos, aproximadamente 0,75% o menos, aproximadamente 0,5% o menos, aproximadamente 0,25% o menos, o aproximadamente 0,1% o menos en peso de las formas truncadas de ApoA-I. La cantidad de ApoA-I truncada o extendida se puede determinar, por ejemplo, mediante secuenciación N-terminal de Edman y/o MALDI-MS y/o mediante la ejecución y el rastreo de un gel de SDS-PAGE para determinar la relación de la intensidad del área de banda de ApoA-I purificada con respecto a la intensidad total de todas las bandas, si está presente. En diversas realizaciones, el producto ApoA-I comprende aproximadamente 20% o menos,

aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 4% o menos, aproximadamente 3% o menos, aproximadamente 2% o menos, aproximadamente 1% o menos, aproximadamente 0,75% o menos, aproximadamente 0,5% o menos, aproximadamente 0,25% o menos, o aproximadamente 0,1% o menos en peso de formas oxidadas de ApoA-I, en particular ApoA-I oxidada en posición Met<sub>112</sub> y/o Met<sub>148</sub>.

En ciertas realizaciones, la apolipoproteína sustancialmente pura producida por los procedimientos descritos en el presente documento comprende proteínas de la célula huésped en una cantidad que es menor que aproximadamente 100 ppm (por ejemplo, ng/mg), tal como menos de aproximadamente 75 ppm, menos de aproximadamente 50 ppm, menos de aproximadamente 40 ppm, menos de aproximadamente 30 ppm, menos de aproximadamente 20 ppm, o menos de aproximadamente 10 ppm. En realizaciones particulares, el producto de apolipoproteína sustancialmente puro comprende menos de aproximadamente 20 ppm de proteínas de la célula huésped. Más preferiblemente, el producto de apolipoproteína comprende menos de aproximadamente 10 ppm de proteínas de la célula huésped. La presencia y cantidad de proteínas de células huésped en una muestra de apolipoproteína se pueden determinar por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Cuando la apolipoproteína se produce de forma recombinante en, por ejemplo, células de mamífero, se pueden utilizar kits comercialmente disponibles de ELISA (por ejemplo, Kit F015 de Cygnus Technologies) para detectar y cuantificar los niveles de proteínas de células huésped.

En algunos aspectos, el producto de apolipoproteína sustancialmente puro purificado como se describe en el presente documento comprende ADN de la célula huésped en una cantidad que es inferior a aproximadamente 50 pg/mg de la apolipoproteína, tal como menos de aproximadamente 40 pg/mg, menos de aproximadamente 30 pg/mg, menos de aproximadamente 20 pg/mg, menos de aproximadamente 10 pg/mg, o menos de aproximadamente 5 pg/mg de apolipoproteína. En realizaciones preferidas, el producto de apolipoproteína sustancialmente puro comprende menos de aproximadamente 10 pg de proteínas de células huésped por mg de apolipoproteína. La presencia y la cantidad de ADN de la célula huésped en una muestra de apolipoproteína se pueden determinar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo PCR de tiempo real o detección de complejos con proteína de unión de cadena simple utilizando un anticuerpo anti-SSB (Glycotype Biotechnology), preferiblemente por PCR cuantitativa.

En ciertas realizaciones, el producto de la apolipoproteína sustancialmente puro producido por los procedimientos descritos en el presente documento comprende la endotoxina en una cantidad que es menor que aproximadamente 0,5 UE por mg de la apolipoproteína, tal como menos de aproximadamente 0,4 UE por mg, menos de aproximadamente 0,3 UE por mg, menos de aproximadamente 0,2 UE por mg o menos de aproximadamente 0,1 UE por mg de apolipoproteína. Preferiblemente, el producto de la apolipoproteína sustancialmente puro descrito en este documento comprende menos de aproximadamente 0,1 EU de endotoxina por mg de apolipoproteína. La detección y cuantificación de la endotoxina se puede lograr por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo usando la prueba cualitativa de lisado de amebocitos de Limulus (LAL) para endotoxinas bacterianas gram-negativas. (Cambrex; sensibilidad 0,125 UE/ml).

El producto apolipoproteína sustancialmente puro descrito en este documento tiene una carga biológica baja. El término "carga biológica" se refiere al nivel de bacterias aerobias, bacterias anaerobias, levaduras y mohos en el producto. En diversas realizaciones, la carga biológica del producto de apolipoproteína sustancialmente puro purificado como se describe en el presente documento es inferior a aproximadamente 1 UFC por ml. Las pruebas de carga biológica pueden realizarse de acuerdo con cualquier procedimiento conocido, por ejemplo de acuerdo con la Farmacopea Europea Capítulo 2.6.12.B, 2.6.1 y el procedimiento armonizado USB Capítulo 61.

El producto de apolipoproteína sustancialmente puro descrito en este documento comprende bajas cantidades de disolventes residuales. En realizaciones particulares, el disolvente residual está presente en una cantidad que es menor que aproximadamente 50 ppm, menos de aproximadamente 45 ppm, menos de aproximadamente 40 ppm, menos de aproximadamente 35 ppm, menos de aproximadamente 30 ppm, menos de aproximadamente 25 ppm, menos de aproximadamente 20 ppm, menos de aproximadamente 15 ppm o menos de aproximadamente 10 ppm de 10 mg/litro de la apolipoproteína. Preferiblemente, el disolvente residual está presente en una cantidad que es menor que aproximadamente 41 ppm de 10 mg/litro de la apolipoproteína. La cantidad de disolvente residual puede ensayarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, GC-MS y HPLC.

Preferiblemente, la apolipoproteína es ApoA-I (por ejemplo, ApoA-I que comprende los aminoácidos 25-267 de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la proteína ApoA-I humana madura tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un ácido aspártico en la posición 1 (es decir, la posición correspondiente a la posición 25 de la SEQ ID NO: 1).

## 5.2. La fracción lipídica

Los complejos de lipoproteínas y composiciones de la presente descripción comprenden una fracción de lípidos. La fracción lipídica incluye uno o más lípidos. En diversas realizaciones, uno o más lípidos pueden ser lípidos saturados y/o insaturados, y lípidos naturales o sintéticos. La fracción lipídica incluye preferiblemente al menos un fosfolípido.

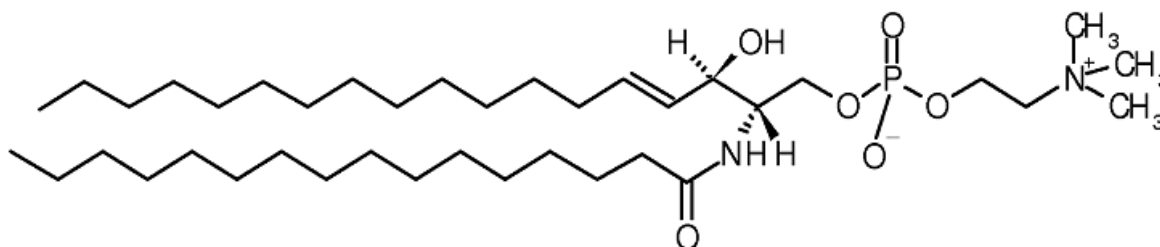
Los lípidos adecuados que pueden estar presentes en la fracción de lípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos de cadena de alquilo pequeña, fosfatidilcolina de huevo, fosfatidilcolina de soja, dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina, 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, dioleofosfatidiletanolamina dioleoilfosfatidilcolina, dilaurilfosfatidilglicerol fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol tales como dimiristoilfosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilglicerol, diestearoilfosfatidilglicerol, dioleoilfosfatidilglicerol, ácido dimiristoilfosfatídico, ácido dipalmitoilfosfatídico, dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidilserina, dipalmitoilfosfatidilserina, fosfatidilserina del cerebro, esfingomielina de cerebro, esfingomielina de huevo, esfingomielina de leche, palmitoil esfingomielina, fitoesfingomielina, dipalmitoilesfingomielina, diestearoilesfingomielina, sal de dipalmitoilfosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, dilaurilfosfatidilcolina, (1,3)-D-manosil-(1,3)diglicérido, aminofenilglucósido, glicolípidos de 3-colesterol-6'-(glicosil)io) hexil éter, y colesterol y sus derivados. Los lípidos sintéticos, tales como palmitoilesfingomielina sintético o N-palmitoil-4-hidroxi esfingomielina-1-fosfocolina (una forma de fitoesfingomielina) se pueden utilizar para minimizar la oxidación de los lípidos. Las fracciones de fosfolípidos que incluyen palmitoilesfingomielina pueden incluir opcionalmente pequeñas cantidades de cualquier tipo de lípidos, incluyendo, pero no limitado a lisofosfolípidos, esfingomielinas distintas de palmitoilesfingomielina, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, glicéridos, triglicéridos, y colesterol y sus derivados.

En realizaciones preferidas, la fracción lipídica incluye dos tipos de fosfolípidos: una esfingomielina (SM) y un fosfolípido cargado negativamente. SM es un fosfolípido "neutro" en que tiene una carga neta de aproximadamente cero a pH fisiológico. La identidad de la SM utilizada no es crítica para el éxito. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "SM" incluye esfingomielinas derivadas u obtenidas de fuentes naturales, así como análogos y derivados de las SM de origen natural que son impermeables a la hidrólisis por la LCAT, ya que es SM de origen natural. La SM es un fosfolípido muy similar en estructura a la lecitina, pero, a diferencia de lecitina, no tiene una cadena principal de glicerol, y por lo tanto no tiene enlaces éster que unan las cadenas de acilo. Más bien, SM tiene un esqueleto de ceramida, con enlaces amida que unen las cadenas de acilo. SM no es un sustrato para LCAT, y generalmente no se puede hidrolizar por ella. Puede actuar, sin embargo, como un inhibidor de LCAT o puede disminuir la actividad de LCAT mediante la dilución de la concentración del fosfolípido sustrato. Debido a que SM no se hidroliza, permanece en la circulación más tiempo. Se espera que esta característica permitirá que los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente descritos en este documento tengan una mayor duración del efecto farmacológico (movilización de colesterol) y recojan más lípidos, en particular, colesterol, que complejos de apolipoproteína que no incluyen SM. Este efecto puede dar lugar a dosis menos frecuentes o más pequeñas necesarias para el tratamiento que las necesarias para complejos de lipoproteínas que no incluyen SM.

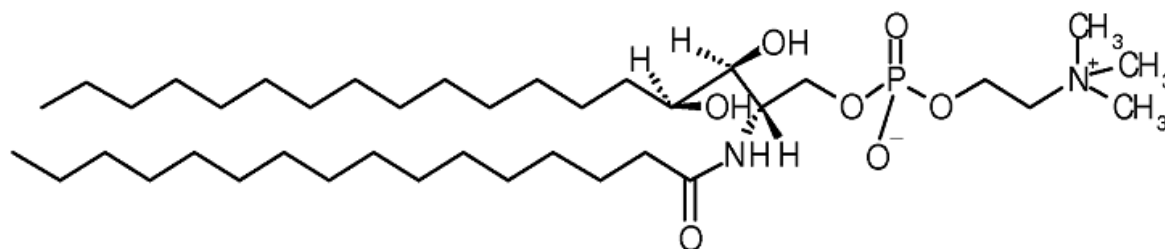
La SM se puede obtener a partir de prácticamente cualquier fuente. Por ejemplo, la SM se puede obtener de la leche, huevo o el cerebro. Los análogos o derivados de SM también se pueden utilizar. Los ejemplos no limitantes de análogos y derivados útiles de SM incluyen, pero no se limitan a, palmitoilesfingomielina, N-palmitoil-4-hidroxi esfingomielina-1-fosfocolina (una forma de fitoesfingomielina), palmitoilesfingomielina, estearoilesfingomielina, D-eritro-N-16:0-esfingomielina y su isómero dihidro, D-eritro-N-16:0-dihidro-esfingomielina. Las SM sintéticas, tales como palmitoilesfingomielina sintética o N-palmitoil-4-hidroxi esfingomielina-1-fosfocolina (fitoesfingomielina) se pueden utilizar con el fin de producir complejos más homogéneos y con menos contaminantes y/o productos de oxidación que los esfingolípidos de origen animal.

Las esfingomielinas de ejemplo palmitoilesfingomielina y fitoesfingomielina se muestran a continuación.

## Palmitoil SM



## Fito-SM



Las esfingomielinas aisladas de fuentes naturales pueden ser enriquecidas artificialmente en una cadena de acilo saturado o insaturado particular. Por ejemplo, la esfingomielina de leche (Avanti Phospholipid, Alabaster, Ala.) se caracteriza por cadenas de acilo larga saturadas (es decir, las cadenas de acilo que tienen 20 o más átomos de carbono). En cambio, la esfingomielina de huevo se caracteriza por cadenas de acilo cortas saturadas (es decir, las cadenas de acilo que tienen menos de 20 átomos de carbono). Por ejemplo, aunque sólo aproximadamente el 20% de esfingomielina de leche comprende cadenas de acilo C16:0 (16 carbonos, saturado), alrededor del 80% de esfingomielina de huevo comprende cadenas de acilo C16:0. Usando la extracción con disolvente, la composición de esfingomielina de leche puede enriquecerse para tener una composición de cadena de acilo comparable a la de esfingomielina de huevo, o viceversa.

La SM puede ser semi-sintética, de manera que tiene cadenas de acilo particulares. Por ejemplo, la esfingomielina de leche puede ser purificada primero a partir de leche, a continuación, una cadena de acilo particular, por ejemplo, la cadena de acilo C16:0 puede escindirse y reemplazarse por otra cadena de acilo. La SM también puede ser totalmente sintetizada, por ejemplo, la síntesis a gran escala. Véase, por ejemplo, Dong et al, Patente de Estados Unidos. No. 5.220.043, titulada Síntesis de D-eritro-esfingomielinas, publicada el 15 de junio de 1993; Weis, 1999, Chem. Phys. Lipids 102 (1-2): 3-12.

Las longitudes y niveles de saturación de las cadenas de acilo que comprenden una SM semi-sintética o sintética pueden variar selectivamente. Las cadenas de acilo pueden ser saturadas o insaturadas, y pueden contener de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 átomos de carbono. Cada cadena puede contener el mismo número de átomos de carbono o, alternativamente cada cadena puede contener diferentes números de átomos de carbono. En algunas realizaciones, la SM semi-sintética o sintética comprende cadenas de acilo mixtas de tal manera que una cadena está saturada y una cadena está insaturada. En tales SM de cadenas acilo mixtas, las longitudes de cadena pueden ser las mismas o diferentes. En otras realizaciones, las cadenas de acilo de la SM semi-sintética o sintética son ambas saturadas o insaturadas. Una vez más, las cadenas pueden contener los mismos o diferentes números de átomos de carbono. En algunas realizaciones, ambas cadenas de acilo que comprenden la SM semi-sintética o sintética son idénticas. En una realización específica, las cadenas corresponden a las cadenas de acilo de un ácido graso de origen natural, tales como por ejemplo ácido oleico, palmítico o ácido esteárico. En otra realización, se utiliza SM con cadenas funcionalizadas saturados o insaturadas. En otra realización específica, ambas cadenas de acilo están saturadas y contienen de 6 a 24 átomos de carbono. Ejemplos no limitantes de cadenas de acilo presentes en ácidos grasos habituales que se pueden incluir en SM semi-sintéticas y sintéticas se proporcionan en la Tabla 1, a continuación:

| Tabla 1                           |                                            |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|
| Longitud:Número de insaturaciones | Nombre común                               |
| 14:0                              | Ácido mirístico                            |
| 16:0                              | Ácido palmítico                            |
| 18:0                              | Ácido esteárico                            |
| 18:1 cis $\Delta^9$               | Ácido oleico                               |
| 18:2 cis $\Delta^{9,12}$          | Ácido linoleico                            |
| 18:3 cis $\Delta^{9,12,15}$       | Ácido linolénico                           |
| 20:4 cis $\Delta^{5,8,11,14}$     | Ácido araquidónico                         |
| 20:5 cis $\Delta^{5,8,11,14,17}$  | ácido eicosapentaenoico (un ácido omega-3) |

En realizaciones preferidas, el SM es palmitoil SM, tales como palmitoil SM sintética, que tiene cadenas de acilo C16:0, o es SM de huevo, que incluye como principal componente SM palmitoil.

En una realización específica, se usa SM funcionalizada, tal como una fitoesfingomielina.

La fracción lipídica incluye preferiblemente un fosfolípido cargado negativamente. Como se usa en este documento, "fosfolípidos cargados negativamente" son fosfolípidos que tienen una carga neta negativa a pH fisiológico. El fosfolípido cargado negativamente puede comprender un solo tipo de fosfolípido cargado negativamente, o una mezcla de dos o más fosfolípidos diferentes, con carga negativa. En algunas realizaciones, los fosfolípidos cargados negativamente son glicerofosfolípidos cargados negativamente. Las identidades de los fosfolípidos cargados no son críticas para el éxito. Los ejemplos específicos de fosfolípidos cargados negativamente adecuados incluyen, pero no se limitan a, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)], un fosfatidilglicerol, un fosfatidilinositol, una fosfatidilserina, y un ácido fosfatídico. En algunas realizaciones, el fosfolípido cargado negativamente comprende uno o más de fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y/o ácido fosfatídico. En una realización específica, el fosfolípido cargado negativamente se consiste en 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3- [fosfo-rac-(1-glicerol)], o DPPG.

Al igual que la SM, los fosfolípidos cargados negativamente se pueden obtener de fuentes naturales o prepararse por síntesis química. En realizaciones que emplean fosfolípidos cargados negativamente sintéticos, las identidades de las cadenas de acilo puede ser variada selectivamente, como se discutió anteriormente en relación con SM. En algunas realizaciones de los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente descritos en este documento, ambas cadenas de acilo en los fosfolípidos cargados negativamente son idénticas. En algunas realizaciones, las cadenas de acilo en la SM y los fosfolípidos cargados negativamente son todas idénticas. En una realización específica, el fosfolípido o fosfolípidos cargados negativamente y/o SM todos tienen cadenas de acilo C16:0 o C16:1. En una realización específica, el resto de ácido graso de la SM es predominantemente palmitoil C16:1. En una realización específica, las cadenas acilo del fosfolípido o fosfolípidos cargados y/o SM corresponden a la cadena de acilo de ácido palmítico.

Los fosfolípidos utilizados son preferiblemente al menos 95% puros, y/o han reducido los niveles de agentes oxidantes. Los lípidos obtenidos de fuentes naturales tienen preferiblemente menos restos de ácidos grasos poliinsaturados y/o restos de ácidos grasos que no son susceptibles a la oxidación. El nivel de oxidación en una muestra se puede determinar utilizando un procedimiento yodométrico, que proporciona un valor de peróxido, expresado en número de miliequivalentes de yodo aislados por kg de muestra, abreviado meq O/kg. Véase, por ejemplo, Gray, JI, Measurement of lipid oxidation: A Review, revista de la American Oil Chemists Society, vol. 55, p. 539-545 (1978); Heaton, FW y Uri N., Improved Iodometric Methods for the Determination of Lipid Peroxides, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol 9. P, 781-786 (1958). Preferiblemente, el nivel de oxidación, o el nivel de peróxido, es bajo, por ejemplo, menos de 5 meq O/kg, menos de 4 meq O/kg, menos de 3 meq O/kg, o menos de 2 meq O/kg.

Las fracciones de lípidos que incluyen SM y palmitoil-fingomielina pueden incluir opcionalmente pequeñas cantidades de lípidos adicionales. Prácticamente cualquier tipo de lípido se puede usar, incluyendo, pero no limitado a, lisofosfolípidos, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, glicéridos, triglicéridos, y colesterol y sus derivados.

Cuando se incluyen, tales lípidos opcionales comprenderán de forma típica menos de aproximadamente 15% en peso de la fracción lipídica, aunque en algunos casos se podrían incluir más lípidos opcionales. En algunas realizaciones, los lípidos opcionales comprenden menos de aproximadamente 10% en peso, menos de aproximadamente 5% en peso, o menos de aproximadamente 2% en peso. En algunas realizaciones, la fracción de lípidos no incluye lípidos opcionales.

En una realización específica, la fracción de fosfolípidos contiene SM de huevo o palmitoil SM o fiteosfingomielina y DPPG en una relación en peso (SM:fosfolípido cargado negativamente) en el intervalo de 90:10 a 99:1, más preferiblemente que varía de 95:5 a 98:2. En una realización, la relación en peso es 97: 3.

Los complejos de lipoproteínas de la presente descripción también se pueden utilizar como portadores para suministrar agentes activos hidrófobos, lipófilos o apolares para una variedad de aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Para tales aplicaciones, la fracción lipídica puede incluir además uno o más agentes activos hidrófobos, lipófilos o apolares, incluyendo pero no limitado a los ácidos grasos, fármacos, ácidos nucleicos, vitaminas, y/o nutrientes. Los agentes activos hidrófobos, lipófilos o apolares adecuados no están limitados por categoría terapéutica, y pueden ser, por ejemplo, analgésicos, agentes anti-inflamatorios, antihelmínticos, agentes anti-arritmicos, agentes antibacterianos, agentes antivirales, anti-coagulantes, antidepresivos, antidiabéticos, antiepilépticos, agentes antifúngicos, agentes anti-gota, agentes anti-hipertensivos, agentes anti-migraña, agentes contra la malaria, agentes anti-muscarínicos, agentes anti-neoplásicos, agentes de mejora de la disfunción eréctil, inmunosupresores, agentes antiprotazoarios, agentes antitiroideos, agentes ansiolíticos, sedantes, hipnóticos, neurolépticos, beta bloqueantes, agentes inotrópicos cardíacos, corticosteroides, diuréticos, agentes anti-parkinsonianos, agentes gastrointestinales, antagonistas de los receptores de histamina, queratolíticos, agentes reguladores de lípidos, agentes antianginosos, inhibidores de COX-2, inhibidores de los leucotrienos, macrólidos, relajantes musculares, agentes nutricionales, ácidos nucleicos (por ejemplo, pequeños ARNs de interferencia), analgésicos opioides, inhibidores de proteasa, hormonas sexuales, estimulantes, relajantes musculares, agentes anti-osteoporosis, agentes antiobesidad, potenciadores de la cognición, agentes anti-incontinencia urinaria, aceites nutricionales, agentes anti-hipertrofia de próstata benigna, ácidos grasos esenciales, ácidos grasos no esenciales, y mezclas de los mismos.

Ejemplos específicos no limitativos de agentes activos hidrófobos, lipófilos o apolares adecuados son: acetretina, albendazol, albuterol, aminoglutetimida, amiodarona, amlodipina, anfetamina, anfotericina B, atorvastatina, atovacuona, azitromicina, baclofeno, beclometasona, benezepril, benzonatato, betametasona, bicalutanida, budesonida, bupropion, busulfán, butenafina, calcifediol, calcipotriol, calcitriol, camptotecina, candesartán, capsaicina, carbamazepina, carotenos, celecoxib, cerivastatina, cetirizina, clorfeniramina, colecalciferol, cilostazol, cimetidina, cinarizina, ciprofloxacina, cisaprida, claritromicina, clemastina, clomifeno, clomipramina, clopidogrel, codeína, la coenzima Q10, ciclobenzaprina, ciclosporina, danazol, dantroleno, dexclorfeniramina, diclofenaco, dicumarol, digoxina, dehidroepiandrosterona, dihidroergotamina, dihidrotaquisterol, diritromicina, donepezilo, efavirenz, eposartan, ergocalciferol, ergotamina, fuentes de ácidos grasos esenciales, etodolaco, etopósido, famotidina, fenofibrato, fentanilo, fexofenadina, finasteride, fluconazol, flurbiprofeno, fluvastatina, fosfenitoína, frovatriptán, furazolidona, gabapentina, gemfibrozil, glibenclamida, glipizida, gliburida, glimepirida, griseofulvina, halofantrina, ibuprofeno, irbesartán, irinotecán, dinitrato de isosorbida, isotretinoína, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, ketorolac, lamotrigina, lansoprazol, leflunomida, lisinopril, loperamida, loratadina, lovastatina, L-tiroxina, luteína, licopeno, medroxiprogesterona, mifepristona, mefloquina, acetato de megestrol, metadona, metoxsalen, metronidazol, miconazol, midazolam, miglitol, minoxidil, mitoxantrona, montelukast, nabumetona, nalbufina, naratriptán, nelfinavir, nifedipino, nilsolidipina, nilutanida, nitrofurantoína, nizatidina, omeprazol, oprelvekin, estradiol, oxaprozina, paclitaxel, paracalcitol, paroxetina, pentazocina, pioglitazona, pizofetin, pravastatina, prednisolona, probucol, progesterona, pseudoefedrina, piridostigmina, rabeprazol, raloxifeno, rofecoxib, repaglinida, rifabutina, rifapentina, rimexolona, ritanovir, rizatriptán, rosiglitazona, saquinavir, sertralina, sibutramina, citrato de sildenafil, simvastatina, sirolimus, espironolactona, sumatriptán, tacrina, tacrolimus, tamoxifeno, tamsulosina, targretina, tazarteno, telmisartan, tenipósido, terbinafina, terazosina, tetrahidrocannabinol, tiagabina, ticlopidina, tirofibrin, tizanidina, topiramato, topotecán, toremifeno, tramadol, tretinoína, troglitazona, trovafloxacina, ubidecarenona, valsartán, venlafaxina, verteporfina, vigabatrina, vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, zafirlukast, zileuton, zolmitriptán, zolpidem y zopiclona. También se pueden utilizar sales, isómeros y derivados de los agentes enumerados anteriormente, así como mezclas.

### 5.3. Complejos de lipoproteínas

La presente descripción menciona complejos de lipoproteínas que comprenden una fracción de proteínas y una fracción de lípidos, la composición de cada uno de los cuales se ha descrito anteriormente en las Secciones 5.1 y 5.2, respectivamente.

Generalmente, la fracción de proteína incluye una o más proteínas de unión a lípidos, tal como una apolipoproteína y/o derivado o análogo de la misma que proporciona un beneficio terapéutico y/o profiláctico. Los complejos pueden incluir un único tipo de proteína de unión a lípidos, o mezclas de dos o más diferentes proteínas de unión a lípidos, que se pueden derivar de las mismas o diferentes especies. Las proteínas de unión a lípidos adecuados se describen anteriormente en la Sección 6.1. Aunque no es necesario, los complejos de lipoproteínas comprenderán preferiblemente proteínas de unión a lípidos que derivan de, o corresponden en secuencia de aminoácidos a, la especie animal a tratar, a fin de evitar la inducción de una respuesta inmunitaria a la terapia. Por lo tanto, para el tratamiento de pacientes humanos, las proteínas de unión a lípidos de origen humano se utilizan preferiblemente en los complejos de la descripción. El uso de apolipoproteínas miméticas de péptidos también pueden reducir o evitar una respuesta inmunitaria.

Se cree que el uso de apolipoproteína que tiene un alto grado de pureza (por ejemplo, madura y no truncada, oxidada, desamidada, contaminada con endotoxina y/o contaminada con otras proteínas o con ácidos nucleicos) mejora la potencia terapéutica y/o mejora la seguridad del complejo de lipoproteínas. Por consiguiente, la fracción de proteína puede comprender al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99 % de ApoA-I madura, de longitud completa, opcionalmente, que tiene no más de 25%, no más de 20%, no más de 15%, no más de 10%, no más de 5%, o aproximadamente 0% de metionina-112 o metionina-148 oxidadas, y/o no más de 15%, no más de 10%, no más de 5%, o aproximadamente 0% de aminoácidos desaminados. La apolipoproteína se puede purificar de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. Preferiblemente, la apolipoproteína se puede producir como se describe en la Sección 5.1.4.

En una realización específica, la fracción de proteína comprende o consiste esencialmente en ApoA-I, por ejemplo, ApoA-I sustancialmente pura madura, de longitud completa, como se describe anteriormente en la Sección 5.1.5.

La fracción lipídica incluye uno o más lípidos, que pueden ser lípidos saturados, insaturados, naturales y sintéticos y/o fosfolípidos. Los lípidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos de cadena de alquilo pequeña, fosfatidilcolina de huevo, fosfatidilcolina de soja, dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina, 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina, dilauroilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol tales como dimiristoilfosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilglicerol, diestearoilfosfatidilglicerol, dioleoilfosfatidilglicerol, ácido dimiristoilfosfatídico, ácido dipalmitoilfosfatídico, dimiristoilfosfatidiletanolamina,

dipalmitoilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidilserina, dipalmitoilfosfatidilserina, fosfatidilserina del cerebro, esfingomielina de cerebro, esfingomielina de huevo, esfingomielina de leche, palmitoil esfingomielina, fitoesfingomielina, dipalmitoilesfingomielina, diestearoilesfingomielina, sal de dipalmitoilfosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, dilaurilfosfatidilcolina, (1,3)-D-manosil-(1,3)diglicérido, aminofenilglucósido, glicolípidos de 3-colesterol-6'-(glicosilto) hexil éter, y colesterol y sus derivados. Las fracciones de fosfolípidos que incluyen SM y palmitoilesfingomielina pueden incluir opcionalmente pequeñas cantidades de cualquier tipo de lípidos, incluyendo, pero no limitado a, lisofosfolípidos, esfingomielinas distinto palmitoilesfingomielina, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, glicéridos, triglicéridos, y colesterol y sus derivados. Se prefieren lípidos sintéticos, tales como palmitoil esfingomielina sintética o N-palmitoil-4-hidroxisfinganina-1-fosfocolina (fitoesfingomielina). Otros lípidos se describen anteriormente en la Sección 6.2. Preferiblemente, los complejos de lipoproteínas comprenden esfingomielina.

Opcionalmente, los complejos de lipoproteínas de la presente descripción pueden estar cargados con agentes activos hidrófobos, lipófilos o apolares, incluyendo pero no limitados a ácidos grasos, fármacos, ácidos nucleicos, vitaminas y/o nutrientes, para una variedad de aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Los agentes adecuados se describen anteriormente en la Sección 5.2.

Los complejos de lipoproteínas se pueden producir usando cualquiera de los procedimientos descritos en este documento. Preferiblemente, los complejos se producen como se describe en las secciones 5.5.1 a 5.5.4.

La relación molar de la fracción lipídica con respecto a la fracción de proteína de los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente descritos en este documento puede variar, y dependerá de, entre otros factores, de la identidad o identidades de la apolipoproteína que comprende la fracción de proteína, las identidades y cantidades de los fosfolípidos cargados que comprenden la fracción lipídica, y el tamaño deseado del complejo de lipoproteínas cargadas. Debido a que la actividad biológica de apolipoproteínas, tales como ApoA-I, se cree que es mediada por las hélices anfipáticas que comprenden la apolipoproteína, es conveniente expresar la fracción de apolipoproteína de la relación molar lípido:apolipoproteína usando equivalentes de proteína ApoA-I. En general se acepta que la ApoA-I contiene 6-10 hélices anfipáticas, dependiendo del procedimiento utilizado para calcular las hélices. Otras apolipoproteínas se pueden expresar en términos de equivalentes de ApoA-I en función del número de hélices anfipáticas que contienen. Por ejemplo, ApoA-<sub>IM</sub>, que típicamente existe como un dímero con puentes disulfuro, se puede expresar como 2 equivalentes ApoA-I, ya que cada molécula de ApoA-<sub>IM</sub> contiene el doble de hélices anfipáticas que una molécula de ApoA-I. A la inversa, una apolipoproteína de péptido que contiene una sola hélice anfipática se puede expresar como un 1/10-1/6 equivalentes de ApoA-I, debido a que cada molécula contiene de 1/10-1/6 tantas hélices anfipáticas como una molécula de ApoA-I. En general, la relación molar lípido:equivalente de ApoA-I de los complejos de lipoproteínas (definido en el presente documento como "Ri") estará en el intervalo de aproximadamente 105:1 a 110:1. En algunas realizaciones, el Ri es de aproximadamente 108:1. Las proporciones en peso se pueden obtener usando un PM de aproximadamente 650-800 para fosfolípidos.

En algunas realizaciones, la relación molar de lípido:equivalentes de ApoA-I ("RSM") varía de aproximadamente 80:1 a aproximadamente 110:1, por ejemplo, de aproximadamente 80:1 a aproximadamente 100: 1. En un ejemplo específico, la RSM para complejos de lipoproteínas puede ser de aproximadamente 82:1.

Las diversas moléculas de apolipoproteína y/o fosfolípidos que comprenden los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente se pueden marcar con cualquier marcador detectable conocido en la técnica, incluyendo isótopos estables (por ejemplo, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>2</sup>H, etc.); isótopos radiactivos (por ejemplo, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, etc.); fluoróforos; agentes de quimioluminiscencia; o marcadores enzimáticos.

En realizaciones preferidas, los complejos de lipoproteínas son complejos de lipoproteínas cargados negativamente que comprenden una fracción de proteína que es preferiblemente ApoA-I madura, de longitud completa, y una fracción lipídica que comprende un fosfolípido neutro, esfingomielina (SM), y el fosfolípido cargado negativamente.

Se ha descubierto que la composición y las cantidades relativas de SM y el fosfolípido cargado negativamente que comprende la fracción lipídica de complejos de lipoproteínas afectan a la homogeneidad y la estabilidad de composiciones que comprenden los complejos. Como se ilustra en la sección de ejemplos, las composiciones que comprenden complejos en los que la fracción lipídica se compone de SM y el fosfolípido cargado negativamente son más homogéneas, y más estables que las composiciones similares en las que la fracción lipídica incluye DPPC además de SM.

Por lo tanto, los complejos de la presente descripción que contienen SM y el lípido cargado negativamente se forman preferiblemente en ausencia de una lecitina con el fin de mejorar su homogeneidad y estabilidad. Una vez que se forman complejos homogéneos que contienen SM y lípidos cargados negativamente, pueden incorporarse lípidos adicionales tales como la lecitina.

Cuando se incluyen, los lípidos opcionales comprenderán de forma típica menos de aproximadamente 15% de la fracción de lípidos, aunque en algunos casos se podrían incluir más lípidos opcionales. En algunas realizaciones, los lípidos opcionales comprenden aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, o menos de

aproximadamente 2% en peso. En algunas realizaciones, la fracción lipídica de los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente no incluye lípidos opcionales.

En una realización específica, la fracción de fosfolípidos contiene SM de huevo o palmitoil SM o fitoSM y DPPG en una relación en peso (SM: fosfolípido cargado negativamente) en el intervalo de 90:10 a 99:1, más preferiblemente que varían de 95:5 a 98:2, por ejemplo, 97:3.

Algunas apolipoproteínas se intercambian in vivo de un complejo de lipoproteínas a otro (esto es cierto para la apolipoproteína ApoA-I). Durante el curso de este intercambio, la apolipoproteína normalmente lleva consigo una o más moléculas de fosfolípidos. Debido a esta propiedad, se espera que los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente descritos en este documento "sembrarán" fosfolípidos cargados negativamente a HDL endógeno, transformándolos así en partículas alfa que son más resistentes a la eliminación por los riñones. Por lo tanto, se espera que la administración de los complejos y composiciones de lipoproteínas cargadas negativamente descritos en este documento aumentará los niveles séricos de HDL, y/o alterarán la vida media de HDL endógena, así como el metabolismo de HDL endógena. Se espera que esto dará lugar a la alteración del metabolismo del colesterol y el transporte invertido de lípidos.

Como se ilustra en la sección de ejemplos, las composiciones que comprenden complejos en los que la relación en peso de ApoA-I:SM y fosfolípido DPPG es aproximadamente 1:2,7 eran más homogéneas y más estables que las composiciones similares con otras relaciones peso:peso. Por consiguiente, la presente descripción menciona composiciones de lipoproteínas en las que la proporción en peso de proteína:lipídios está optimizada para la formación de una población homogénea de los complejos. Esta relación peso:peso varía de 1:2,6 a 1:3, y es óptimamente 1:2,7, para complejos de ApoA-I, SM, y DPPG, y para los complejos de componentes de masa molecular similar. En realizaciones específicas, la relación de fracción de proteína ApoA-I con respecto a la fracción de lípidos varía típicamente de aproximadamente 1:2,7 a aproximadamente 1:3, prefiriéndose 1:2,7. Esto corresponde a relaciones molares de proteína ApoA-I a fosfolípido que varía de aproximadamente 1:90 a 1:140. Por consiguiente, la presente descripción menciona complejos en los que la proporción de proteína a lípido molar es de aproximadamente 1:90 a aproximadamente 1:120, de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:140, o de aproximadamente 1:95 a aproximadamente 1:125. Específicamente en esta relación optimizada, la fracción de proteínas ApoA-I y la fracción de lípidos con SM y DPPG forman complejos sustancialmente homogéneos con las mismas características de tamaño y carga, como se ensayó por cromatografía en columna y electroforesis en gel, respectivamente, como HDL natural.

El tamaño del complejo de lipoproteínas de carga negativa puede ser controlado mediante la variación de la  $R_i$ . Es decir, cuanto menor sea la  $R_i$ , menor será el disco. Por ejemplo, grandes discos discoidales tendrán normalmente una  $R_i$  en el intervalo de aproximadamente 200:1 a 100:1, mientras que los pequeños discos discoidales tendrán normalmente una  $R_i$  en el intervalo de aproximadamente 100:1 a 30:1.

En algunas realizaciones específicas, los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente son grandes discos discoidales que contienen 2-4 equivalentes de ApoA-I (por ejemplo, 2-4 moléculas de ApoA-I, 1-2 moléculas de dímero ApoA-I<sub>M</sub> o 12-40 moléculas de péptido de una hélice), 1 molécula de fosfolípido cargado negativamente y 400 moléculas de SM. En otras realizaciones específicas, los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente son pequeños discos discoidales que contienen 2-4 equivalentes de ApoA-I; 1-10, más preferiblemente 3-6, moléculas de fosfolípido cargado negativamente; y 90-225 moléculas, más preferiblemente 100-210 moléculas, de SM.

### 5.3.1. Medición de complejos y tamaño de partícula

La composición de complejos de lipoproteínas, así como su tamaño y el de partículas de lípidos usadas en la preparación de los complejos de lipoproteínas, pueden determinarse utilizando una variedad de técnicas conocidas en la técnica.

La concentración de proteínas y lípidos de complejos de lipoproteínas en solución se puede medir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, los ensayos de proteínas y fosfolípidos, procedimientos cromatográficos, tales como HPLC, filtración en gel, CG, junto con varios detectores incluyendo espectrometría de masas, UV o red de diodos, fluorescente, dispersión de luz elástica y otros. La integridad de los lípidos y de las proteínas puede ser también determinada por las mismas técnicas cromatográficas, así como por cartografía de péptidos, electroforesis en gel de SDS-PAGE, y secuenciación N y C-terminal de ApoA-I, y ensayos estándar para determinar la oxidación de lípidos.

El complejo de lipoproteínas así como las partículas lipídicas usadas en la preparación de los complejos de lipoproteínas, pueden variar en tamaño como se describe en el presente documento. El tamaño de partícula de lípido y/o el tamaño del complejo de lípidos y proteínas pueden determinarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos de ejemplo incluyen dispersión dinámica de luz y cromatografía de permeación en gel.

La dispersión de luz dinámica (DLS), también conocida como espectroscopía de correlación de fotones, mide y el

cambio en la longitud de onda de un haz de luz que golpea una partícula que se mueve en solución por el movimiento browniano. Específicamente, las partículas que se mueven dispersan la luz cuando son iluminadas por un láser y las fluctuaciones de intensidad resultantes en la luz dispersada se pueden utilizar para calcular la distribución de tamaño de la esfera en la solución. Véase, Zetasizer Nano Serie Manual del usuario, MAN0317 Edición 2.1 (julio de 2004). DLS determina la distribución de la intensidad y el promedio de las partículas en solución, basado en lo cual se pueden calcular el volumen de partícula y la distribución del número y el promedio. La técnica de DLS puede utilizarse para determinar el tamaño de partículas de lípidos usados para producir complejos de lipoproteínas, así como el tamaño de los propios complejos de lipoproteínas. Un instrumento DLS adecuado es el Zetasizer Nano por Malvern Instruments.

La cromatografía de permeación en gel (GPC) también se puede utilizar para determinar el tamaño de los complejos que contienen proteínas. La cromatografía de exclusión molecular separa los componentes en una mezcla basado en el tamaño molecular. El tamaño de un complejo de lípido-proteína se puede determinar comparando el perfil de elución del complejo con patrones conocidos o muestras de referencia, típicamente por comparación con una curva de calibración. Las muestras de referencia están disponibles comercialmente y pueden incluir tanto los patrones de proteína como no proteicos, tales como albúmina, ferritina y vitamina B<sub>12</sub>. Current Protocols in Molecular Biology (1998), Sección IV, 10.9.1-10.9.2.

Las partículas de lípidos útiles en la preparación de los complejos de lipoproteínas de la descripción pueden ser de al menos 45 nm, al menos 50 nm, al menos 55 nm, al menos 60 nm de tamaño, medido por DLS (por ejemplo, usando medición basada en intensidad). Además, las partículas de lípidos puede ser de hasta 65 nm, hasta 70 nm, hasta 80 nm, hasta 90 nm, hasta 100 nm, hasta 120 nm, hasta 150 nm, hasta 200 nm, hasta 250 nm, hasta 300 nm, o de hasta 500 nm de tamaño, medido por DLS.

Los complejos de lipoproteínas de la descripción pueden variar en tamaño de 4 nm a 15 nm, 6 nm a 15 nm, 4 nm a 12 nm, de 5 a 12 nm, 6 nm a 12 nm, 8 nm a 12 nm, o 8 nm a 10 nm, medido por las técnicas descritas en el presente documento.

#### 5.4. Poblaciones de complejos de lipoproteínas

La presente descripción proporciona más poblaciones de los complejos de lipoproteínas descritas en este documento. Las poblaciones comprenden una pluralidad de complejos de lipoproteínas como se describe aquí, comprendiendo cada una una fracción de proteínas y una fracción de lípidos, por ejemplo, tal como se describe anteriormente en la Sección 5.3. Los solicitantes han descubierto varias características que se cree que contribuyen de forma individual o en combinación con la potencia y el perfil de seguridad de las poblaciones de complejos de lipoproteínas. Las poblaciones de complejos de lipoproteínas pueden incorporar cualquier número de las características que se describe en el presente documento solas o en combinación.

En primer lugar, la homogeneidad de los complejos de lipoproteínas en una población, es decir, la prevalencia de uno o más complejos de lipoproteínas discretos en la población, como se indica por uno o más picos discretos de complejos de lipoproteínas en una población, y la prevalencia en complejos de lipoproteínas de apolipoproteína madura, sin modificar, se cree que aumentan la potencia. En consecuencia, la población de complejos de lipoproteínas puede comprender una fracción de proteína que comprende o que consiste esencialmente en una apolipoproteína, por ejemplo, ApoA-I, y una fracción de lípidos, donde la población es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% homogénea, como se mide por el porcentaje de la población en un solo pico en cromatografía de permeación en gel.

En algunas realizaciones, el tamaño de complejo de lipoproteínas en una población puede oscilar entre 4 nm y 15 nm, por ejemplo, entre 5 nm y 12 nm, entre 6 nm y 15 nm, o entre 8 nm y 10 nm.

La apolipoproteína, por ejemplo, ApoA-I, en la población puede ser ApoA-I madura, preferiblemente de longitud completa (no truncada), y la población puede contener al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% en peso de ApoA-I madura, preferiblemente de longitud completa (no truncada). En algunas realizaciones, la población incluye no más de 25%, no más de 20%, no más de 15%, no más de 10%, o no más de 5% en peso de ApoA-I inmadura o procesada de forma incompleta y/o no más de 20%, no más de 15%, no más de 10%, o no más de 5% en peso de ApoA-I truncada.

En segundo lugar, la pureza de apolipoproteína y lípidos en los complejos y la ausencia relativa de contaminantes en los complejos de lipoproteínas, también referido como la pureza de los complejos de lipoproteínas, se cree que reduce el riesgo de efectos secundarios tales como daños en el hígado, que se refleja por los aumentos en las enzimas hepáticas (por ejemplo, transaminasa). La pureza de apolipoproteína se puede medir por la falta relativa de oxidación y/o desamidación. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, las poblaciones de complejos de lipoproteínas pueden tener cantidades reducidas de apolipoproteína oxidada, tales como no más de 20%, no más de 15%, no más de 10%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, no más de 1% de metionina oxidada, especialmente metionina-112 o metionina-148, o no más de 15%, no más de 10%, no más de 5%, no más

del 4%, no más de 3%, no más de 2%, o no más de 1% de triptófano oxidado. Las poblaciones de complejos de lipoproteínas también pueden tener un porcentaje reducido de aminoácidos desamidados, por ejemplo no más de 15%, no más de 10%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, o no más de 1% de aminoácidos desaminados.

5 También es deseable controlar la pureza de los lípidos en el complejo de lipoproteínas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2% o no más de 1% del lípido en dicha población se oxida.

10 Otra medida de la pureza de los complejos y de las poblaciones de los mismos es una reducción en, o ausencia de, los contaminantes que resultan de los procedimientos de producción o purificación de la apolipoproteína o los procedimientos de fabricación de los complejos de lipoproteínas en sí mismos. En consecuencia, cuando la apolipoproteína se purifica a partir de células huésped, por ejemplo células huésped de mamífero, las poblaciones de complejos de lipoproteínas están preferiblemente libres de ADN de la célula huésped o proteínas. En  
15 realizaciones específicas, la población contiene no más de 500 nanogramos, no más de 200 nanogramos, no más de 100 nanogramos, no más de 50 nanogramos, o no más de 20 nanogramos de proteína de células huésped por miligramo de la lipoproteína, y/o no más de 100 picogramos, no más de 50 picogramos, no más de 25 picogramos, no más de 10 picogramos o no más de 5 picogramos de ADN de célula huésped por miligramo de la lipoproteína, típicamente ApoA-I.

20 Otros contaminantes que pueden aparecer y deben ser evitados son endotoxina, que puede estar presente, entre otras cosas, en cultivos celulares y en muestras de plasma, y disolventes y detergentes, que pueden estar presentes dependiendo del proceso utilizado para producir y/o purificar el complejo de lipoproteínas. Las poblaciones de complejos de lipoproteínas pueden contener como máximo aproximadamente 1 UE, aproximadamente 0,5 UE,  
25 aproximadamente 0,3 UE, o aproximadamente 0,1 UE de endotoxina por miligramo de lipoproteínas, por ejemplo ApoA-I. Las poblaciones de complejos de lipoproteínas también pueden limitarse a que no contiene más de 200 ppm, 250 ppm, 100 ppm o un disolvente no acuoso. En una realización específica, la población no contiene ningún detergente, por ejemplo, colato.

30 Además, usando los procedimientos descritos en este documento, es posible incorporar la mayoría del material de partida de la apolipoproteína en complejos, lo que limita la cantidad de apolipoproteína no complejada presente en una población. La reducción en la cantidad de apolipoproteína no complejada es beneficiosa ya que reduce el riesgo de una respuesta inmunogénica debido a la exposición a una proteína heteróloga. La población de complejos de lipoproteínas puede estar en una composición en la que al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos  
35 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de la proteína está en el complejo de lipoproteínas, es decir, la forma complejada. Opcionalmente, la población de complejos de lipoproteínas puede estar en una composición en la que al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100 % del lípido está en el complejo de lipoproteínas.

40 Opcionalmente, la población puede comprender complejos en los que la fracción lipídica comprende no más de 15%, no más de 10%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, no se más de 1%, o 0% de colesterol en peso de lípidos.

45 Ciertos componentes de lípidos y proteínas pueden formar una pluralidad de complejos de lipoproteínas diferentes pero homogéneos. En consecuencia, la presente descripción también describe composiciones que comprenden dos, tres, o cuatro poblaciones de complejos de lipoproteínas que comprenden diferentes cantidades de moléculas de apolipoproteína (por ejemplo, dos, tres o cuatro moléculas de ApoA-I o equivalentes de ApoA-I). En una realización ejemplar, una composición comprende dos poblaciones de complejos de lipoproteínas, que comprende una primera población de complejos de lipoproteínas que tienen 2 moléculas de ApoA-I o equivalentes de ApoA-I por complejo  
50 lipoproteína, una segunda población que comprende complejos de lipoproteínas que tienen 3 o 4 moléculas de ApoA-I o equivalentes de ApoA-I por complejo de lipoproteínas y, opcionalmente, una tercera población que comprende complejos de lipoproteínas que tiene 4 o 3 moléculas de ApoA-I o equivalentes de ApoA-I por complejo de lipoproteína, respectivamente.

55 Las composiciones que comprenden dos o más poblaciones de complejos de lipoproteínas tienen preferiblemente bajos niveles de lipoproteína y/o lípido no complejado. Por consiguiente, preferiblemente no más de 15%, no más de 12%, no más del 10%, no más de 9%, no más de 8%, no más de 7%, no más de 6%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, o no más de 1% del lípido en la composición está en forma no complejada y/o no más de 15%, no más de 12%, no más de un 10%, no más de 9%, no más de 8%, no más de 7%, no más de 6%, no  
60 más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2 % o no más de 1% de la lipoproteína en la composición está en forma no complejada.

También se proporcionan en el presente documento preparaciones a gran escala de complejos de lipoproteínas, o poblaciones de los mismos, que son particularmente útiles para aplicaciones comerciales, tales como fabricación a  
65 gran escala de complejos de lipoproteínas para fines terapéuticos. Las preparaciones contempladas aquí comprenden una población de complejos de lipoproteínas, por ejemplo, complejos de lipoproteínas cargadas

negativamente, como se describe en el presente documento.

Las preparaciones se proporcionan en los volúmenes, cantidades y concentración resultante de complejos de lipoproteínas adecuados para la fabricación de composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas y formas de dosificación, en una escala comercial. Los volúmenes de preparación típicos varían desde aproximadamente 5 litros hasta aproximadamente 50 litros, o más, por ejemplo, de aproximadamente 10 litros a aproximadamente 40 litros, de aproximadamente 15 litros a aproximadamente 35 litros, de aproximadamente 15 litros a aproximadamente 30 litros, de aproximadamente 20 litros a aproximadamente 40 litros, de aproximadamente 20 litros a aproximadamente 30 litros, de aproximadamente 25 litros a aproximadamente 45 litros, de aproximadamente 25 litros a aproximadamente 35 litros. Las preparaciones pueden tener un volumen de aproximadamente 5 litros, aproximadamente 6 litros, aproximadamente 7 litros, aproximadamente 8 litros, aproximadamente 9 litros, aproximadamente 10 litros, aproximadamente 11 litros, aproximadamente 12 litros, aproximadamente 13 litros, aproximadamente 14 litros, aproximadamente 15 litros, aproximadamente 16 litros, aproximadamente 17 litros, aproximadamente 18 litros, aproximadamente 19 litros, alrededor de 20 litros, aproximadamente 25 litros, aproximadamente 30 litros, aproximadamente 35 litros, aproximadamente 40 litros, aproximadamente 45 litros, o aproximadamente 50 litros. En una realización preferida, la preparación tiene un volumen de aproximadamente 20 litros.

Las preparaciones contienen además complejos de lipoproteínas, o una población de los mismos, en cantidades suficientes para lograr una concentración de apolipoproteína que varía de aproximadamente 5 mg/ml hasta aproximadamente 15 mg/ml, de 5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, o de aproximadamente 8 mg/ml a aproximadamente 12 mg/ml de apolipoproteína. Dependiendo del volumen de la preparación, las cantidades pueden variar desde aproximadamente 25 g hasta aproximadamente 350 g, expresados como la cantidad de apolipoproteína, por ejemplo, ApoA-I, en la preparación. En una realización específica, la preparación contiene aproximadamente 8 mg/ml de ApoA-I.

En una realización específica, la preparación tiene un volumen de 15 litros a 25 litros y contiene de aproximadamente 100 g a aproximadamente 250 g de ApoA-I. En otra realización específica, la preparación tiene un volumen de 30 litros a 50 litros y contiene de aproximadamente 240 g a aproximadamente 780 g de ApoA-I.

## **5.5. Procedimientos para preparar complejos de lipoproteínas**

### **5.5.1. Procedimientos basados en ciclado térmico de fabricación de complejos de lipoproteínas**

Se ha descubierto que los procedimientos que utilizan el ciclo térmico de los componentes de proteínas y lípidos tal como se describe en el presente documento se pueden usar para generar complejos de lipoproteínas con ventajas sobre otras metodologías. En los procedimientos térmicos de ciclado proporcionados en este documento, un componente proteico y un componente lipídico están sometidos a ciclos térmicos hasta que la mayoría del componente proteico (por ejemplo, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90%) se compleja con el componente lipídico, formando un complejo de lipoproteínas. Como se apreciará por los expertos, las ventajas de los presentes procedimientos con respecto a otros procedimientos para la producción de complejos de lipoproteínas incluyen una eficiencia complejante alta que resulta en un producto final sustancialmente homogéneo y puro, sin pocos o ningún subproducto (por ejemplo, proteínas no complejadas) o impurezas de fabricación (por ejemplo, detergentes o tensioactivos, proteínas degradadas, componentes oxidados) presentes en el producto resultante, eludiendo la necesidad de etapas de purificación costosas y derrochadoras. Por lo tanto, los procedimientos son eficientes y dan lugar a poco o ningún desperdicio de materiales de partida. Por otra parte, los procesos son fáciles de escalar y tienen un coste de equipos de bajo. La capacidad para llevar a cabo estos procesos sin disolventes industriales hace que sean respetuosos con el medio ambiente también.

Preferiblemente, para minimizar la oxidación de los componentes de proteínas y lípidos, uno, más de uno o todas las etapas de la formación de complejos (incluyendo homogeneización del componente lipídico) se llevan a cabo bajo una manta de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno, argón o helio).

### **5.5.2. El componente lipídico**

Los procedimientos de ciclado térmico de la descripción pueden utilizar una variedad de lípidos, solos o en combinación, incluyendo lípidos saturados, insaturados, naturales y sintéticos y/o fosfolípidos, como se describe anteriormente en la Sección 5.2.

Los lípidos se pueden preparar para el ciclo térmico con el componente proteico usando cualquier procedimiento que genera partículas lipídicas, tales como vesículas multilamelares ("MLVs"), vesículas unilamelares pequeñas ("SUVs"), grandes vesículas unilamelares ("LUVs"), micelas, dispersiones y similares.

Una gama de tecnologías son conocidas por producir partículas lipídicas. Las partículas lipídicas han sido producidas usando una variedad de protocolos, formando diferentes tipos de vesículas. Se prefiere que las partículas usadas en los procedimientos de ciclado térmico de la descripción estén predominantemente en el

intervalo de tamaño de 45-80 nm, más preferiblemente en el intervalo de tamaño de 55 nm a 75 nm.

La homogeneización a alta presión, por ejemplo microfluidización, ventajosamente produce partículas de tamaños adecuados. La presión de homogeneización es preferiblemente al menos 1.000 bares, al menos 1.200 bares, al menos 1.400 bares, al menos 1.600 bares, al menos 1.800 bares, y es más preferiblemente al menos 2.000 bares, por ejemplo al menos 2.200 bares, al menos 2.400 bares, al menos 2.600 bares, al menos 2.800 bares, al menos 3.000 bares, al menos 3.200 bares, al menos 3.400 bares, al menos 3.600 bares, al menos 3.800 bares, o al menos 4.000 bares. En realizaciones específicas, la presión de homogeneización está en un intervalo entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo, 1.600 a 3.200 bares; 1.800 a 2.800 bares; 1.900 a 2.500 bares; 2.000 a 2.500 bares; 2.000 a 3.000 bares; 2.400 a 3.800 bares; 2.800 a 3.400 bares; y así sucesivamente. Un bar es igual a 100 kPa, 1.000.000 dinas por centímetro cuadrado (barias), 0,987 atm (atmósferas), 14,5038 psi, 29,53 inHg y 750,06 Torr.

En un procedimiento de homogeneización adecuado, una emulsión de los lípidos se transfiere en el recipiente de alimentación de un microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics Inc, Newton, Mass.). La unidad se sumerge en un baño para mantener la temperatura de proceso (por ejemplo, 55°C, 58°C, 62°C, etc.) durante la homogeneización, y se barre con un gas inerte tal como argón antes de su uso. Después de cebado, la emulsión se hace pasar a través del homogeneizador en reciclo continuo durante 5-20 minutos a un gradiente de presión a través de la cabeza de interacción. La homogeneización del componente lipídico en ausencia del componente proteico evita la destrucción del componente proteico por alto cizallamiento usado en técnicas de homogeneización.

Se pueden utilizar otros procedimientos apropiadamente, a condición de que se puedan obtener las partículas de un tamaño adecuado. Por ejemplo, la hidratación de los lípidos por solución acuosa puede dar lugar a la dispersión de los lípidos y la formación espontánea de vesículas multimellar ("MLVs"). Una MLV es una partícula con múltiples bicapas de lípidos que rodean el núcleo acuoso central. Estos tipos de partículas son más grandes que pequeñas vesículas unilaminares (SUV) y pueden ser de 350-400 nm de diámetro. MLVs se puede preparar mediante la solubilización de los lípidos en cloroformo en un matraz de fondo redondo y evaporando el cloroformo hasta que el lípido forma una capa delgada sobre la pared del matraz. Se añade la solución acuosa y se deja que la capa lipídica se rehidrate. Las vesículas se forman a medida que el matraz se agita o se agita con vórtice. Deamer et al, 1983, en *Liposomes* (Ostro, Ed), Marcel Dekker, Inc. New York (citando a Bangham et al, 1965, *J. Mol Biol.* 13: 238). Este procedimiento también puede ser usado para generar vesículas laminares individuales. Johnson et al., 1971, *Biochim. Biophys. Acta* 233: 820.

Una pequeña vesícula unilamelar (SUV) es una partícula con una sola bicapa lipídica que encierra un núcleo acuoso. Dependiendo del procedimiento empleado para generar las SUV, pueden variar en tamaño de 25-110 nm de diámetro. Los primeros SUVs se prepararon por secado de una preparación de fosfolípidos en cloroformo bajo nitrógeno, adición de la capa acuosa para producir una concentración de lípidos en el intervalo milimolar y sometiendo a ultrasonidos la solución a 45°C hasta depurar. Deamer et al., 1983, en *Liposomes* (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York. SUVs preparadas de esta manera producen partículas en el intervalo de 25-50 nm de diámetro.

Otro procedimiento de fabricar SUVs es inyectando rápidamente una solución de etanol/lípido en la solución acuosa a encapsular. Deamer y otros, 1983, en *Liposomes* (Ostro, Ed), Marcel Dekker, Inc., Nueva York (citando Batzri et al, 1973, *Biochim Biophys Acta* 298. 1015). SUVs producidas por este procedimiento varían de tamaño de 30-110 nm de diámetro.

Las SUVs se pueden producir también haciendo pasar vesículas multilamelares a través de una prensa francesa cuatro veces a 20.000 psi. Las SUVs producidas variarán en tamaño de 30-50 nm de diámetro. Deamer y otros, 1983, en *liposomas* (Ostro, Ed), Marcel Dekker, Inc., Nueva York (citando a Barenholz y otros, 1979, *FEBS Letters* 99: 210).

Las vesículas unilamelares y multilamelares de fosfolípidos también se pueden formar por extrusión de las preparaciones acuosas de fosfolípidos a alta presión a través de membranas de poro pequeño (Hope y otros, 1996, *Chemistry and Physics of Lipids*, 40: 89-107)

Las vesículas unilamelares grandes son similares a SUVs en que son bicapas lipídicas individuales que rodean el núcleo acuoso central, pero las LUV son mucho más grandes que las SUV. En función de sus partes constitutivas y del procedimiento utilizado para prepararlas, las LUVs pueden variar en tamaño de 50-1000 nm de diámetro. Deamer y otros, 1983, en *Liposomes* (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York. Las LUVs se preparan habitualmente usando uno de tres procedimientos: dilución de detergente, evaporación de fase inversa, e infusión.

En la técnica de dilución de detergente, se usan soluciones detergentes tales como colato, desoxicolato, glucósido de octilo, glucósido de heptilo y Triton X-100 para formar micelas a partir de la preparación de lípidos. La solución se dializó a continuación para eliminar el detergente. Deamer y otros, 1983, en *Liposomes* (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York.

La técnica de evaporación de fase inversa solubiliza lípidos en soluciones acuosas no polares, formando micelas invertidas. El disolvente no polar es evaporado y las micelas se agregan para formar LUVs. Este procedimiento generalmente requiere una gran cantidad de lípidos.

El procedimiento de infusión inyecta un lípido solubilizado en una solución no polar en la solución acuosa a encapsular. A medida que la solución no polar se evapora, los lípidos se acumulan en la interfaz gas/acuoso. Las láminas de lípidos forman LUVs y partículas oligolamelares a medida que las burbujas de gas pasan a través de la solución acuosa. Las partículas son del tamaño según filtración. Deamer y otros, 1983, en Liposomes (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York (citando Deamer et al, 1976, Biochim Biophys Acta 443: 629 y Schieren y otros, 1978, Biochim Biophys Acta 542: 137).

Una alícuota de la preparación de lípidos resultante puede caracterizarse para confirmar que las partículas lipídicas son adecuadas para usar como el componente lipídico en los procedimientos de termociclado descritos en este documento. La caracterización de la preparación de lípidos puede ser realizada usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, la filtración de exclusión por tamaños, filtración en gel, filtración en columna, cromatografía de permeación en gel, y electroforesis en gel no desnaturalizante.

### 5.5.3. El componente proteico

El componente proteico de los complejos de lipoproteínas no es crítico para el éxito en los presentes procedimientos de ciclo térmico. Prácticamente cualquier proteína de unión a lípidos, tal como una apolipoproteína y/o derivado o análogo de la misma que proporcione un beneficio terapéutico y/o profiláctico pueden ser incluidos en los complejos. Por otra parte, cualquier péptido o análogo de péptido de hélice alfa, o cualquier otro tipo de molécula que "imita" la actividad de una apolipoproteína (tales como, por ejemplo ApoA-I) en que puede activar la LCAT o formar partículas discoidales cuando se asocia con los lípidos, pueden ser incluidos en los complejos de lipoproteínas, y por lo tanto se incluye dentro de la definición de "proteína de unión a lípidos." Las proteínas de unión a lípidos que pueden ser utilizadas en los procedimientos de ciclo térmico incluyen aquellas que se describen en la Sección 5.1 anterior. Las proteínas de unión a lípidos se pueden producir de forma recombinante tal como se describe en la Sección 5.1.2 anterior. Las proteínas de unión a lípidos se pueden purificar por cualquiera de los procedimientos descritos en este documento, incluyendo como se describe en la Sección 5.1.3 o la Sección 5.1.4 anterior.

El componente proteico se puede purificar de fuentes animales (y en particular de fuentes humanas), sintetizarse químicamente o producirse de forma recombinante como es bien conocido en la técnica, véase, por ejemplo, Chung et al., 1980, J. Lipid Res. 21 (3): 284-91; Cheung et al, 1987, J. Lipid Res. 28 (8): 913-29. Véase también la patente de Estados Unidos números 5.059.528, 5.128.318, 6.617.134.; Publicación 20002/0156007, 2004/0067873, 2004/0077541, y 2004/0266660; y las publicaciones PCT Nos. WO/2008/104890 y WO/2007/023476.

El componente proteico puede incluir lípidos en una relación proteína/péptido a lípido que es al menos 5 veces mayor (por ejemplo, al menos 5 veces, al menos 10 veces o al menos 20 veces mayor) que la relación proteína/péptido a lípido en el complejo deseado. Por ejemplo, para producir un complejo de lipoproteína en el que la relación de proteína a lípidos deseada es de 1:200 sobre una base molar, la proteína en el componente proteico puede combinarse con un lípido, típicamente uno que representará sólo una pequeña fracción del lípido en el complejo final, por ejemplo, en una proporción de 1:10 a 1:20. Sin implicar cualquier mecanismo, este complejante "pre" de la proteína a una pequeña cantidad de lípidos es útil cuando el complejo deseado tiene más de un tipo de lípidos, lo que permite una distribución más homogénea de un lípido que está presente en pequeñas cantidades en la lipoproteína compleja producida por el ciclo térmico (por ejemplo, 10% o menos en peso de lípido total, 5% o menos en peso de lípido total, 3% o menos en peso de lípido total, 2% o menos en peso de lípido total, o 1 % o menos en peso de lípido total en el complejo de lipoproteína deseado).

### 5.5.4. Generación de complejos de lipoproteínas mediante ciclado térmico

Los procedimientos generalmente implican un ciclado térmicamente de una suspensión que comprende partículas de lípidos y proteínas de unión a lípidos entre un intervalo de "alta" temperatura y un intervalo de "baja" temperatura hasta que se forman complejos de lipoproteínas.

La suspensión que se cicla térmicamente contiene un componente lipídico y un componente proteico que se agruparon, preferiblemente a una temperatura en el intervalo de alta temperatura, para formar una suspensión de "partida" que se somete a ciclos térmicos.

La relación óptima de lípidos y proteínas en la suspensión de partida se determina por la estequiometría deseada de los componentes en los complejos de lipoproteínas últimos a producido. Como será reconocido por los expertos, la relación molar de la fracción lipídica a la fracción de proteína dependerá, entre otros factores, de la identidad(es) de las proteínas y/o péptidos en el componente proteico, las identidades y cantidades de los lípidos en la fracción lipídica, y el tamaño deseado del complejo de lipoproteínas. Las proporciones adecuadas de lípidos a proteínas en los complejos de lipoproteínas se puede determinar usando cualquier número de ensayos funcionales conocidos en

la técnica, incluyendo, pero no limitado a, el ensayo de movilidad por electroforesis en gel, la cromatografía de exclusión por tamaño, la interacción con los receptores de HDL, el reconocimiento por el transportador de casete de unión a ATP (ABCA1), la captación por el hígado, y la farmacocinética/farmacodinámica. Por ejemplo, los ensayos de movilidad de electroforesis en gel se pueden usar para determinar la relación óptima de componente lipídico a componente proteico en los complejos. Cuando se cargan los complejos producidos por los procedimientos de la descripción, como resultado de la inclusión de fosfolípidos en el componente lipídico, los complejos pueden ser diseñados para exhibir una movilidad electroforética que sea similar a partículas de pre-beta-HDL o alfa-HDL natural. Por lo tanto, en algunas realizaciones, pueden utilizarse partículas de pre-beta-HDL o alfa-HDL natural como patrón para determinar la movilidad de los complejos.

En una realización preferida, el complejo último tiene al menos una apolipoproteína o mimético de apolipoproteína (lo más preferiblemente ApoA-I humana madura o péptido de ApoA-I, respectivamente), al menos un lípido neutro, y al menos un lípido cargado negativamente, tal como se ha descrito en el documento WO2006 PCT/100.567.

Debido a que la actividad biológica de apolipoproteínas, tales como ApoA-I, se cree que es mediada por las hélices anfipáticas que comprenden la apolipoproteína, es conveniente expresar la fracción de apolipoproteína de la relación molar lípido:apolipoproteína usando equivalentes de proteína ApoA-I. En general se acepta que la ApoA-I contiene 6-10 hélices anfipáticas, dependiendo del procedimiento utilizado para calcular las hélices. Otras apolipoproteínas se pueden expresar en términos de equivalentes de ApoA-I en función del número de hélices anfipáticas que contienen. Por ejemplo, ApoA-IM, que típicamente existe como un dímero con puentes disulfuro, se puede expresar como 2 equivalentes ApoA-I, ya que cada molécula de ApoA-IM contiene el doble de hélices anfipáticas que una molécula de ApoA-I. A la inversa, una apolipoproteína de péptido que contiene una sola hélice anfipática se puede expresar como un 1/10-1/6 equivalentes de ApoA-I, debido a que cada molécula contiene de 1/10-1/6 tantas hélices anfipáticas como una molécula de ApoA-I.

En general, la relación molar lípido:equivalente de ApoA-I de los complejos de lipoproteínas (definido en el presente documento como "Ri") estará en el intervalo de aproximadamente 105:1 a 110:1. En algunas realizaciones, el Ri es de aproximadamente 108:1. Las proporciones en peso se pueden obtener usando un PM de aproximadamente 650-800 para fosfolípidos.

En ciertas realizaciones, la relación molar de los componentes es 2-6 (lípido cargado negativamente, por ejemplo, DPPG): 90-120 (lípido neutro, por ejemplo, SM): 1 (equivalentes de ApoA-I). En una realización específica, se describe en el Ejemplo 1, el complejo comprende DPPG, SM y ApoA-I en una relación molar de lípido a proteína de aproximadamente 108:1, con DPPG representando 3% (+/- 1%) del lípido total por peso y SM representando 97% (+/- 5%) de los lípidos en peso.

La concentración de los componentes de lípidos y de proteínas en la suspensión de partida antes de la iniciación del termociclo puede variar de 1 a 30 mg/ml de concentración de equivalentes de ApoA-I y de 1 a 100 mg/ml de concentraciones de lípidos. En realizaciones específicas, la concentración del componente proteico se selecciona de 1 a 30 mg/ml, 2 a 20 mg/ml, de 5 a 20 mg/ml, de 2 a 10 mg/ml, de 5 a 15 mg/ml, de 5 a 20 mg/ml, y de 10 a 20 mg/ml, y la concentración del componente lipídico se selecciona independientemente de 10 a 100 mg/ml, de 10 a 75 mg/ml, de 25 a 50 mg/ml, de 10 a 75 mg/ml, de 25 a 100 mg/ml, de 25 a 75 mg/ml, y de 1 a 75 mg/ml.

Los intervalos de alta y baja temperatura del proceso de termociclo se basan en las temperaturas de transición de fase de los componentes lipídicos y proteicos de los complejos de lipoproteínas. Alternativamente, cuando el componente lipídico no presenta una transición de fase definida o discreta, como podría ocurrir cuando se utilizan fosfolípidos que tienen cadenas de ácidos grasos insaturados o una mezcla de fosfolípidos, los intervalos de alta y baja temperatura del termociclo difieren en al menos aproximadamente 20°C, hasta aproximadamente 40°C o incluso más. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los intervalos de baja y alta temperatura difieren en 20°C-30°C, 20°C-40°C, 20°C-50°C, 30°C-40°C, 30°C -50°C, 25°C-45°C, 35°C-55°C.

Para un lípido, la transición de fase implica un cambio de una estructura ordenada estrechamente empaquetada, conocido como el estado de gel, a una estructura menos ordenada sin estar apretada, conocida como el estado fluido. Los complejos de lipoproteínas se forman típicamente en la técnica mediante la incubación de partículas de lípidos y apolipoproteínas a temperaturas cercanas a la temperatura de transición del lípido particular, o mezcla de lípidos utilizados. La temperatura de transición de fase del componente lipídico (que puede ser determinada por calorimetría) +/- 5°C-10°C representa el intervalo de temperatura "baja" en los procedimientos de la descripción.

Para una proteína, la temperatura de transición de fase implica un cambio de la estructura tridimensional plegada en una estructura de dos dimensiones. Para un lípido, la transición de fase implica un cambio de una estructura ordenada estrechamente empaquetada, conocido como el estado de gel, a una estructura menos ordenada sin estar apretada, conocida como el estado fluido. Los complejos de lipoproteínas se forman típicamente en la técnica mediante la incubación de partículas de lípidos y apolipoproteínas a temperaturas cercanas a la temperatura de transición del lípido particular, o mezcla de lípidos utilizados.

La temperatura de transición de fase del componente lipídico (que puede ser determinada por calorimetría) +/- 12°C,

más preferiblemente de  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ , representa el intervalo de temperatura "baja" en los procedimientos de la descripción. En ciertas realizaciones, el intervalo de baja temperatura es de  $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ , o  $\pm 8^{\circ}\text{C}$  de la temperatura de transición de fase del componente lipídico. En una realización específica, el intervalo de baja temperatura es de no menos de  $5^{\circ}\text{C}$  o no menos de  $10^{\circ}\text{C}$  por debajo a  $5^{\circ}\text{C}$  por encima de la temperatura de transición de fase del componente lipídico.

Para una proteína, la temperatura de transición de fase implica un cambio de la estructura terciaria a la estructura secundaria. La temperatura de transición de fase del componente proteico  $\pm 12^{\circ}\text{C}$ , más preferiblemente de  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ , representa el intervalo de temperatura "alta" en los procedimientos de la descripción. En realizaciones específicas, el intervalo de alta temperatura es de  $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ , o  $\pm 8^{\circ}\text{C}$  de la temperatura de transición de fase del componente proteico. En una realización específica, el intervalo de baja temperatura es de  $10^{\circ}\text{C}$  por debajo a no más de  $5^{\circ}\text{C}$ , no más de  $10^{\circ}\text{C}$ , o no más de  $15^{\circ}\text{C}$  por encima de la temperatura de transición de fase del componente proteico.

La suspensión de partida se somete a ciclos térmicos entre la alta temperatura y la baja temperatura, comenzando preferiblemente a la temperatura alta, hasta que al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de la proteína en la suspensión de partida se incorpora en los complejos de lipoproteína. Usando cantidades estequiométricas adecuadas de los componentes de lípidos y de proteínas, se puede alcanzar la complejación sustancialmente completa de los componentes de lípidos y de proteínas después de varios ciclos. El número de ciclos dependerá de los componentes de proteínas y lípidos, la duración de los ciclos, pero típicamente se requerirán 5 o más ciclos, 10 o más ciclos, o 15 o más ciclos (tanto a temperaturas altas y bajas) para una complejación sustancialmente completa. Los ciclos varían típicamente de 2 minutos a 60 minutos. En realizaciones específicas, los ciclos varían de 5 a 30 minutos, de 10 a 20 minutos, de 5 a 20 minutos, de 2 a 45 minutos, o de 5 a 45 minutos a cada temperatura.

Los complejos producidos por los procedimientos son típicamente agregados supramoleculares en forma de micelas, vesículas, partículas esféricas o en forma de disco en el que el componente proteico está unido físicamente a los fosfolípidos en un intervalo estequiométrico específico entre el fosfolípido y proteína y con una distribución de tamaño homogénea. Los presentes procedimientos ventajosamente dan como resultado la complejación sustancialmente completa de los lípidos y/o proteínas en la suspensión de partida, que resulta en una composición que está sustancialmente libre de lípidos y/o libre de proteínas, tal como se observa por procedimientos de separación tales como la cromatografía. Por lo tanto, los procedimientos de la descripción pueden llevarse a cabo en ausencia de una etapa de purificación.

Los procedimientos de la descripción producen ventajosamente complejos que son homogéneos en su distribución de tamaño, eludiendo la necesidad de fraccionamiento por tamaño.

En algunas realizaciones de la descripción, los complejos de lipoproteínas contendrán más de un tipo de lípidos, incluyendo uno o más lípidos en cantidades relativamente pequeñas (por ejemplo, menos de 10%, menos de 5%, menos de 3% o menos del 1% del componente lipídico). Para optimizar la dispersión, los lípidos utilizados en pequeñas cantidades pueden ser premezclados con el componente proteico en lugar de incorporar en las partículas lipídicas en el componente lipídico.

Una parte alícuota de los complejos de lipoproteínas resultante puede caracterizarse para confirmar que los complejos poseen las características deseadas, por ejemplo, incorporación sustancialmente completa (por ejemplo,  $> 90\%$ ,  $> 95\%$ ,  $> 97\%$  o  $> 98\%$ ) del componente proteico en el componente lipídico. La caracterización de los complejos se puede realizar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, la filtración de exclusión por tamaños, filtración en gel, filtración en columna, cromatografía de permeación en gel, y electroforesis en gel no desnaturizante.

La homogeneidad y/o la estabilidad de los complejos de lipoproteínas o composición descritos en la presente memoria se pueden medir por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, procedimientos cromatográficos, tales como cromatografía de filtración en gel. Por ejemplo, en algunas realizaciones un solo pico o un número limitado de los picos pueden estar asociados con un complejo estable. La estabilidad de los complejos se puede determinar mediante el control de la aparición de nuevo de los picos con el tiempo. La aparición de nuevos picos es un signo de reorganización entre los complejos debido a la inestabilidad de las partículas.

Preferiblemente, para minimizar la oxidación de los componentes de proteínas y lípidos, el termociclo se lleva a cabo bajo un manto de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno, argón o helio).

#### 5.5.5. Otros procedimientos de preparación de complejos de lipoproteínas

Los complejos de lipoproteínas descritas en este documento, incluyendo complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, se pueden preparar en una variedad de formas, incluyendo, pero no limitado a vesículas, liposomas, proteoliposomas, micelas, y partículas discoidales. Además de los procedimientos de ciclado térmico descritos

anteriormente, una variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica se puede utilizar para preparar los complejos de lipoproteínas. Pueden utilizarse diversas técnicas para preparar liposomas o proteoliposomas. Por ejemplo, la apolipoproteína puede cosonicarse (usando un baño de ultrasonidos o la sonda ultrasónica) con los fosfolípidos apropiados para formar complejos. Alternativamente, la apolipoproteína, por ejemplo, ApoA-I, se puede combinar con vesículas preformadas de lípido que dan lugar a la formación espontánea de complejos de lipoproteínas. Los complejos de lipoproteínas también se pueden formar por un procedimiento de diálisis de detergente; por ejemplo, una mezcla de apolipoproteína, fosfolípido(s) cargados, y SM y un detergente tal como colato se dializan para eliminar el detergente y se reconstituyen para formar complejos de lipoproteínas cargadas negativamente (véase, por ejemplo, Jonas et al., 1986, *Methods in Enzymol.* 128: 553-82), o mediante el uso de un dispositivo extrusor o por homogeneización.

En algunas realizaciones, los complejos se preparan por homogeneización utilizando alta presión (por ejemplo, aproximadamente 32.000 psi) durante aproximadamente 40, aproximadamente 50, o aproximadamente 60 minutos. En una realización específica, un complejo que comprende ApoA-I, SN, y DPPG se prepara como se indica a continuación. ApoA-I se disuelve en tampón fosfato y se incuba a 50°C con una dispersión de DPPG en tampón fosfato fabricada usando un mezclador de alto cizallamiento. La mezcla de ApoA-I/DPPG se combina entonces con una dispersión de SM, y se homogeneiza a presiones por encima de 30.000 psi a 30-50°C hasta que la formación del complejo se ha completado sustancialmente, tal como se monitoriza por dispersión dinámica de luz o cromatografía de permeación en gel.

En algunas realizaciones, los complejos de lipoproteínas se pueden preparar por el procedimiento de dispersión en colato descrito en el Ejemplo 1 de la Publicación de Estados Unidos 2004/0067873. Brevemente, el lípido seco se hidrató en tampón de  $\text{NaHCO}_3$ , a continuación, en vórtex y se sonicó hasta que se dispersaron todo el lípido. Se añadió solución de colato, se incubó la mezcla durante 30 minutos, con agitación en vórtex y sonicación periódica, hasta que se vuelve clara, indicando que se forman las micelas colato y lípidos. Se añade ProApoA-I en tampón  $\text{NaHCO}_3$  y la solución se incuba durante 1 hora a aproximadamente 37°C-50°C.

El colato puede ser eliminado por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo el colato se puede eliminar por diálisis, ultrafiltración o por la eliminación de las moléculas de colato por absorción adsorción sobre una perla de afinidad o resina. En una realización, las perlas de afinidad, por ejemplo, BIO-Beads® (Bio-Rad Laboratories) se añaden a la preparación de complejos de lipoproteínas cargadas negativamente y colato para adsorber el colato. En otra realización, la preparación, por ejemplo, una preparación micelar de los complejos de lipoproteínas y colato, se hace pasar por una columna rellena con perlas de afinidad.

En una realización específica, el colato se extrae de una preparación de complejos de lipoproteínas mediante la carga de la preparación en BIO-Beads® dentro de una jeringa. La jeringa se sella con la película de barrera y se incuba con agitación a 4°C durante la noche. Antes del uso, el colato se elimina mediante la inyección de la solución a través de BIO-Beads®, donde es adsorbido por las perlas.

Los complejos de lipoproteínas, tales como complejos de lipoproteínas cargadas negativamente descritos en este documento, se espera que tengan una mayor vida media en la circulación cuando los complejos tienen un tamaño y densidad similares a HDL, especialmente a las HDLs en poblaciones de pre-beta-1 o pre-2-beta HDL. Las preparaciones estables que tienen una larga vida de almacenamiento se pueden producir por liofilización. En algunas realizaciones, los procedimientos de coliofilización comúnmente conocidos en la técnica se usan para preparar los complejos de ApoA-I-lípidos. Brevemente, las etapas de co-liofilización incluyen la solubilización de una mezcla de ApoA-I y el lípido en un disolvente orgánico o mezcla de disolventes, o la solubilización de ApoA-I y de los lípidos por separado y mezclarlos. Las características deseables de disolventes o mezclas de disolventes para coliofilización incluyen: (i) una polaridad relativa media para ser capaz de disolver los lípidos hidrófobos y proteína anfipática, (ii) disolventes Clase 2 o Clase 3 según las directrices de disolvente de la FDA (Registro Federal, Volumen 62, No. 247) para evitar toxicidad potencial asociada con disolvente orgánico residual, (iii) de bajo punto de ebullición para asegurar la facilidad de eliminación del disolvente durante la liofilización, (iv) alto punto de fusión para proporcionar una congelación más rápida, mayores temperaturas de condensación y un menor desgaste y deterioro del liofilizador. En algunas realizaciones, se usa ácido acético glacial. Las combinaciones de metanol, ácido acético glacial, xileno, o ciclohexano también se pueden utilizar.

La solución de ApoA-I-lípido se liofiliza a continuación para obtener un polvo homogéneo. Las condiciones de liofilización pueden ser optimizadas para obtener una rápida evaporación de disolvente con una cantidad mínima de disolvente residual en el polvo de apolipoproteína-lípido liofilizado. La selección de las condiciones de secado por congelación se puede determinar por el experto en la materia, dependiendo de la naturaleza del disolvente, el tipo y dimensiones del receptáculo, solución que sostiene, volumen de llenado, y las características del liofilizador utilizado.

Los complejos de lipoproteínas liofilizados pueden utilizarse para preparar los suministros en volumen para la reformulación farmacéutica, o para preparar alícuotas individuales o unidades de dosificación que se pueden reconstituir para obtener una solución o suspensión de complejos de lipoproteínas. Para la reconstitución, el polvo liofilizado se rehidrata con una solución acuosa hasta un volumen adecuado (por ejemplo, 5 mg de polipéptido/ml, que es conveniente para inyección intravenosa). En algunas realizaciones, el polvo liofilizado se rehidrata con

solución salina tamponada con fosfato o una solución salina fisiológica. La mezcla puede agitarse o someterse a vórtice para facilitar la rehidratación. La etapa de reconstitución puede realizarse a una temperatura igual o mayor que la temperatura de transición de fase del componente lipídico de los complejos.

Los complejos de ApoA-I-lípidos se pueden formar espontáneamente después de la hidratación de polvo de apolipoproteína-lípido liofilizado con un medio acuoso de pH y osmolalidad apropiados. En algunas realizaciones, el medio de hidratación contiene estabilizantes seleccionados de, pero no limitado a, sacarosa, trehalosa y glicerina. En algunas realizaciones, la solución se calienta varias veces por encima de la temperatura de transición de los lípidos a fin de que se formen los complejos. La relación de lípido a proteína puede ser de 1:1 a 200:1 (mol/mol), y es preferiblemente 3:1 a 2:1 de lípido:proteína (p/p), más preferiblemente 2,7:1 a 2,1:1 de lípido:proteína (p/p), por ejemplo, 2,7:1 de lípido:proteína (p/p). El polvo se hidrata para obtener una concentración de complejo final de 5-30 mg/ml expresada en equivalentes de proteínas.

En diversas realizaciones, la ApoA-I en polvo se puede obtener por liofilización de la solución de polipéptido en una solución acuosa de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Una solución homogénea de ApoA-I y de los lípidos (por ejemplo, esfingomielina) se forma entonces por disolución del polvo lipídico y el polvo de ApoA-I en ácido acético glacial. A continuación, se liofiliza la solución, y se forman los complejos de apolipoproteínas-lípido de tipo HDL por la hidratación del polvo resultante en un medio acuoso.

En algunas realizaciones, los complejos de ApoA-I-lípidos están formados por coliofilización de soluciones o suspensiones de fosfolípidos y proteínas. Una solución homogénea de ApoA-I y de los lípidos (por ejemplo, fosfolípidos) en un disolvente orgánico o mezcla de disolventes orgánicos se liofiliza y posteriormente se forman complejos de ApoA-I-lípidos espontáneamente por la hidratación del polvo liofilizado en un tampón acuoso. Ejemplos de disolventes orgánicos y mezclas de disolventes para su uso en este procedimiento incluyen, pero no se limitan a, ácido acético, una mezcla de ácido acético/xileno, una mezcla de ácido acético/ciclohexano y una mezcla de metanol/xileno.

Una alícuota de la preparación reconstituida resultante puede caracterizarse para confirmar que los complejos tienen la distribución de tamaño deseada; por ejemplo, la distribución de tamaño de HDL. Un procedimiento ejemplar para caracterizar el tamaño es cromatografía de filtración en gel. Una serie de proteínas de peso molecular conocido y de diámetro de Stokes, así como HDL humana, se pueden utilizar como patrones para calibrar la columna.

En otras realizaciones, los complejos de ApoA-I-lípidos recombinantes se hacen por complejación ApoA-I con los lípidos descritos en la publicación de patente US no. 2006/0217312 y la publicación internacional nº. El documento WO 2006/100567 (PCT/IB2006/000635).

Las patentes de Estados Unidos. Nos. 6.004.925, 6.037.323, 6.046.166 y 6.287.590 dan a conocer un procedimiento simple para la preparación de complejos de lipoproteínas cargadas negativamente que tienen características similares a las HDL. Este procedimiento, que consiste en co-liofilización de soluciones de apolipoproteínas y lípidos en disolvente orgánico (o mezclas de disolventes) y la formación de complejos de lipoproteínas cargadas negativamente durante la hidratación del polvo liofilizado, tiene las siguientes ventajas: (1) El procedimiento requiere muy pocos pasos; (2) el procedimiento utiliza disolvente (s) de bajo costo; (3) la mayoría o todos los ingredientes incluidos se usan para formar los complejos diseñados, evitando así desperdicio de material que es común a los otros procedimientos de partida; se forman (4) complejos liofilizados que son muy estables durante el almacenamiento de tal manera que los complejos resultantes pueden reconstituirse inmediatamente antes de su uso; (5) los complejos resultantes por lo general no necesitan purificarse adicionalmente tras la formación y antes de su uso; (6) compuestos tóxicos, incluyendo detergentes tales como colato, se evitan; y (7) el procedimiento de producción se puede escalar fácilmente y es adecuado para la fabricación GMP (es decir, en un entorno libre de endotoxinas).

Otros procedimientos adecuados se describen en US publicadas aplicación no. 2006/0217312 y la publicación internacional WO 2006/100567 (PCT/IB 2006/000635).

Preferiblemente, para minimizar la oxidación de los componentes de proteínas y lípidos, una, más de una o todas las etapas de la formación de complejos se llevan a cabo bajo una manta de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno, argón o helio).

La concentración de proteínas y lípidos de partículas de apolipoproteína-lípido en solución se puede medir por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, los ensayos de proteínas y fosfolípidos, procedimientos cromatográficos tales como HPLC, filtración en gel, GC, junto con varios detectores incluyendo la masa espectrometría, UV o de red de diodos, fluorescente, dispersión de luz elástica y otros. La integridad de los lípidos y de las proteínas puede también determinarse mediante las mismas técnicas cromatográficas, así como por cartografía de péptidos, electroforesis en gel de SDS-PAGE, secuenciación N- y C-terminal de ApoA-I, y ensayos estándar para determinar la oxidación de lípidos.

## 5.6. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas contempladas por la descripción comprenden complejos de lipoproteínas cargadas negativamente como ingrediente activo en un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración y el suministro in vivo. Dado que los péptidos pueden comprender extremos y/o cadenas laterales ácidas y/o básicas, se pueden incluir apolipoproteínas miméticas de péptidos en las composiciones, ya sea en forma de ácidos o bases libres, o en forma de sales farmacéuticamente aceptables. También se pueden utilizar proteínas modificadas tales como proteínas amidadas, aciladas, acetiladas o pegiladas. Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender complejos de lipoproteínas cargadas con uno o más agentes activos hidrofóbicos, lipófilos o apolares, tal como se describió anteriormente en las Secciones 5.2 y 5.3.

Las composiciones inyectables incluyen suspensiones, soluciones o emulsiones estériles del ingrediente activo en vehículos acuosos u oleosos. Las composiciones también pueden comprender agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o un agente dispersante. En algunas realizaciones, la composición inyectable comprende complejos de lipoproteínas cargadas negativamente en solución salina tamponada con fosfato (fosfato de sodio 10 mM, 80 mg/ml de sacarosa, pH 8,2). Las composiciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, y pueden comprender conservantes añadidos. Para la infusión, una composición se puede suministrar en una bolsa de infusión fabricada de material compatible con complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, tales como acetato de etilvinilo o cualquier otro material compatible conocido en la técnica.

Las formas de dosificación adecuadas comprenden complejos de lipoproteínas cargadas negativamente a una concentración final de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml de lipoproteína. En una realización específica, la forma de dosificación comprende complejos de lipoproteínas cargadas negativamente a una concentración final de aproximadamente 8 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de apolipoproteína AI, preferiblemente de aproximadamente 8 mg/ml.

Preferiblemente, para minimizar la oxidación de los componentes de proteínas y lípidos, las composiciones farmacéuticas se formulan y/o se rellenan bajo un manto de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno, argón o helio).

## 5.7. Procedimientos de Tratamiento

Los complejos de lipoproteínas, por ejemplo, complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, y las composiciones descritas en este documento se pueden usar para prácticamente todos los propósitos para los que los complejos de lipoproteínas han demostrado ser útiles. Los complejos de lipoproteínas, tales como complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, son eficaces en la movilización de colesterol, incluso cuando se administra a dosis significativamente más bajas que las cantidades de apolipoproteína (20 mg/kg a 100 mg/kg por administración cada 2 a 5 días, 1,4 g de 8 g por ser humano de tamaño promedio) requerida por los regímenes de tratamiento disponibles en la actualidad.

En consecuencia, los complejos y composiciones de la presente descripción son particularmente útiles para tratar o prevenir enfermedades cardiovasculares, trastornos y/o afecciones asociadas. Los procedimientos de tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular, trastorno, y/o afección asociada en un sujeto generalmente comprenden administrar al sujeto una dosis baja (<15 mg/kg) o cantidad de un complejo de lipoproteínas o composición farmacéutica descrita en el presente documento de acuerdo con un régimen eficaz para tratar o prevenir la indicación particular.

Los complejos de lipoproteínas se administran en una cantidad suficiente o eficaz para proporcionar un beneficio terapéutico. En el contexto del tratamiento de una enfermedad cardiovascular, trastorno, y/o afecciones asociadas, se puede deducir un beneficio terapéutico si tiene lugar una o más de las siguientes situaciones: un aumento en la movilización de colesterol en comparación con una línea de base, una reducción en volumen de la placa aterosclerótica, un aumento de la fracción de lipoproteína de alta densidad (HDL) de colesterol libre en comparación con un nivel de línea de base, sin un aumento en la concentración media de triglicéridos en plasma o un aumento por encima del intervalo normal de transaminasas del hígado (o alanina aminotransferasa) niveles. Una cura completa, aunque deseable, no es necesaria para que exista beneficio terapéutico.

En algunas realizaciones, el complejo de lipoproteína se administra a una dosis de aproximadamente 2 mg/kg equivalentes/ApoA-I a aproximadamente 12 mg/kg equivalentes/kg ApoA-I por inyección. En algunas realizaciones, el complejo de lipoproteína se administra a una dosis de aproximadamente 3 mg/kg equivalentes/ApoA-I. En algunas realizaciones, el complejo de lipoproteína se administra a una dosis de aproximadamente 6 mg/kg equivalentes/ApoA-I. En algunas realizaciones, el complejo de lipoproteína se administra a una dosis de aproximadamente 12 mg/kg equivalentes/ApoA-I.

Los sujetos a tratar son individuos que sufren de una prevención de una enfermedad cardiovascular, trastorno, y/o afección asociada. Ejemplos no limitantes de tales enfermedades cardiovasculares, trastornos y/o afecciones asociadas que pueden tratarse o prevenirse con los complejos de lipoproteínas y composiciones descritos en la presente memoria incluyen, enfermedad vascular periférica, reestenosis, aterosclerosis, y las manifestaciones

clínicas miriada de la aterosclerosis, tales como, por ejemplo, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico, ataque isquémico transitorio, infarto de miocardio, síndrome coronario agudo, angina de pecho, claudicación intermitente, isquemia crítica de las extremidades, estenosis de la válvula, y la esclerosis válvula atrial. Los sujetos pueden ser personas con una incidencia previa de síndrome coronario agudo, tal como un infarto de miocardio (ya sea con o sin elevación ST) o angina inestable. El sujeto tratado puede ser cualquier animal, por ejemplo, un mamífero, particularmente un ser humano.

En una realización, los procedimientos comprenden un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular, que comprende administrar a un sujeto un complejo de lipoproteína cargada o composición descrita en el presente documento en una cantidad que no altere ApoA-I de línea de base de un paciente después de la administración.

En otras realizaciones, los procedimientos comprenden un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular, que comprende administrar a un sujeto un complejo de lipoproteínas (por ejemplo, un complejo cargado) o la composición descrita en este documento en una cantidad que es eficaz para alcanzar un nivel sérico de libre o complejo apolipoproteína más alto que un nivel de línea base (inicial) antes de la administración por aproximadamente 5 mg/dl a 100 mg/dl aproximadamente a dos horas después de la administración y/o en alrededor de 5 mg/dl a 20 mg/dl aproximadamente 24 horas después de la administración.

En otra realización, los procedimientos comprenden un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular, que comprende administrar a un sujeto un complejo de lipoproteínas (por ejemplo, un complejo cargado) o la composición descrita en este documento en una cantidad eficaz para lograr un circulan las concentraciones plasmáticas de un HDL fracción de colesterol para después de la administración al menos un día en que es al menos aproximadamente 10% mayor que una fracción inicial de HDL-colesterol antes de la administración.

En otra realización, los procedimientos comprenden un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular, que comprende administrar a un sujeto un complejo de lipoproteínas (por ejemplo, un complejo cargado) o la composición descrita en este documento en una cantidad eficaz para conseguir una concentración de plasma circulante de un HDL fracción de colesterol que se encuentra entre 30 y 300 mg/dL entre 5 minutos y 1 día después de la administración.

En otra realización, los procedimientos comprenden un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular, que comprende administrar a un sujeto un complejo de lipoproteínas (por ejemplo, un complejo cargado) o la composición descrita en este documento en una cantidad eficaz para conseguir una concentración circulante en plasma de ésteres de colesterol que es de entre 30 y 300 mg/dL entre 5 minutos y 1 día después de la administración.

En todavía otra realización, los procedimientos incluye un procedimiento en el tratamiento o protección de una enfermedad cardiovascular, que comprende administrar a un sujeto un complejo de lipoproteínas (por ejemplo, un complejo cargado) o la composición descrita en este documento en una cantidad eficaz para conseguir un aumento de la excreción de colesterol fecal para al menos un día después de la administración que es al menos aproximadamente 10% por encima de un nivel de línea base (inicial) antes de la administración.

Los complejos de lipoproteínas, incluyendo complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, o composiciones descritos en este documento pueden usarse solos o en terapia de combinación con otros fármacos utilizados para tratar o prevenir las condiciones anteriores. Tales terapias incluyen, pero no se limitan a la administración simultánea o secuencial de los fármacos implicados. Por ejemplo, en el tratamiento de la hipercolesterolemia, tales como la hipercolesterolemia familiar (homocigoto o heterocigoto) o aterosclerosis, las formulaciones de lipoproteínas cargadas se pueden administrar con uno cualquiera o más de las terapias de disminución del colesterol actualmente en uso; por ejemplo, resinas de ácidos biliares, niacina, estatinas, inhibidores de la absorción de colesterol y/o fibratos. Tal régimen combinado puede producir efectos terapéuticos particularmente beneficiosos ya que cada fármaco actúa sobre un objetivo diferente en la síntesis de colesterol y el transporte; es decir, las resinas de ácidos biliares afectan el reciclaje del colesterol, el quilomicrón y la población de LDL; niacina afecta principalmente a la población de VLDL y LDL; las estatinas inhiben la síntesis del colesterol, disminuyendo la población de LDL (y tal vez aumentando la expresión del receptor LDL); mientras que los complejos de lipoproteínas, incluyendo complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, descritos en la presente memoria afectan RCT, aumentar el HDL, y promover el flujo de colesterol.

En otra realización, los complejos de lipoproteínas, incluyendo complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, o composiciones descritos en este documento pueden utilizarse en conjunción con fibratos para tratar o prevenir la enfermedad cardíaca coronaria; enfermedad de la arteria coronaria; enfermedad cardiovascular, restenosis, vascular o enfermedades perivasculares; aterosclerosis (incluyendo el tratamiento y la prevención de la aterosclerosis); Las formulaciones ejemplares y regímenes de tratamiento se describen a continuación.

Los complejos de lipoproteínas, incluyendo complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, o composiciones descritos en este documento se pueden administrar en dosis que aumentan la fracción HDL pequeña, por ejemplo,

la pre-beta, pre-gamma y la fracción de HDL-beta-como pre, la fracción HDL alfa, la HDL3 y/o la fracción HDL2. En algunas realizaciones, las dosis son eficaces para lograr la reducción de la placa aterosclerótica como se mide, por ejemplo, las técnicas de imagen como la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o ultrasonido intravascular (IVUS). Parámetros a seguir por IVUS incluyen, pero no se limitan a, cambios en el volumen de ateroma por ciento desde la línea de base y el cambio en el volumen total de ateroma. Parámetros a seguir por resonancia magnética incluyen, pero no se limitan a, los de IVUS y la composición de los lípidos y la calcificación de la placa.

La regresión de la placa puede medirse usando el paciente como su propio control (tiempo cero en función del tiempo t al final de la última infusión, o dentro de semanas después de la última infusión, o dentro de los 3 meses, 6 meses, o 1 año después del inicio de terapia.

La administración se puede lograr mejor mediante vías parenterales de administración, incluyendo inyección por vía intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC) e intraperitoneal (IP). En ciertas realizaciones, la administración es mediante un perfusor, un infiltrado o un catéter. En algunas realizaciones, los complejos de lipoproteínas, por ejemplo, complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, se administran por inyección, mediante una bomba implantable por vía subcutánea o mediante una preparación de depósito, en cantidades que alcanzan una concentración en suero circulante igual a la obtenida a través de la administración parenteral. Los complejos también podrían ser absorbidos en, por ejemplo, un stent u otro dispositivo.

La administración se puede lograr a través de una variedad de diferentes regímenes de tratamiento. Por ejemplo, se pueden administrar varias inyecciones intravenosas periódicamente durante un solo día, con un volumen total acumulado de las inyecciones que no llega a la dosis tóxica diaria. Los procedimientos comprenden la administración del complejo de lipoproteínas en un intervalo de 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 días. En algunas realizaciones, el complejo de lipoproteína se administra en un intervalo de una semana.

Los procedimientos pueden comprender además la administración de los complejos de lipoproteínas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 veces en cualquiera de los intervalos descritos anteriormente. Por ejemplo, en una realización, el complejo de lipoproteína se administra seis veces, con un intervalo de 1 semana entre cada administración. En algunas realizaciones, la administración podría realizarse como una serie de inyecciones y se detuvo durante 6 meses a 1 año, y luego comenzó otra serie. A continuación, se podría administrar una serie de mantenimiento de inyecciones cada año o cada 3 a 5 años. La serie de inyecciones se podría hacer durante un día (perfusión para mantener un nivel en plasma especificado de complejos), varios días (por ejemplo, cuatro inyecciones durante un período de ocho días) o varias semanas (por ejemplo, cuatro inyecciones durante un período de cuatro semanas) y a continuación, se reinicia después de seis meses a un año. Para las enfermedades crónicas, la administración podría llevarse a cabo de manera continua. Opcionalmente, los procedimientos pueden ir precedidos por una fase de inducción, cuando los complejos de lipoproteínas se administran con más frecuencia.

En otra alternativa, se puede administrar una dosis escalada, a partir de alrededor de 1 a 5 dosis a una dosis entre (50-200 mg) por administración, a continuación, seguido por dosis repetidas de entre 200 mg y 1 g por administración. Dependiendo de las necesidades del paciente, la administración puede ser por infusión lenta con una duración de más de una hora, por infusión rápida de una hora o menos, o mediante una única inyección en bolo.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los diversos complejos de lipoproteínas se pueden determinar usando procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren los complejos de lipoproteínas, tales como complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, que exhiben índices terapéuticos elevados. Ejemplos no limitantes de parámetros que pueden seguirse incluyen las transaminasas de función hepática (no más de 2X los niveles basales normales). Esto es una indicación de que el exceso de colesterol es llevado al hígado y no puede asimilar dicha cantidad. El efecto sobre los glóbulos rojos de la sangre también podría controlarse, ya que la movilización de colesterol de los glóbulos rojos de la sangre hace que se vuelven frágiles, o afecten a su forma.

Los pacientes pueden ser tratados desde unos pocos días hasta varias semanas antes de un acto médico (tratamiento por ejemplo, preventivo), o durante o después de un acto médico. La administración puede ser concomitante o simultánea con otra terapia invasiva, como por ejemplo, angioplastia, ablación carótida, "rotoblader" o trasplante de órganos (por ejemplo, corazón, riñón, hígado, etc.).

En ciertas realizaciones, los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente se administran a un paciente cuya síntesis de colesterol se controla por una estatina o un inhibidor de la síntesis de colesterol. En otras realizaciones, los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente se administran a un paciente sometido a tratamiento con una resina de unión, por ejemplo, una resina semisintética, tal como colestiramina, o con una fibra, por ejemplo, fibra de planta, para atrapar sales biliares y colesterol, para aumentar la excreción de ácido biliar y disminuir las concentraciones de colesterol en sangre.

## 5.8. Otros usos

Los complejos de lipoproteínas, por ejemplo, complejos de lipoproteínas cargadas negativamente, y composiciones descritas en este documento pueden usarse en ensayos in vitro para medir la HDL en suero, por ejemplo, para fines de diagnóstico. Debido a que los péptidos ApoA-I, ApoA-II y Apo se asocian con el componente HDL del suero, los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente se pueden utilizar como "marcadores" para la población de HDL, y las poblaciones de HDL pre-beta1 y pre-beta2. Por otra parte, los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente se pueden utilizar como marcadores para la subpoblación de HDL que son eficaces en la RCT. Con este fin, los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente pueden ser añadidos a o mezclados con una muestra de suero del paciente; después de un tiempo de incubación apropiado, el componente HDL puede someterse a ensayo mediante la detección de los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente incorporados. Esto se puede lograr usando complejos de lipoproteínas cargados negativamente marcados (por ejemplo, radiomarcadores, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, colorantes, etc.), o mediante inmunoensayos utilizando anticuerpos (o fragmentos de anticuerpos) específicos para complejos de lipoproteínas cargadas negativamente.

Alternativamente, los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente marcados se pueden utilizar en procedimientos de imagen (por ejemplo, exploraciones CAT, exploraciones MRI) para visualizar el sistema circulatorio, o para monitorizar RCT, o para visualizar la acumulación de HDL en estrías grasas, lesiones ateroscleróticas y similares, donde la HDL debe ser activa en la expulsión de colesterol.

Ejemplos y datos asociados con la preparación y caracterización de ciertos complejos proApoA-I-lípidos se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0067873.

Los datos obtenidos en un sistema de modelo animal usando ciertos complejos de proApoA-I-lípidos se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0067873.

## 6. EJEMPLO 1: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN DE APOA-I

### 6.1. Clonación y expresión de la ApoA-I humano en células de ovario de hámster chino (CHO)

#### 6.1.1. Preparación del vector de expresión de ApoA-I

La secuencia del gen de preproApoA-I se obtuvo de NCBI (P02647) y se añadieron secuencias flanqueantes para facilitar la clonación y expresión mejorada. El ADN que codifica preproApoA-I con las secuencias flanqueantes se sintetizó y se clonó en el vector Bluescript KS+. La secuencia flanqueante 5' contenía una secuencia de traducción Kozak optimizada. El inserto de preproApoA-I inserto se escindió del vector Bluescript KS+ con enzimas de restricción Hind III y Bgl II. Este fragmento se purificó en gel y se ligó en un vector de expresión retroviral que lleva los siguientes elementos genéticos: el promotor de citomegalovirus humano fusionado a 5' LTR de virus del Sarcoma Murino de Moloney, una región de empaquetamiento MoMuLV/SV, el promotor de citomegalovirus de simio inmediato temprano, un sitio de multiclonación, 3' LTR de MoMuLV, y un origen bacteriano de replicación y gen de beta-lactamasa. Los clones de la construcción resultante se secuenciaron a través del gen y las regiones flanqueantes. Se seleccionó un clon final (clon # 17) en base a la congruencia de la secuencia de ADN predicha. A continuación, se preparó un retrovector para la transducción usando células 293 GP cotransfectadas con un plásmido de expresión para la glicoproteína de la envoltura de virus de estomatitis vesicular. Se usó el sobrenadante recuperado de las células cotransfectadas y concentradas para la etapa de transducción de CHO-S que se describe a continuación en la Sección 6.1.2.

#### 6.1.2. Producción de una línea celular de mamífero para la expresión de la ApoA-I

Se sometieron células de ovario de hámster chino adaptadas para el crecimiento en medio libre de suero (CHO-S) a tres rondas de transducción (1X, 2X, 3X y) utilizando el vector retroviral descrito anteriormente en la Sección 7.1.1. La población agrupada se expandió para la crioconservación después de cada transducción y se sometió una muestra de células a análisis de copias del gen. El índice de copias de gen se muestra a continuación en la Tabla 2. La línea celular transducida 3X se analizó para la productividad en un ensayo en lotes alimentado 16 días en matraces de 125 ml por duplicación. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

| Tabla 2<br>Resultados del índice de copia de genes de las líneas de células de expresión de ApoA-I |                                                    |                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------|
| Ronda de transducción                                                                              | Nombre de la línea celular después de transducción | Índice de copia de genes |
| 1                                                                                                  | *CHO-S-ApoA-I-R (1X)                               | 2,53                     |
| 1                                                                                                  | *CHO-S-ApoA-I-R (1X)                               |                          |
| 2                                                                                                  | *CHO-S-ApoA-I-R (2X)                               | 5,50                     |
| 2                                                                                                  | *CHO-S-ApoA-I-R (2X)                               |                          |

|                                                                                            |                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------|
| 3                                                                                          | *CHO-S-ApoA-I-R (3X) | 7,23 |
| * las líneas celulares 1X se combinaron antes de proceder a crear las líneas celulares 2X  |                      |      |
| ** las líneas celulares 2X se combinaron antes de proceder a crear las líneas celulares 3X |                      |      |

Tabla 3

| Datos de productividad de lote de alimentación para CHO-S-ApoA-I-R (3X) |       |     |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------------------------------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|
| Población agrupada 3X                                                   | Día   |     |       |       |       |       |
|                                                                         | 2     | 4   | 6     | 8     | 10    | 12    |
| VCD* (x 10 <sup>5</sup> células/ml)                                     | 10,49 | **  | 66,33 | 69,10 | 74,73 | 51,74 |
| µg/ml (mediante ELISA)                                                  | 89    | 459 | 1339  | 2755  | 2775  | 2658  |
| * densidad de células viables                                           |       |     |       |       |       |       |
| ** recuento de células d4 no realizado debido a un error de recogida    |       |     |       |       |       |       |

### 5 6.1.3. Estabilidad de la línea celular que expresa ApoA-I

Se llevó a cabo un estudio de caracterización no GMP en el clon de CHO-S-ApoA-I-R (3X), 17, el banco madre de células que producen ApoA-I, con el fin de evaluar su estabilidad en la viabilidad, la velocidad de crecimiento, la conservación de los insertos de genes y la secreción de producto consistente durante el cultivo a largo plazo.

La línea celular se descongeló del banco madre de células y se cultivó en matraces de agitación de 125 ml usando medio PF CHO LS (Hyclone, Logan UT). Las células se cultivaron de forma continua mediante pases en serie de generación 0 a generación 43. En las generaciones 4, 8, 14, 19, 25, 31, 36 y 43, se congelaron las muestras de las células. Al final del cultivo, las muestras de las células de todas las generaciones se descongelaron y se utilizaron para llevar a cabo cultivos terminales para comparar la producción de proteína ApoA-I de la línea celular a diferentes generaciones en el mismo experimento. El sobrenadante de cada una de las muestras se ensayó a día 12 usando análisis de HPLC de fase inversa para determinar el nivel de producción de ApoA-I. Se encontró que la concentración de ApoA-I variaba de 1.259 mg/litro a 1.400 mg/litro para las diversas muestras (Fig. 2).

Para comparar la estabilidad de los insertos de genes, se utilizaron muestras de las células CHO en las generaciones 0, 4, 14, 25, 36 y 43 para el aislamiento de ADN. El número de insertos genéticos para cada muestra se determinó usando PCR en tiempo real en el ADN genómico. Tal como se muestra en la Tabla 3, los índices basados en la PCR del número de copia no fueron significativamente diferentes basándose en la superposición de desviaciones estándar entre la generación 0 y la generación 43. Se encontró que la producción de ApoA-I y los valores de índice de copias de genes de la línea celular del banco madre de células eran estables durante las 43 generaciones ensayadas.

Tabla 4

| Estabilidad de índice de copias de genes |                          |                     |
|------------------------------------------|--------------------------|---------------------|
| Generación                               | Índice de copia de genes | Desviación estándar |
| 0                                        | 7,87                     | 0,25                |
| 4                                        | 7,80                     | 0,27                |
| 14                                       | 7,80                     | 0,27                |
| 25                                       | 7,97                     | 0,25                |
| 36                                       | 7,90                     | 0,17                |
| 43                                       | 8,20                     | 0,27                |

### 30 6.2. Crecimiento Celular y recogida de ApoA-I

#### 6.2.1. Escalar hasta inóculo y producción en un biorreactor de 200 litros

Se descongeló un vial de células CHO-S transfectadas de forma estable con el gen de la ApoA-I humana del banco madre de células en un baño de agua a 37°C y se añadió un solo matraz de agitación (250 ml) (Thermo Fisher Scientific) que contenía 35 ml de medio de cultivo celular HyQ PF-CHO LS. El recuento de células inicial, determinado usando un hemocitómetro, fue de  $2,48 \times 10^5$  células/ml y 93,8% de viabilidad. El cultivo se colocó en un agitador Orbit (90 rpm) dentro de un incubador mantenido a 37°C en un medio humidificado al 5% de CO<sub>2</sub>. Las etapas de subcultivo produjeron densidades de inoculación de aproximadamente  $1,6 \times 10^5$  células/ml. El recuento de células y el porcentaje de viabilidad del día 4 en el matraz fueron de  $15,01 \times 10^5$  células/ml con 93,9% de viabilidad. El matraz de 250 ml se subcultivó a un matraz de 1 litro. El recuento de células viables promedio del día 3 del matraz de 1 litro fue de  $13,56 \times 10^5$  células/ml con 95,3% de viabilidad. El matraz de 1 litro se subcultivó a un

sistema Wave Bioreactor 20EH con una Wave Bag de 10 litros (GE Healthcare Bioscience Bioprocess Corp, Somerset, NJ) en un volumen de cultivo inicial y una densidad de células diana iniciales de 1000 ml y  $1,75 \times 10^5$  células/ml, respectivamente. Los ajustes de funcionamiento del Wave Bioreactor fueron 37°C de la temperatura de incubación, 15,0 cpm de velocidad de oscilación, 10,9° del ángulo de oscilación y 5,0% de concentración de CO<sub>2</sub> en el gas de aireación con un caudal de gas de 0,25 L/minuto. Después de 3 días de cultivo, la densidad de células viables en la Wave Bag fue de  $10,73 \times 10^5$  células/ml, y se añadió HyQ PF-CHO LS fresco llevando el volumen de cultivo a 5.000 ml. Después de un período adicional de tres días, la densidad de células viables fue de  $13,25 \times 10^5$  células/ml y el volumen en la Wave Bag se transfirió al biorreactor de 30 litros. Los puntos de ajuste operativos en el biorreactor de 30 L para la temperatura, pH, oxígeno disuelto, presión y velocidad de agitación fueron 37°C, pH 7,0, saturación del aire 40%, 1 psig de presión y velocidad de agitación de 50 rpm, respectivamente.

La densidad de células viables en el biorreactor de 30 litros fue de  $10,80 \times 10^5$  células/ml en el día tres del cultivo, que era suficiente para inocular el biorreactor de 200 litros a una densidad objetivo inicial de  $2,40 \times 10^5$  células/ml. Todo el contenido de los 30 litros se transfirió y el peso después del inóculo, la densidad celular y la viabilidad fueron respectivamente 134,5 Kg,  $2,37 \times 10^5$  células/ml y 90,9%. Los puntos de ajuste operativos en el biorreactor de 200 litros para la temperatura, pH, oxígeno disuelto, presión y velocidad de agitación fueron 37°C, pH 7,0, saturación del aire 40%, 1 psig de presión y velocidad de agitación 35 rpm, respectivamente. En el día 3, la densidad celular fue de  $15,71 \times 10^5$  células/ml, que era suficiente para añadir una solución de 60 litros (v/v) de medio completo (AGT CD CHO 5X, Invitrogen) y 200 mM L-glutamina (concentración final 10 mM) al biorreactor. En los días 8 y 12, el nivel de glucosa cayó por debajo de 5 g/litro lo que provocó una adición de 3 g/litro de solución de glucosa (20%). La densidad celular viable alcanzó su punto máximo en el día 9 a  $33,20 \times 10^5$  células/ml con una viabilidad de 92,5%. El biorreactor se recogió el día 13 a una viabilidad celular de 78,5%. Los recuentos de células y viabilidad del cultivo durante todo el período de cultivo se muestran en la figura 3A y la concentración de ApoA-I en el medio de cultivo durante todo el período de cultivo se muestra en la figura. 3B.

## 6.2.2. Recolección, separación celular y almacenamiento de células

Los medios del biorreactor se recogieron haciendo pasar los contenidos del biorreactor a través de dobles filtros Cuno (Rutherford, NJ, USA) 60M02 Maximizer seguido de un Millipore 0,22 µm Opticap (Billercia, MA, EE.UU.) en una bolsa de 200 litros. El medio clarificado se almacenó a 2-8°C hasta la operación de dispensación. El medio clarificado se filtró a través de un filtro Millipore de 0,22 µm (Billerica, MA, EE.UU.) y se dispensó en botellas de PETG de 2 L estériles (ThermoFisher, Marietta, OH, USA) y después se congelaron a -20°C hasta que se liberaron para su envío.

## 7. EJEMPLO 2: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE APOA-I

### 7.1. Materiales y procedimientos

Expresión, separación primaria y acondicionamiento. El medio de crecimiento celular clarificado por ApoA-I obtenido tal como se describe en el Ejemplo 1 (aproximadamente 1,8 L) se descongeló mediante almacenamiento a temperatura ambiente. El medio descongelado se acondicionó para cromatografía de intercambio aniónico mediante la reducción del pH  $5,3 \pm 0,2$  con HCl 1M.

Purificación de Apo-A-I. Se equilibró una columna de intercambio aniónico Q-Sepharose FF (GE Healthcare) empaquetada a una altura de lecho de 20 cm con tampón TAMP A (fosfato de sodio 20 mM, pH 5,3). La equilibración se consideró completa cuando el pH del efluente de la columna fue de aproximadamente 5,5. El filtrado acondicionado se cargó en la columna a 25-35 g ApoA-I/L de resina de intercambio aniónico a un caudal de 3,7 cm/min. Se lavó ApoA-I a través de la columna en el flujo de TAMP A, que se recogió.

Se ajustó el pH de ApoA-I que contenía el flujo de la columna de intercambio aniónico a  $8,0 \pm 0,2$  con NaOH 1M. Después, la solución se filtró a través de un filtro Planova 20N de 0,2 µm (Asahi Kasei Medical) a una velocidad de flujo de aproximadamente 12,5 l/h/m<sup>2</sup> para eliminar virus y partículas virales.

Se lavó una columna de cromatografía de fase inversa Source 30 con una altura de lecho de 25 cm con tampón TAMP D (carbonato de amonio 20 mM, pH 9,5) hasta que se equilibró cuando el efluente de la columna alcanzó un pH de 9,5. El filtrado que contenía ApoA-I de la etapa de filtración de virus se cargó en la columna a un caudal de 2,8 cm/min. La ApoA-I en la muestra se adsorbió a la matriz y se eluyó con un gradiente de 35-50% de acetonitrilo en tampón TAMP D.

Se lavó una columna C18 de sílice de fase inversa (300 Å 10 µm) empaquetada a una altura de lecho de 25 cm en tampón TAMP (carbonato de amonio 100 mM, pH 9,5) hasta que se equilibró cuando el efluente de la columna alcanzó un pH de 9,5. A continuación, la columna C18 se cargó a 4,7 g ApoA-I/L de la matriz. La ApoA-I adsorbida a la matriz de la columna se eluyó en un gradiente de acetonitrilo al 40-50% en tampón TAMP E.

El acetonitrilo se eliminó de las fracciones que contenían ApoA-I eluidas de la columna de C18 mediante agrupación y concentración de las fracciones aproximadamente 2,5 veces y, a continuación diafiltración de la concentración

contra 15 volúmenes de tampón TAMP C (fosfato de sodio 3 mM, pH 8). El pH de la solución de ApoA-I diafiltrada se disminuyó a aproximadamente 6,0 usando ácido fosfórico diluido y después se pasó a través de una membrana de intercambio aniónico Mustang Q (Pall Life Sciences) para eliminar el ADN y las proteínas de las células huésped. El filtrado de Mustang Q se diafiltró frente a 5 volúmenes de tampón TAMP C.

A continuación, el filtrado diafiltrado se sometió a una ultrafiltración final utilizando una membrana de polietersulfona (serie Omega Filtron) con un corte de peso molecular de 10.000 dalton de modo que la membrana retiene la ApoA-I de 28.000 dalton. La solución de proteína contenía de 7,8 a 17 g/litro de ApoA-I pura, tal como se determina mediante el rastreo de un gel de SDS-PAGE y la medición de la proporción de la intensidad del área de la banda de ApoA-I purificada y la intensidad total de todas las bandas.

## 7.2. Resultados

Caracterización de la ApoA-I. La pureza del producto ApoA-I se ensayó por SDS-PAGE para ser mayor de 99% pura, con bajos niveles de ADN y proteínas de células huésped, y ninguna cantidad detectable de ApoA-I truncada. Ver figura 4.

## 8. EJEMPLO 3: OPTIMIZACIÓN DE COMPONENTES DE COMPLEJOS DE LIPOPROTEÍNAS

### 8.1. Preparación de componentes de apolipoproteína y fosfolípidos

proApoA-I: La proteína proApoA-I fue suministrada por Unité de Biotechnologie, Institut Meurice, Hte Ecole Lucia De Brouckère, 1 Avenue Emile Gryzon, B-1070 Anderlecht, Bélgica en matraces de 100 ml individuales liofilizados que contenían aproximadamente 90 mg de proteína. El número de lote fue 20060202. La proteína se mantuvo a aproximadamente 4°C hasta su uso. Antes de la liofilización, el contenido de proApoA-I fue 3,225 mg/ml con un contenido de urea de 0,011 mg/mL. Se preparó una solución de proApoA-I disolviendo aproximadamente 630 mg de proApoA-I en 25,6 ml de ácido acético/agua al 5%. La concentración final de la solución fue de 25 mg/mL.

ApoA-I: ApoA-I como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Esfingomielina: esfingomielina de huevo (Coatsome® NM-10) fue suministrada por NOF Corporation, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-shi, 660-0095, Japón. El número de lote fue 0502ES1. La esfingomielina se mantuvo a aproximadamente -20°C hasta su uso. La pureza de la esfingomielina fue del 99,1%. Una solución de esfingomielina se preparó disolviendo 799,4 mg de esfingomielina purificada en 16 ml de ácido acético/agua al 5% para dar una concentración final de 50 mg/mL.

Fosfatidilglicerol: 1,2-dipalmitoil-SN-glicero-3-fosfatidil glicerol como sal de sodio (DPPG-Na, Coatsome® MG-6060LS) fue suministrado por NOF Corporation, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-Shi, 660-0095, Japón. El número de lote fue 0309651L. DPPG-Na se mantuvo a aproximadamente -20°C hasta su uso. La pureza de DPPG-Na fue del 99,2%. Una solución de DPPG-Na se preparó disolviendo 49,1 mg de DPPG-Na en 1 ml de ácido acético/agua al 5% para dar una concentración final de 50 mg/mL.

Fosfatidilcolina: di-palmitoil fosfatidilcolina (DPPC) se obtuvo de una fuente comercial.

### 8.2. Preparación de complejos de lipoproteínas

Se prepararon los siguientes complejos de lipoproteínas:

(a) Complejos de lipoproteínas neutros:

- Fórmula A: proApoA-I y SM en una proporción en peso de proteína:fosfolípido de 1:2,5;
- Fórmula B: proApoA-I y SM en una proporción en peso de proteína:fosfolípido de 1:2,7;
- Fórmula C: proApoA-I y SM en una proporción en peso de proteína:fosfolípido de 1:3,1;
- Fórmula D: proApoA-I, SM y DPPC en una proporción en peso de 1:2,7 lipoproteína:fosfolípido total con una proporción en peso de SM:DPPC de 50:50;
- Fórmula E: ApoA-I y SM en una proporción en peso de proteína:fosfolípido 1:2,7.

(b) Complejos de lipoproteínas cargadas negativamente:

- Fórmula F: proApoA-I, SM, DPPC y DPPG en una proporción en peso de lipoproteína:fosfolípido total de 1:2,7 con una proporción en peso de SM:DPPC:DPPG de 48:48:4;
- Fórmula G: proApoA-I, SM, DPPC y DPPG en una proporción en peso de lipoproteína:fosfolípido total de 1:2,7 con una proporción en peso de SM:DPPC:DPPG de 73:23:4;
- Fórmula H: ApoAI, SM, y DPPG en una proporción en peso de lipoproteína:fosfolípido total de 1:2,7 con una proporción en peso de SM:DPPG de 97:3;
- Fórmula I: ApoAI, SM, y DPPG en una proporción en peso de lipoproteína:fosfolípido total de 1:3,0 con una proporción en peso de SM:DPPG de 97:3;
- Fórmula J: ApoAI, SM, y DPPG en una proporción en peso de lipoproteína:fosfolípido total de 1:3,3 con una proporción en peso de SM:DPPG de 97:3;

### 8.3. Velocidad de formación y homogeneidad de complejos de lipoproteínas

La formación de complejos de lipoproteínas de Fórmulas A a J se analizó mediante la inyección de una muestra en un sistema de HPLC para comprobar el tamaño y la distribución de los complejos de lipoproteínas. Los complejos se produjeron mediante cohomogenización y se tomaron muestras en los tiempos indicados.

La figura 5 muestra cromatogramas de HPLC de ejemplo para complejos de lipoproteínas neutros de acuerdo con las fórmulas A a C que comprenden diferentes proporciones en peso de lipoproteína:SM, y la Fórmula D que comprende lipoproteína y fosfolípidos neutros en una proporción 1:2,7, donde el fosfolípido neutro es de 50:50 SM:DPPC. La proporción en peso de lipoproteína:SM de 1:2,7 fue óptima. La fórmula D, que contenía una mezcla de SM y DPPC, mostró una formación de complejos pobre.

La adición de fosfatidilcolina como un segundo fosfolípido neutro dio como resultado una formación de complejos lenta e incompleta. La figura 6 muestra cromatogramas de HPLC de complejos de lipoproteínas de Fórmula D a 10, 20, 30, y 60 minutos. En cambio, como se muestra en la figura 7, la Fórmula B formó rápidamente complejos.

La adición de un fosfolípido cargado negativamente, DPPG, a SM y DPPC condujo a la formación de incluso menos complejo, tal como se muestra en la figura 8, cromatogramas de HPLC de complejos de lipoproteínas de Fórmula F a 20, 40, 60 y 120 minutos.

Tal como se muestra en la figura 9, los complejos de lipoproteínas que contienen solamente SM como un fosfolípido, en una proporción en peso de proteína con respecto a lípido de 1:2,7 forman más complejos de HDL pre-B y lo hacen más rápido que los complejos de lipoproteínas con la misma proporción en peso de proteína con respecto a lípido, pero que contienen DPPC y/o DPPG. Por lo tanto, los complejos de lipoproteínas que comprenden solamente SM como un lípido neutro forman complejos de lipoproteínas más homogéneos a una velocidad más rápida que complejos que comprenden DPPC además de SM, con o sin adición de DPPG.

Finalmente, los complejos de lipoproteínas cargadas negativamente que comprenden una proporción en peso de apolipoproteína:fosfolípido de entre 1:2,7 y 1:3, en el que la fracción de fosfolípidos contiene SM y DPPG en una proporción en peso de 97 a 3, mostraron homogeneidad óptima y ningún pico de lípido libre, en comparación a complejos que comprenden una proporción en peso de apolipoproteína:fosfolípido de 1:3,3 y complejos de lipoproteínas no cargados. Ver figura 10, que muestra cromatogramas de HPLC para las Fórmulas E, H, I, y J. Se eligieron los complejos de lipoproteína de acuerdo con las fórmulas B y H para el estudio adicional en los animales (Ejemplo 6) y, basándose en los resultados de los estudios en animales, se eligieron los complejos de lipoproteínas de Fórmula H para la evaluación clínica en pacientes humanos (Ejemplos 6 y 8).

## 9. EJEMPLO 4: LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE LIPOPROTEÍNA DE COMPLEJOS USANDO PROCEDIMIENTOS BASADOS EN CICLOS TÉRMICOS

### 9.1. Descripción general del procedimiento para fabricar complejos de ApoA-I/DPPG/esfingomielina

Se prepara una solución de ApoA-I congelada en tampón de fosfato (pH 7-9) a una concentración de proteína de 1 a 30 mg/ml, típicamente de 5 a 20 mg/ml, descongelando durante aproximadamente 24-96 horas a 2-8°C y se pesa. Se añaden fosfato sódico monobásico y fosfato sódico dibásico a la solución de ApoA-I para obtener una concentración final de péptido de 10 mM en tampón de pH 7,4.

Se prepara la solución de DPPG mediante calentamiento de tampón fosfato (fosfato de sodio 10 mM, pH 8,0) a un objetivo de 50°C. Se descongela DPPG en polvo (NOF Corporation) a temperatura ambiente durante al menos 1,5 horas y después se pesa y se añade al recipiente con tampón. El DPPG se dispersa a continuación a la temperatura de 50°C utilizando un dispersador de alto rendimiento ULTRA-TURRAX® (IKA® Works, Inc.). Después de la dispersión, la suspensión de DPPG y la solución de ApoA-I se calientan a 57°C. Se combinan y se calientan a 57°C durante 30 minutos bajo nitrógeno. Esta solución de precomplejo se enfría a temperatura ambiente.

Se descongela esfingomielina (SM) en polvo (NOF Corporation) a temperatura ambiente y después se pesa en un tanque de vidrio. El tampón de fosfato (fosfato de sodio 10 mM, pH 8,0) se calienta a 50°C en combinación con el polvo de SM para una concentración SM de 220 mg/ml. El polvo de SM se dispersa en suspensión usando Ultra-TURRAX® y la dispersión se enfría hasta 4°C y a continuación se pasa a través del homogeneizador. Las partículas de SM son controladas mediante dispersión dinámica de luz (DLS) hasta un promedio de tamaño zeta (Z) 55 a 70 nm (usando una medición de intensidad). Esto puede lograrse, por ejemplo, utilizando un homogeneizador Nano DeBee a 32000 +/- 3000 bares, con la temperatura en la entrada a 10-18°C y la temperatura en la salida preferiblemente a 30-40°C (y que no exceda 59°C), lo que da lugar a una partícula con un tamaño promedio Z de 58 nm.

Para la complejación, la mezcla de ApoA-I/DPPG y la dispersión de SM se calientan por separado a 57°C. La dispersión de SM calentada se añade a la mezcla de ApoA-I/DPPG con un punto fijo de temperatura inicial de

57°C. Después de agitar para combinar, la solución se enfría hasta 37°C y a continuación se lleva a través de una serie de ciclos térmicos (57°C a 37°C) con el fin de formar complejos de ApoA-I/DPPG/SM. Este proceso calor-frío continúa con un tiempo de contacto entre temperaturas de 5 minutos y 30 minutos. Los ciclos de calor-frío se repiten hasta que la mayoría del componente proteico se incorpora en complejos de lipoproteínas. El tamaño y la distribución de los complejos durante el termociclado se controlan mediante cromatografía de permeación en gel (GPC).

Se produjeron los complejos ApoA-I/DPPG/SM de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente (y se ilustra en la Fig. 11). La proteína ApoA-I tenía una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 25 a 267 de la secuencia representada en la figura. 1. Los complejos contienen esfingomielina (SM) y 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (dipalmitoilfosfatidilglicerol o DPPG) en una proporción en peso de 97:3. La proporción de proteína ApoA-I con respecto a lípidos totales es de 1:2,7 peso/peso (p/p) que es equivalente a una proporción molar de 1:108. Los componentes de lípidos y de proteínas combinados se sometieron a ciclos entre 57°C y 37°C durante 5 minutos a cada temperatura usando un intercambiador de calor dispuesto, tal como se representa en la figura 5, que incluye en la izquierda un baño de agua tipo 26LE de edición Lauda Ecoline Star (en el que la muestra se cicla térmicamente) y en la derecha un intercambiador de calor de carcasa y tubo (modelo de EF-C50-HE), que tiene un volumen de retención de 18 ml, conectados por una bomba peristáltica.

Se añadieron 180 mg de DPPG a 2,82 gramos de tampón fosfato 10 mM de pH 8,0. La suspensión se dispersó con un dispersador ULTRA-TURRAX® durante 10 minutos a 50°C. 22 gramos de polvo de SM se combinaron con 78 gramos de tampón de fosfato 10 mM pH 8,0. La suspensión se dispersó con un dispersador ULTRA-TURRAX® durante 20 a 40 minutos a 50°C. El SM se homogeneizó usando un NanoBEE fijado a un tamaño promedio de partícula de 60 nm. El DPPG, SM y proteína se llevaron a 57°C. Se añadieron 18 mg (0,3 ml) de DPPG a 214 mg de la proteína ApoA-I en 10 mM de tampón de fosfato de pH 7,4 a 57°C. Después de 30 minutos a 57°C, se añadieron 559 mg de partículas de SM (2,54 ml). A continuación, esta solución se sometió a ciclo térmico para formar un complejo.

La cromatografía de permeación en gel que muestra la formación de complejos ApoA-I/DPPG/SM después del termociclado durante 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 180 minutos y 210 minutos se muestra en las Figs. 13A-13E, respectivamente. Se produce un complejo más compacto con el aumento de tiempo de ciclo, tal como se muestra por el aumento de la nitidez del pico principal de GPC. El pico correspondiente a la proteína no acomplejada también desaparece con el tiempo.

## 9.2. Formación de los complejos ApoA-I/esfingomielina

Se produjeron complejos de ApoA-I/SM de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, pero sin pre-complejación de ApoA-I con DPPG. El componente proteico fue de 5 ml de ApoA-I a una concentración de 8,9 mg/ml y el componente lipídico fue de 0,5 ml de esfingomielina de huevo (220 mg/ml) que había sido suspendido en tampón fosfato 10 mM pH 8,0 y se homogeneizó para formar partículas lipídicas de 60 nm. Los componentes de proteínas y lípidos se mezclaron a 50°C en una proporción en peso de 1:2,5. La suspensión resultante fue sometida a ciclos térmicos durante 18 horas (108 ciclos y el tiempo de ciclo de 10 minutos) usando un aparato de ciclado térmico, tal como se representa en la figura. 5. La cromatografía de permeación en gel muestra que el complejo de proteína/lípido formado es esencialmente homogéneo (ver cromatograma GPC de la Fig. 14).

## 9.3. Formación de complejos de ApoA-I/DPPG/N-palmitoil-4-hidroxisfingonina-1-fosfocolina (fitoesfingomielina)

Los complejos de ApoA-I/DPPG/fitoesfingomielina se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Las partículas de fitoesfingomielina se homogeneizaron a un tamaño de aproximadamente 183 nm (medido por DLS) y se añadieron a la mezcla de proteína:DPPG 7,8 g/litro para lograr una proporción final de proteína con respecto a lípido (SM y DPPG) de 1:2,7. La suspensión que contiene N-palmitoil-4-hidroxisfingonina-1-fosfocolina (fito-esfingomielina) y un componente proteína:DPPG se cicló térmicamente durante seis ciclos de 10 minutos a 37°C y 10 minutos a 57°C, durante un total de dos horas. La cromatografía de permeación en gel muestra que el complejo de proteína/lípido formado es esencialmente homogéneo (ver cromatograma GPC de la Fig. 15).

## 9.4. Formación de ApoA-I DPPG/palmitoil esfingomielina sintética

Se produjeron complejos de ApoA-I/DPPG/palmitoil esfingomielina sintética como se indica a continuación. Una solución de 8,8 ml de palmitoil esfingomielina sintética (220 mg/ml) en 10 mM de tampón de fosfato de pH 7,4 se mezcló hasta que se alcanzó un tamaño de partícula de 3300 nm. Se combinó ApoA-I (945 mg a 14 mg/ml) con 0,03% de DPPG (60 mg/ml) en peso y se calentó a 50°C durante 30 minutos. Las micelas de palmitoil esfingomielina sintética se combinaron con el complejo de proteína/DPPG a una proporción en peso de apolipoproteína:fosfolípido de 1:2,7. La suspensión de proteínas y lípidos se cicló térmicamente con ciclos de calor-frío a 37°C y 57°C, alternativamente, cada diez minutos durante un total de 240 minutos o hasta que se alcanzó una distribución apropiada del tamaño de partícula. El tamaño y la distribución de los complejos durante el termociclado fue supervisado por GPC. Después de la complejación, la concentración se llevó a 8,0 mg de ApoA-I/ml, a continuación,

a continuación se añadieron sacarosa (40 mg/ml) y manitol (20 mg/ml) al complejo para la isotonicidad. Los complejos de lipoproteínas se analizaron por GPC y se encontró que eran esencialmente homogéneos (ver cromatograma GPC de la Fig. 16).

## 5 9.5. Formación de la ApoA-I/DPPG/fitoesfingomielina

Los complejos de ApoA-I/DPPG/fitoesfingomielina se produjeron de la siguiente manera. Una solución de 2,0 ml de fitoesfingomielina (220 mg/ml) en 10 mM de tampón de fosfato de pH 7,4 se dispersó en un Ultra-TURRAX® durante 40 minutos a 50°C hasta alcanzar un tamaño de partícula de 990 nm. Se combinó ApoA-I (15,6 mg a una concentración de 7,8 mg/ml) con 0,03% DPPG (60 mg/ml) en peso y se calentó a 57°C durante 30 minutos. La solución de fitoesfingomielina se combinó con la mezcla de proteína/DPPG en una proporción en peso de apolipoproteína:fosfolípido de 1:2,7. La suspensión de proteína y lípido a continuación se cicló térmicamente con ciclos de calor-frío a 37°C y 57°C, alternativamente, cada diez minutos durante un total de 240 minutos o hasta que se obtuvo la distribución apropiada del tamaño de partícula. La población de complejos de lipoproteínas se midió mediante GPC y se encontró que era aproximadamente un 92,6% homogénea (ver cromatograma GPC en la Fig. 17).

## 9.6. Formación de complejo con un péptido ApoA-I

Los complejos de péptido ApoA-I, DPPG y esfingomielina se generaron tal como se describe anteriormente (véase la Sección 10.1), utilizando una solución del péptido ApoA-I (H-Lys-Leu-Lys-Gln-Lys<sup>5</sup>-Leu-Ala-Glu-Leu-Leu<sup>10</sup>-Glu-Asn-Leu-Leu-Glu<sup>15</sup>-Arg-Phe-Leu-Asp-Leu<sup>20</sup>-Val-Inp<sup>22</sup>-OH; SEQ ID NO: 4). El componente de fosfolípido consiste en esfingomielina de huevo (SM), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (dipalmitoilfosfatidilcolina, DPPC) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (dipalmitoilfosfatidil-glicerol, DPPG) en una proporción en peso de 48,5:3:48,5. La proporción de péptido con respecto a fosfolípidos totales en el complejo es de 1:2,5 (p/p). El complejo de fármaco es una solución del complejo de CER-522 en solución salina tamponada con fosfato (fosfato de sodio 12 mM, cloruro de sodio 130 mM, pH 8,2). El complejo se formó sometiendo la solución de partida a ciclos térmicos entre 50°C y 37°C durante dos horas, caudal de 1 ml/min.

La cromatografía de permeación en gel muestra que el complejo de proteína/lípido formado es esencialmente homogéneo, con una gran mayoría de proteína incorporada en los complejos de lipoproteínas (véase cromatograma GPC de la Fig. 18).

## 9.7. Efecto del tamaño de partícula del lípido y número de ciclos térmicos en la formación de complejo

Se estudió el efecto del tamaño de partícula del lípido y el número de ciclos térmicos sobre el tamaño de partícula. Se generaron preparaciones de cuatro tamaños de partículas diferentes de lípidos de partida (con promedios zeta de 85 nm, 77 nm, 66 nm, y 60 nm) (figuras 19A a 19D, respectivamente) pasando soluciones de SM a través de la NanoBEE en pases individuales. Cada paso se analizó para determinar su promedio zeta. El tamaño de partícula de lípido disminuyó con cada pase y se recogieron las partículas lipídicas cuando se consiguió el tamaño deseado. Los cuatro tamaños de partícula de lípidos diferentes se probaron en el procedimiento de formación de complejo de la Sección 10.1, durante cinco o siete ciclos de 3 minutos a 37°C y 10 minutos a 57°C.

Cuando el componente lipídico se mezcla con el componente proteico, la suspensión resultante es turbia. La turbidez se reduce y la solución se vuelve más transparente a medida que se forman los complejos.

Después de cinco ciclos, la suspensión de los complejos producidos a partir de partículas lipídicas de 60 nm fue la más transparente. Los cromatogramas de GPC (Figuras 20A a 20D) muestran una complejación completa o casi completa en todas las muestras, tal como se evidencia por la homogeneidad del pico principal. Cuando se partió de partículas lipídicas de 66 nm, no hubo ninguna proteína no complejada detectable por GPC en la suspensión resultante de complejos de lipoproteínas, lo que indica que toda la proteína se complejó con lípidos después de cinco ciclos, y los complejos resultantes tenían un 98% de pureza. Después de siete ciclos, las cuatro suspensiones se volvieron más transparentes, mostrando un grado aún mayor de complejación. La suspensión producida usando partículas lipídicas de 60 nm parecía la más clara.

En un estudio separado, las partículas SM de 450 nm y 40 nm se complejaron con ApoA-I y DPPG usando el procedimiento descrito en la Sección 10.1. La mayoría, pero no toda, la ApoA-I se incorporó en complejos de lipoproteínas utilizando partículas SM de 450 nm como el componente lipídico, tal como se muestra en el cromatograma GPC de la figura 21A (el pico a 9,8 minutos). Una fracción mucho menor de ApoA-I se incorporó en complejos de lipoproteínas utilizando partículas SM de 40 nm como el componente lipídico, tal como se muestra en el cromatograma GPC de la figura 21B (el pico a 9,551 minutos).

## 9.8. Efecto de la temperatura de partida de la formación de complejos

Se estudió el efecto de la temperatura inicial del ciclo térmico en la formación del complejo. Los complejos ApoA-I/DPPG/SM se generaron tal como se describe en la Sección 10.1, excepto que el componente lipídico y el

componente proteico se calentaron a, y se combinaron a, 37°C en lugar de 57°C. Un cromatograma GPC del complejo resultante se muestra en la figura 22. Se incorporó sustancialmente menos del componente proteico en complejos de lipoproteínas que cuando el ciclo térmico se inició a 57°C, tal como se evidencia por el pico de proteína relativamente grande (eluyendo a 9,455 minutos en la Fig. 22).

### 9.9. Producción comercial de complejos de lipoproteína usando procedimientos de ciclos térmicos

Para la fabricación comercial a gran escala, los procedimientos de la descripción se pueden escalar y opcionalmente combinar con una etapa de formulación. Una realización comercial se representa en la figura. 23. En esta realización, siguiendo los pasos de termociclado, se diluye el complejo de lipoproteína, se mezcla con uno o más agentes de isotonicidad (por ejemplo, sacarosa y/o manitol), se filtra y se divide en alícuotas en viales. El contenido de los viales se pueden liofilizar para prolongar la vida útil de la formulación resultante.

Los complejos de ApoA-I/DPPG/SM descritos en la Sección 10.1 se produjeron en una escala de 20 litros usando DaBEE2000. Estos complejos se diluyeron con tampón fosfato (pH 7-8) y se mezclaron con sacarosa y manitol hasta una formulación final que contiene tampón de fosfato 10 mM de pH 7,4, 8 mg/ml de ApoA-I, 4% (p/p) de sacarosa y 2% (p/p) de manitol.

### 9.10. Comparación de los complejos de lipoproteína producidos mediante ciclos térmicos vs cohomogeneización

Los complejos de ApoA-I/DPPG/SM producidos mediante los procedimientos de ciclo térmico descritos en este documento se compararon con los complejos producidos mediante cohomogeneización de los componentes de lípidos y proteínas. La pureza de los complejos producidos mediante ciclo térmico se mejoró al 97% en comparación con la cohomogeneización, tal como se mide por cromatografía de permeación en gel. Usando SDS-PAGE, el complejo producido mediante ciclo térmico tiene una mayor pureza de la banda principal del 98% con menos bandas de proteínas truncadas presentes en comparación con los complejos cohomogeneizados.

La oxidación de la ApoA-I también se reduce mediante el proceso de ciclos térmicos en comparación con la cohomogeneización. RP-HPLC (C18) muestra dos picos de oxidación a RT 0,93 y 0,99 en los complejos cohomogeneizados que no están presentes en el proceso de ciclo térmico. El mapa de péptidos también muestra una reducción en la oxidación de la metionina de ApoA-I en Met 112 y Met 148 en los complejos producidos por ciclo térmico en comparación con los complejos producidos por cohomogeneización.

Un resumen de los datos se presenta en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5 Abreviaturas: GPC = cromatografía de permeación en gel Rt = tiempo de retención; NMT = no más que; SDS-PAGE = electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio poliacrilamida; HP-SEC = cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento; RP-HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa; RRT = tiempo de retención relativo; RP-UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa; M<sub>112</sub> ox = oxidación de residuo 112 de metionina de ApoA-I; M<sub>148</sub> ox = oxidación de residuo 148 de metionina de ApoA-I.

| Tabla 5 - Resultados de complejos de ApoA-I/DPPG/SM fabricados usando cohomogeneización y ciclo térmico |                         |      |                         |      |                      |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------|-------------------------|------|----------------------|-----------|
| Prueba                                                                                                  | Resultados por lotes    |      |                         |      |                      |           |
|                                                                                                         | Cohomogenización Lote A |      | Cohomogenización Lote B |      | Ciclo térmico Lote A |           |
| Pureza de los complejos mediante GPC                                                                    | 86%                     |      | 93%                     |      | 96,9%                |           |
| Pureza de ApoA-I mediante SDS-PAGE                                                                      | Banda #                 | %    | Banda #                 | %    | Banda #              | %         |
|                                                                                                         | 1                       | 0,3  | 1                       | 1,4  |                      |           |
|                                                                                                         | 2                       | 5,4  | 2                       | 1,7  |                      | 2         |
|                                                                                                         | 3                       | 3,4  | principal               | 95,7 | principal            | 98,1      |
|                                                                                                         | principal               | 89,5 | 4                       | 1,3  |                      | principal |
| Pureza de ApoA-I mediante HP-SEC                                                                        | RRT                     | %    | RRT                     | %    | RRT                  | %         |
|                                                                                                         | 0,97                    | 4,9  | 0,97                    | 1,5  | 0,97                 | 1,2       |
|                                                                                                         | 1,00                    | 98,2 | 1,00                    | 84,9 | 1,00                 | 98,2      |
|                                                                                                         | 1,10                    | 12,8 | 1,10                    | 13,6 | 1,10                 | 0,6       |
| Heterogeneidad                                                                                          | RRT                     | %    | RRT                     | %    | RRT                  | %         |
| ApoA-I mediante RP-HPLC (C18)                                                                           | 0,93                    | 6,7  | 0,93                    | 0,9  | 0,93                 | N/D       |
|                                                                                                         | 0,94                    | N/D  | 0,94                    | 0,5  | 0,94                 | 1,3       |
|                                                                                                         | 0,96                    | 1,4  | 0,96                    | 1,0  | 0,96                 | 1,4       |

|                                                                                                    |                                          |      |                                         |      |                                         |      |                                         |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------|-----------------------------------------|------|-----------------------------------------|------|-----------------------------------------|------|
|                                                                                                    | 0,97                                     | 0,7  | 0,97                                    | 2,6  | 0,97                                    | 3,5  | 0,97                                    | 3,2  |
|                                                                                                    | 0,99                                     | 53,1 | 0,99                                    | N/D  | 0,99                                    | N/D  | 0,99                                    | N/D  |
|                                                                                                    | 1,00                                     | 38,1 | 1,00                                    | 94,7 | 1,00                                    | 93,5 | 1,00                                    | 94,4 |
| <b>Heterogeneidad de ApoA-I mediante mapa de péptidos/tripsina, RP-UPLC con huella dactilar UV</b> | M <sub>112</sub> OX = 73,1% <sup>a</sup> |      | M <sub>112</sub> OX = 5,5% <sup>a</sup> |      | M <sub>112</sub> OX = 4,9% <sup>a</sup> |      | M <sub>112</sub> OX = 3,6% <sup>a</sup> |      |
|                                                                                                    | M <sub>148</sub> OX = 4,4%               |      | M <sub>148</sub> OX = 1,0%              |      | M <sub>148</sub> OX = 1,5%              |      | M <sub>148</sub> OX = 0,9%              |      |

### 9.11. Uso de gas inerte en los procedimientos de fabricación

- 5 La ApoA-I es una proteína delicada que es susceptible a la inestabilidad química (por ejemplo, oxidación). Para mejorar la estabilidad de ApoA-I en composiciones farmacéuticas que contienen ApoA-I/SM/DPPC, se prepararon composiciones farmacéuticas (incluyendo el ciclo térmico, llenado y etapas de acabado) bajo una atmósfera de nitrógeno, un gas inerte. A continuación, se presentan los resultados de los estudios que comparan los complejos de ApoA-I/SM/DPPC producidos mediante cohomogenización y complejos de ApoA-I/SM/DPPC producidos mediante ciclo térmico en atmósfera de nitrógeno.

**Tabla 6 - Análisis comparativo de los niveles de oxidación de Met<sub>12</sub> y Met<sub>148</sub> en complejos ApoA-I/SM/DPPC producidos mediante dos procedimientos diferentes**

| No. de lote | Tamaño del lote          | Procedimiento de producción | Atmósfera | Niveles de oxidación                                      |
|-------------|--------------------------|-----------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------|
| 1           | 10 litros                | Cohomogenización            | Aire      | M <sub>112</sub> OX = 14,8%<br>M <sub>148</sub> OX = 0,8% |
| 2           | 9,6 litros               | Cohomogenización            | Aire      | M <sub>112</sub> OX = 64,3%<br>M <sub>148</sub> OX = 2,5% |
| 3           | 9,0 litros               | Cohomogenización            | Aire      | M <sub>112</sub> OX = 71,3%<br>M <sub>148</sub> OX = 2,5% |
| 4           | 19,9 litros              | Cohomogenización            | Aire      | M <sub>112</sub> OX = 38,0%<br>M <sub>148</sub> OX = 0,9% |
| 5           | 18,0 litros              | Cohomogenización            | Aire      | M <sub>112</sub> OX = 5,9%<br>M <sub>148</sub> OX = 0,8%  |
| 6           | 17,4 litros              | Cohomogenización            | Aire      | M <sub>112</sub> OX = 73,1%<br>M <sub>148</sub> OX = 4,4% |
| 7           | 12,0 litros <sup>2</sup> | Cohomogenización            | Aire      | M <sub>112</sub> OX = 5,5%<br>M <sub>148</sub> OX = 1,0%  |
| 8           | 21,6 litros              | Ciclado térmico             | Nitrógeno | M <sub>112</sub> OX = 4,9%<br>M <sub>148</sub> OX = 1,5%  |
| 9           | 16,7 litros              | Ciclado térmico             | Nitrógeno | M <sub>112</sub> OX = 3,6%<br>M <sub>148</sub> OX = 0,9%  |

### 10. EJEMPLO 5: ESTUDIOS DE EXPULSIÓN DE COLESTEROL IN VITRO

- 15 La actividad biológica de los complejos de ApoA-I-lípidos se estudió en células de hepatoma de rata Fu5AH, midiendo la expulsión de colesterol mediada por ABCA-1.

Las células de hepatoma de rata Fu5AH tienen alta expresión del receptor atrapador clase B tipo I (SRB1), que facilitan el flujo bidireccional de colesterol entre las células y HDL maduras. Este modelo proporciona un ensayo específico para la actividad de expulsión de colesterol mediada por HDL. El ensayo se realizó usando un procedimiento descrito por Mweva et al., 2006, "Comparison of different cellular models measuring in vitro the whole human serum cholesterol efflux capacity" Eur. J. Clin. Invest. 36, 552-559. Las células Fu5AH se marcaron con <sup>3</sup>H-colesterol durante 24 horas. Se prepararon medios aceptores para la expulsión para cada muestra de ensayo (ApoA-I/DPPG/palmitoil SM, ApoA-I/DPPG/SM de huevo, o ApoA-I/DPPG/fitoSM a 30, 20 y 10 µg/ml, diluidos con MEM tamponado con HEPES 25 mM) y para las muestras de control (ApoA-I purificada a partir de plasma humano (20 µg/ml), HDL<sub>3</sub>, suero humano al 2%, medio solo). Se añadió medio aceptor que contenía muestras de ensayo o de control a las células durante 4 horas y el colesterol se midió en los medios de expulsión y las monocapas de células para determinar el porcentaje de colesterol liberado de las células Fu5AH. Se calculó la actividad biológica de las muestras de ensayo y se expresó como porcentaje de expulsión de colesterol con respecto a un patrón de referencia de la fórmula H descrita anteriormente a la misma concentración que el complejo de lipoproteínas en la muestra de ensayo, que sirvió como control experimental positivo. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 7, y demuestran que los complejos de lipoproteínas ensayados tienen una actividad biológica significativa, tal como se mide en el ensayo de expulsión de colesterol.

**Tabla 7 - Actividad biológica (mediante expulsión de colesterol inducida) en el ensayo basado en células Fu5AH**

| Complejo                                | % de expulsión mediada por SR-BI<br>20 µg/ml | % de patrón de referencia |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------|
| ApoA-I/DPPG/palmitoil<br>esfingomielina | 3,70 ± 0,09                                  | 92%                       |
| ApoA-I/DPPG/esfingomielina de<br>huevo  | 3,61 ± 0,05                                  | 89%                       |
| ApoA-I/DPPG/fitoesfingomielina          | 2,24 ± 0,04                                  | 56%                       |

#### 5 11. EJEMPLO 6: ESTUDIO FARMACODINÁMICO DE ADMINISTRACIÓN ÚNICA DE BAJA DOSIS DE COMPLEJOS DE FÓRMULA B Y FÓRMULA H EN CONEJOS

10 Conejos normales recibieron una sola inyección de: (a) una dosis de 5 mg/kg de una preparación de la Fórmula B (complejos de lipoproteínas neutras que contienen ApoA-I y SM en una proporción en peso de 1:2,7 de apolipoproteína:fosfolípidos); (b) una dosis de 5 mg/kg de una preparación de la fórmula H (complejos de lipoproteínas cargadas negativamente que contienen ApoA-I, SM y DPPG en una proporción en peso de 1:2,7 de apolipoproteína:fosfolípido y una proporción en peso de 97:3 de SM:DPPG); o (c) una preparación de control, que contiene el diluyente para las preparaciones de complejos de lipoproteínas. Cuatro conejos se ensayaron con cada uno de la Fórmula B, Fórmula H y control.

15 Los niveles plasmáticos de colesterol total VLDL y triglicéridos a lo largo del tiempo se muestran en las figuras 24 y 25. Los niveles de colesterol total VLDL en plasma aumentaron menos y volvieron a la línea base más rápidamente en los animales tratados con fórmula H (complejos ApoA-I/DPPG/SM) (b), que los niveles en los animales tratados con la fórmula B (complejos de lipoproteínas de ApoA-I y SM). Un efecto similar se observó para los niveles de triglicéridos. Este estudio mostró que la elevación transitoria en estos niveles fue de duración más corta con complejos de ApoA-I/DPPG/SM que con complejos de lipoproteínas neutras. Este resultado es consistente con los resultados de un estudio en fase I de los complejos de lipoproteínas de fórmula H en sujetos humanos (descrito en el Ejemplo 8 a continuación).

#### 25 12. EJEMPLO 7: ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS COMPARATIVOS DE SM DE HUEVO Y PALMITOIL SM SINTÉTICA

30 Se estudió el efecto farmacodinámico de los complejos de apolipoproteína A-I (ApoA-I)/SM de huevo y ApoA-I/palmitoilSM sintética inyectados por vía intravenosa en conejos. Después de la inyección de los complejos de lipoproteínas, se midieron los cambios en los niveles en plasma de lípidos y lipoproteínas.

35 Los complejos de lipoproteínas de cualquiera de ApoA-I/SM de huevo o ApoA-I/SM sintética se administraron a conejos en dosis de 5 mg/kg o 20 mg/kg mediante infusión intravenosa en la vena de la oreja, a una velocidad de 1 ml/min. Se estudiaron 4 animales por grupo. Las muestras de plasma se tomaron antes de la dosificación, inmediatamente después del final de la infusión y 30 min, 45 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h y 30h después del inicio de la infusión. Las muestras de plasma se analizaron a continuación utilizando kits enzimáticos comerciales para el colesterol total, el colesterol no esterificado, fosfolípidos y triglicéridos totales. La Apo AI se ensayó en muestras de plasma usando kits de ELISA comerciales. Las muestras de plasma se analizaron mediante GPC para determinar los perfiles totales y no esterificados de colesterol. Para los tratamientos de dosis de 5 mg/kg, los resultados se cuantificaron basándose en el porcentaje del área total bajo la curva para la representación del cromatograma.

45 Las figuras 26A-26D muestran los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y apoA-I con el tiempo en conejos perfundidos con 5 mg/kg y 20 mg/kg de cualquiera de ApoA-I/SM de huevo o ApoA-I/SM sintética. La movilización rápida y significativa del colesterol se observó dentro de los 30 minutos después del inicio de las infusiones en ambas dosis administradas: la movilización del colesterol alcanzó su punto máximo a los 30 minutos después de la administración para la dosis de 5 mg/kg y se observó un gran aumento en la movilización de colesterol a la dosis de 20 mg/kg. En cada dosis probada, ambas formulaciones tenían perfiles similares para los triglicéridos en plasma, fosfolípidos en plasma y apoA-I humana recombinante en plasma.

50 Las figuras 27A-27C muestran los niveles plasmáticos de HDL-colesterol total, niveles plasmáticos de LDL-colesterol total y los niveles plasmáticos de VLDL-colesterol total. El aumento del HDL-colesterol total para ApoA-I/SM de huevo y ApoA-I/SM sintética fue similar (Fig. 27A). Hubo poca variación en los niveles plasmáticos de LDL-C y VLDL-C y los niveles no se alteraron sustancialmente por la inyección de complejos de lipoproteínas de cualquier formulación (Figuras 27B-27C).

55 Los resultados de este estudio muestran que los complejos de lipoproteínas ApoA-I/SM de huevo y ApoA-I/SM sintética provocan respuestas similares in vivo.

### 13. EJEMPLO 8: ESTUDIO EN FASE I DE COMPLEJOS DE APOA-I/DPPG/SM EN SUJETOS DISLIDÉMICOS SANOS

#### 13.1. Materiales y procedimientos

Se realizó un ensayo clínico en Fase I con complejos de lipoproteínas de Fórmula H como un estudio aleatorizado, doble ciego, con placebo controlado, cruzado, individual de dosis en voluntarios sanos con una relación LDL/HDL mayor que 3,0. Los objetivos de este estudio de fase I fueron evaluar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y farmacodinámica de un complejo de lipoproteína cargada negativamente cuando se administra como una dosis única. Se estudiaron las dosis escaladas de 0,25, 0,75, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 30,0 y 45,0 mg/kg. Los sujetos recibieron por infusión una solución estéril que contenía complejos de lipoproteínas de ApoA-I (preparados como se describe en el Ejemplo 1), SM y DPPG (en proporción en peso de proteína:lipido de 1:2,7 y composición de lípidos del 97% SM/3% DPPG (p/p)) que se habían producido mediante cohomogeneización de los componentes de proteínas y lípidos. La solución estéril era una solución tamponada de fosfato 10 mM de pH 8,0 que contenía manitol y sacarosa (4% (p/p) de sacarosa, 2% (p/p) de manitol), además de los complejos de lipoproteínas.

#### 13.2. Resultados

A continuación se resumen los hallazgos clínicos de este estudio de fase I.

Colesterol Total: El promedio de las concentraciones de colesterol total en plasma en cada punto de tiempo se presentan en la Tabla 8 a continuación:

**Tabla 8 – Promedio de las concentraciones de colesterol total en plasma con el tiempo después de la administración IV única**

| Dosis      | Horas post-dosis<br>[concentración en plasma (mg/dl)] |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|-------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 0                                                     | 0,5   | 1     | 2     | 4     | 8     | 12    | 24    | 48    | 72    | 168   | 336   | 504   |
| 0,25 mg/kg | 178,8                                                 | 176,5 | 171,3 | 175,0 | 180,0 | 181,8 | 182,8 | 172,8 | 176,8 | 181,0 | 168,0 | 186,3 | 189,3 |
| 0,75 mg/kg | 199,5                                                 | 193,5 | 192,3 | 193,8 | 210,5 | 200,3 | 196,5 | 190,5 | 189,8 | 184,0 | 189,8 | 205,0 | 196,3 |
| 2 mg/kg    | 208,0                                                 | 201,8 | 209,8 | 207,8 | 211,3 | 217,3 | 216,0 | 209,5 | 198,0 | 191,5 | 189,0 | 196,0 | 194,8 |
| 5 mg/kg    | 180,8                                                 | 175,5 | 178,5 | 185,5 | 191,5 | 192,5 | 181,5 | 187,0 | 190,8 | 191,8 | 181,3 | 189,8 | 194,3 |
| 10 mg/kg   | 180,3                                                 | 176,3 | 181,8 | 190,5 | 195,8 | 189,3 | 186,8 | 182,0 | 191,5 | 192,8 | 198,0 | 193,5 | 185,8 |
| 15 mg/kg   | 183,5                                                 | 187,0 | 197,0 | 207,3 | 214,8 | 217,8 | 197,0 | 185,5 | 194,8 | 189,8 | 200,5 | 188,8 | 186,0 |
| 30 mg/kg   | 185,0                                                 | 190,3 | 205,8 | 227,5 | 234,0 | 224,3 | 201,5 | 187,5 | 170,8 | 167,3 | 177,0 | 182,5 | 198,3 |
| 45 mg/kg   | 208,5                                                 | 208,3 | 220,5 | 244,3 | 269,0 | 278,5 | 262,3 | 273,8 | 233,3 | 231,8 | 228,0 | 213,3 | 223,8 |
| Placebo    | 192,1                                                 | 184,5 | 182,6 | 188,0 | 192,7 | 196,0 | 189,8 | 192,1 | 187,2 | 186,3 | 189,9 | 192,6 | 195,3 |

VLDL, LDL y HDL en colesterol total: Valores promedio de VLDL, LDL y HDL en el colesterol total se resumen por punto de tiempo y la dosis en las Tablas 9-11 a continuación:

**Tabla 9 – VLDL promedio en el colesterol total después de la administración IV única**

| Dosis      | Horas post-dosis<br>[Concentración en plasma (mg/dl)] |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|-------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 0                                                     | 0,5   | 1     | 2     | 4     | 8     | 12    | 24    | 48    | 72    | 168   | 336   | 504   |
| 0,25 mg/kg | 24,21                                                 | 23,74 | 22,73 | 24,22 | 26,62 | 31,00 | 32,67 | 29,12 | 32,48 | 35,61 | 23,50 | 34,35 | 32,56 |
| 0,75 mg/kg | 31,05                                                 | 29,29 | 29,14 | 32,38 | 39,74 | 41,67 | 40,93 | 36,12 | 36,15 | 36,69 | 31,86 | 38,40 | 34,33 |
| 2 mg/kg    | 27,38                                                 | 22,87 | 23,47 | 27,11 | 30,04 | 36,83 | 37,74 | 31,09 | 26,34 | 25,68 | 24,58 | 28,41 | 21,22 |
| 5 mg/kg    | 23,04                                                 | 19,65 | 21,02 | 25,01 | 31,10 | 34,34 | 29,85 | 28,88 | 25,02 | 25,14 | 18,80 | 23,64 | 17,97 |
| 10 mg/kg   | 28,38                                                 | 24,77 | 23,33 | 28,59 | 38,11 | 43,53 | 39,07 | 37,98 | 33,70 | 33,08 | 28,83 | 27,37 | 24,17 |
| 15 mg/kg   | 21,74                                                 | 19,67 | 19,14 | 23,04 | 32,01 | 42,13 | 40,74 | 34,65 | 31,76 | 29,44 | 27,43 | 22,41 | 25,02 |
| 30 mg/kg   | 21,28                                                 | 16,58 | 13,28 | 18,70 | 28,95 | 44,06 | 48,54 | 55,64 | 37,56 | 28,40 | 21,00 | 20,66 | 23,45 |

## ES 2 717 455 T3

|         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 45      | 37,83 | 32,12 | 30,69 | 28,23 | 38,68 | 57,31 | 64,26 | 81,80 | 69,79 | 60,82 | 47,92 | 37,99 | 42,00 |
| mg/kg   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Placebo | 28,03 | 26,07 | 25,46 | 27,86 | 29,45 | 35,52 | 33,99 | 31,77 | 31,33 | 36,51 | 26,91 | 29,42 | 28,29 |

Tabla 10 – Promedio de LDL en colesterol total después de la administración IV única

| Dosis      | Horas post-dosis<br>[Concentración en plasma (mg/dl)] |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|------------|-------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|            | 0                                                     | 0,5    | 1      | 2      | 4      | 8      | 12     | 24     | 48     | 72     | 168    | 336    | 504    |
| 0,25 mg/kg | 112,65                                                | 111,83 | 109,38 | 111,44 | 114,16 | 112,18 | 112,08 | 107,74 | 107,68 | 107,79 | 105,48 | 111,69 | 110,26 |
| 0,75 mg/kg | 129,52                                                | 126,39 | 125,37 | 124,40 | 131,92 | 121,88 | 120,06 | 118,66 | 117,25 | 110,64 | 117,03 | 125,19 | 122,05 |
| 2 mg/kg    | 131,94                                                | 130,18 | 135,08 | 131,64 | 133,43 | 133,42 | 131,74 | 132,63 | 128,20 | 122,92 | 119,23 | 121,89 | 124,59 |
| 5 mg/kg    | 110,67                                                | 108,14 | 107,32 | 111,83 | 113,90 | 113,99 | 109,25 | 114,09 | 121,08 | 121,28 | 113,18 | 115,33 | 123,03 |
| 10 mg/kg   | 106,56                                                | 102,15 | 102,83 | 105,92 | 106,73 | 102,29 | 104,74 | 103,52 | 115,08 | 117,14 | 123,52 | 121,62 | 116,29 |
| 15 mg/kg   | 116,42                                                | 113,70 | 114,80 | 118,08 | 120,51 | 119,67 | 108,28 | 106,08 | 117,27 | 116,84 | 122,43 | 120,18 | 114,27 |
| 30 mg/kg   | 121,08                                                | 114,75 | 111,66 | 118,46 | 116,37 | 104,48 | 91,34  | 82,22  | 92,19  | 100,90 | 112,18 | 115,92 | 126,04 |
| 45 mg/kg   | 127,94                                                | 124,70 | 126,10 | 132,06 | 136,32 | 133,79 | 125,62 | 126,61 | 115,32 | 124,94 | 133,93 | 130,10 | 136,17 |
| Placebo    | 119,77                                                | 115,96 | 114,93 | 116,55 | 119,00 | 117,02 | 113,91 | 118,22 | 115,28 | 112,96 | 118,17 | 116,60 | 119,54 |

**Tabla 11 – Promedio de HDL en colesterol total después de la administración IV única**

| Dosis      | Horas post-dosis<br>[Concentración en plasma (mg/dl)] |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|-------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 0                                                     | 0,5   | 1     | 2     | 4     | 8     | 12    | 24    | 48    | 72    | 168   | 336   | 504   |
| 0,25 mg/kg | 41,89                                                 | 40,93 | 39,14 | 39,34 | 39,23 | 38,56 | 37,99 | 35,89 | 36,59 | 37,60 | 39,02 | 40,22 | 46,51 |
| 0,75 mg/kg | 38,93                                                 | 37,81 | 37,74 | 36,98 | 38,83 | 36,70 | 35,51 | 35,71 | 36,36 | 36,67 | 40,87 | 41,41 | 39,86 |
| 2 mg/kg    | 48,68                                                 | 48,70 | 51,20 | 49,00 | 47,78 | 47,00 | 46,52 | 45,78 | 43,46 | 42,90 | 45,19 | 45,70 | 48,93 |
| 5 mg/kg    | 47,04                                                 | 47,71 | 50,16 | 48,65 | 46,50 | 44,17 | 42,41 | 44,03 | 44,65 | 45,33 | 49,27 | 50,78 | 53,25 |
| 10 mg/kg   | 45,31                                                 | 49,32 | 55,59 | 55,98 | 50,91 | 43,43 | 42,94 | 40,50 | 42,72 | 42,53 | 45,65 | 44,51 | 45,29 |
| 15 mg/kg   | 45,34                                                 | 53,63 | 63,05 | 66,13 | 62,23 | 55,95 | 47,97 | 44,77 | 45,72 | 43,47 | 50,64 | 46,15 | 46,71 |
| 30 mg/kg   | 42,64                                                 | 58,91 | 80,81 | 90,34 | 88,67 | 75,72 | 61,62 | 49,64 | 41,01 | 37,95 | 43,82 | 45,93 | 48,76 |
| 45 mg/kg   | 42,73                                                 | 51,42 | 63,70 | 83,96 | 94,00 | 87,40 | 72,36 | 65,34 | 48,14 | 45,99 | 46,15 | 45,16 | 45,58 |
| Placebo    | 44,26                                                 | 42,47 | 42,16 | 43,62 | 44,28 | 43,43 | 41,91 | 42,07 | 40,61 | 40,06 | 44,85 | 46,57 | 47,48 |

Colesterol no esterificado (libre): El promedio de concentraciones de colesterol libre (no esterificado) en plasma en cada punto de tiempo se presenta en la Tabla 12 a continuación:

**Tabla 12 – Promedio de concentraciones de colesterol libre en plasma con el tiempo después de la administración IV única**

| Dosis      | Horas post-dosis<br>[Concentración en plasma (mg/dl)] |      |      |      |       |       |       |       |      |      |      |      |      |
|------------|-------------------------------------------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|
|            | 0                                                     | 0,5  | 1    | 2    | 4     | 8     | 12    | 24    | 48   | 72   | 168  | 336  | 504  |
| 0,25 mg/kg | 48,8                                                  | 46,0 | 44,8 | 46,0 | 46,5  | 49,0  | 51,0  | 46,0  | 48,0 | 50,8 | 44,0 | 49,0 | 49,0 |
| 0,75 mg/kg | 54,0                                                  | 52,8 | 51,8 | 54,0 | 58,3  | 56,5  | 55,8  | 52,8  | 51,0 | 50,5 | 51,0 | 56,5 | 52,0 |
| 2 mg/kg    | 51,8                                                  | 51,5 | 54,0 | 54,5 | 56,5  | 60,0  | 59,8  | 55,0  | 52,0 | 50,8 | 50,8 | 50,8 | 49,8 |
| 5 mg/kg    | 46,5                                                  | 45,8 | 48,5 | 52,3 | 55,5  | 56,8  | 53,0  | 52,5  | 49,5 | 49,8 | 45,0 | 47,3 | 48,0 |
| 10 mg/kg   | 47,0                                                  | 47,3 | 52,3 | 58,3 | 62,0  | 60,0  | 59,3  | 54,8  | 52,8 | 50,8 | 51,5 | 48,0 | 46,8 |
| 15 mg/kg   | 46,5                                                  | 50,5 | 57,8 | 67,3 | 74,0  | 75,0  | 69,0  | 58,8  | 55,8 | 51,8 | 51,5 | 48,0 | 49,0 |
| 30 mg/kg   | 48,0                                                  | 55,5 | 69,0 | 87,0 | 95,3  | 94,5  | 86,0  | 74,0  | 54,0 | 47,8 | 47,0 | 47,0 | 51,5 |
| 45 mg/kg   | 54,3                                                  | 57,5 | 66,5 | 87,3 | 110,0 | 122,0 | 119,5 | 124,0 | 92,3 | 79,5 | 61,5 | 57,0 | 59,8 |
| Placebo    | 49,6                                                  | 47,5 | 47,3 | 48,6 | 49,7  | 52,3  | 50,5  | 49,8  | 48,5 | 48,7 | 49,2 | 50,8 | 50,7 |

VLDL, LDL y HDL en colesterol libre: Los valores promedio para VLDL, LDL y HDL en colesterol libre se resumen por punto de tiempo y las dosis en las Tablas 13-15 siguientes:

**Tabla 13 – Promedio de VLDL en colesterol libre después de la administración IV única**

| Dosis      | Horas post-dosis<br>[Concentración en plasma (mg/dl)] |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|-------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 0                                                     | 0,5   | 1     | 2     | 4     | 8     | 12    | 24    | 48    | 72    | 168   | 336   | 504   |
| 0,25 mg/kg | 10,78                                                 | 10,19 | 9,88  | 10,42 | 11,08 | 13,69 | 15,43 | 12,22 | 14,57 | 16,84 | 10,81 | 15,05 | 14,17 |
| 0,75 mg/kg | 11,11                                                 | 10,58 | 10,43 | 12,02 | 14,63 | 16,06 | 15,81 | 13,74 | 14,36 | 14,93 | 12,20 | 14,33 | 12,92 |
| 2 mg/kg    | 9,15                                                  | 8,24  | 8,59  | 10,08 | 11,47 | 14,56 | 14,48 | 11,13 | 10,04 | 10,04 | 9,74  | 10,75 | 7,54  |
| 5 mg/kg    | 7,05                                                  | 6,06  | 6,58  | 8,61  | 11,69 | 13,39 | 10,56 | 9,88  | 7,83  | 8,16  | 5,56  | 8,11  | 5,49  |
| 10 mg/kg   | 10,24                                                 | 8,66  | 8,71  | 11,29 | 16,31 | 19,18 | 16,38 | 14,88 | 12,50 | 12,02 | 9,94  | 9,13  | 8,46  |
| 15 mg/kg   | 8,37                                                  | 7,39  | 7,45  | 10,18 | 15,78 | 22,36 | 22,22 | 15,53 | 13,26 | 12,44 | 10,47 | 8,20  | 10,38 |
| 30 mg/kg   | 6,93                                                  | 5,19  | 4,52  | 7,23  | 13,88 | 23,42 | 28,04 | 29,43 | 15,23 | 10,82 | 7,82  | 7,19  | 8,67  |

|          |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 45 mg/kg | 12,93 | 10,75 | 10,49 | 11,37 | 18,11 | 31,75 | 39,30 | 49,87 | 35,60 | 27,75 | 19,20 | 14,62 | 16,06 |
| Placebo  | 10,07 | 9,48  | 9,39  | 10,19 | 10,86 | 13,78 | 13,18 | 11,66 | 11,87 | 13,04 | 9,99  | 11,53 | 10,99 |

**Tabla 14 – Promedio de LDL en colesterol libre después de la administración IV única**

| Dosis      | Horas post-dosis<br>[Concentración en plasma (mg/dl)] |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|-------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 0                                                     | 0,5   | 1     | 2     | 4     | 8     | 12    | 24    | 48    | 72    | 168   | 336   | 504   |
| 0,25 mg/kg | 29,81                                                 | 28,22 | 27,37 | 28,11 | 28,09 | 27,75 | 27,87 | 26,92 | 26,45 | 26,77 | 25,97 | 26,62 | 26,47 |
| 0,75 mg/kg | 35,40                                                 | 34,45 | 33,57 | 34,57 | 35,95 | 33,29 | 32,73 | 32,20 | 30,10 | 28,61 | 30,89 | 34,30 | 31,50 |
| 2 mg/kg    | 32,79                                                 | 32,52 | 33,46 | 33,44 | 35,04 | 35,50 | 35,10 | 34,72 | 33,34 | 32,24 | 31,33 | 30,74 | 32,22 |
| 5 mg/kg    | 29,12                                                 | 27,62 | 27,55 | 30,07 | 32,23 | 32,72 | 32,09 | 32,71 | 32,24 | 31,97 | 29,05 | 28,55 | 31,61 |
| 10 mg/kg   | 27,84                                                 | 25,49 | 25,07 | 28,49 | 31,15 | 30,85 | 32,80 | 31,35 | 31,95 | 30,77 | 32,55 | 30,64 | 30,12 |
| 15 mg/kg   | 28,85                                                 | 26,58 | 26,15 | 30,35 | 34,87 | 36,44 | 33,71 | 33,11 | 33,07 | 30,62 | 30,42 | 30,75 | 29,15 |
| 30 mg/kg   | 32,42                                                 | 27,36 | 26,02 | 30,10 | 33,66 | 34,18 | 32,23 | 31,26 | 29,90 | 29,20 | 31,55 | 32,11 | 34,56 |
| 45 mg/kg   | 33,10                                                 | 31,36 | 32,31 | 35,69 | 42,10 | 46,54 | 47,40 | 52,93 | 44,68 | 41,67 | 33,72 | 34,22 | 35,45 |
| Placebo    | 31,01                                                 | 29,73 | 29,47 | 29,64 | 30,05 | 29,85 | 28,76 | 30,34 | 29,22 | 28,30 | 30,73 | 30,28 | 30,73 |

5 **Tabla 15 – Promedio de HDL en colesterol libre después de la administración IV única**

| Dosis      | Horas post-dosis<br>[Concentración en plasma (mg/dl)] |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|-------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 0                                                     | 0,5   | 1     | 2     | 4     | 8     | 12    | 24    | 48    | 72    | 168   | 336   | 504   |
| 0,25 mg/kg | 8,16                                                  | 7,59  | 7,50  | 7,47  | 7,33  | 7,56  | 7,70  | 6,86  | 6,97  | 7,14  | 7,21  | 7,33  | 8,36  |
| 0,75 mg/kg | 7,49                                                  | 7,73  | 7,75  | 7,41  | 7,67  | 7,14  | 7,22  | 6,80  | 6,54  | 6,96  | 7,92  | 7,87  | 7,59  |
| 2 mg/kg    | 9,82                                                  | 10,74 | 11,95 | 10,97 | 9,99  | 9,93  | 10,17 | 9,16  | 8,62  | 8,47  | 9,68  | 9,26  | 9,99  |
| 5 mg/kg    | 10,32                                                 | 12,07 | 14,36 | 13,57 | 11,59 | 10,64 | 10,35 | 9,91  | 9,43  | 9,62  | 10,38 | 10,59 | 10,90 |
| 10 mg/kg   | 8,92                                                  | 13,10 | 18,47 | 18,47 | 14,54 | 9,96  | 10,07 | 8,52  | 8,30  | 7,96  | 9,01  | 8,23  | 8,17  |
| 15 mg/kg   | 9,27                                                  | 16,53 | 24,15 | 26,71 | 23,35 | 16,20 | 13,07 | 10,11 | 9,42  | 8,70  | 10,61 | 9,06  | 9,47  |
| 30 mg/kg   | 8,65                                                  | 22,95 | 38,46 | 49,67 | 47,70 | 36,89 | 25,73 | 13,31 | 8,87  | 7,73  | 7,64  | 7,70  | 8,27  |
| 45 mg/kg   | 8,21                                                  | 15,39 | 23,70 | 40,19 | 49,79 | 43,71 | 32,80 | 21,20 | 11,97 | 10,09 | 8,58  | 8,16  | 8,24  |
| Placebo    | 8,49                                                  | 8,30  | 8,39  | 8,76  | 8,75  | 8,71  | 8,53  | 7,82  | 7,41  | 7,38  | 8,51  | 8,94  | 8,94  |

Triglicéridos: Promedio de las concentraciones de triglicéridos en plasma en cada punto de tiempo se presentan en la Tabla 16 a continuación:

Tabla 16 – Promedio de las concentraciones de triglicéridos en plasma con el tiempo después de la administración IV única

| Dosis      | Horas post-dosis<br>[Concentración en plasma (mg/dl)] |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |
|------------|-------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
|            | 0                                                     | 0,5   | 1     | 2     | 4     | 8     | 12    | 24    | 48    | 72    | 168    | 336   | 504   |
| 0,25 mg/kg | 124,5                                                 | 123,5 | 123,5 | 120,8 | 123,8 | 224,8 | 273,0 | 144,5 | 185,8 | 203,3 | 136,00 | 214,3 | 168,0 |
| 0,75 mg/kg | 125,5                                                 | 127,3 | 131,5 | 133,5 | 138,0 | 191,8 | 205,0 | 148,8 | 163,3 | 184,0 | 177,0  | 180,8 | 180,8 |
| 2 mg/kg    | 103,3                                                 | 103,8 | 114,0 | 122,0 | 130,8 | 204,0 | 216,0 | 120,5 | 117,0 | 113,8 | 122,5  | 135,8 | 102,8 |
| 5 mg/kg    | 90,0                                                  | 84,0  | 90,3  | 108,5 | 127,0 | 194,0 | 132,0 | 105,5 | 89,0  | 93,0  | 88,5   | 122,8 | 70,0  |
| 10 mg/kg   | 130,8                                                 | 122,8 | 129,5 | 154,8 | 193,8 | 248,8 | 229,0 | 171,8 | 158,0 | 159,5 | 127,5  | 120,8 | 107,3 |
| 15 mg/kg   | 109,3                                                 | 113,5 | 129,0 | 168,3 | 236,8 | 382,3 | 364,5 | 180,5 | 170,8 | 157,3 | 124,8  | 88,8  | 132,0 |
| 30 mg/kg   | 88,5                                                  | 88,8  | 101,8 | 141,3 | 226,8 | 391,0 | 456,5 | 320,5 | 175,3 | 138,5 | 94,8   | 72,8  | 96,3  |
| 45 mg/kg   | 156,5                                                 | 159,0 | 169,0 | 212,0 | 328,3 | 592,8 | 745,3 | 705,8 | 491,5 | 408,5 | 236,0  | 181,3 | 216,5 |
| Placebo    | 120,8                                                 | 115,5 | 115,8 | 119,3 | 123,0 | 215,9 | 199,0 | 130,7 | 138,3 | 160,3 | 125,8  | 156,2 | 139,2 |

ApoA-I: Cambio de ApoA-I de la línea base de los sujetos en mg/dL con el tiempo se muestra en la Tabla 17 a continuación. Los cambios máximos en ApoA-I en plasma están en negrita para cada dosis.

**Tabla 17 – Promedio de cambios en ApoA-I en plasma por tiempo después de una administración IV única**

| Dosis (mg/kg) | Horas después del inicio de la infusión |             |             |      |      |      |      |
|---------------|-----------------------------------------|-------------|-------------|------|------|------|------|
|               | 0,5                                     | 1           | 2           | 4    | 8    | 12   | 24   |
| 0,25          | -1,8                                    | <b>-3,9</b> | -1,5        | -1,1 | -1,8 | -1,5 | -5,4 |
| 0,75          | -0,9                                    | <b>-3,8</b> | -2,5        | -1,9 | -0,7 | -5,2 | -3,1 |
| 2             | -2,3                                    | <b>-3,8</b> | -2,1        | -0,8 | 0,1  | -3,7 | -2,4 |
| 5             | 0,5                                     | 6,8         | <b>8,1</b>  | 5,3  | 2,6  | -2   | -0,6 |
| 10            | 8,6                                     | <b>17,8</b> | <b>17,8</b> | 13,9 | 7    | 5    | 0,3  |
| 15            | 16,3                                    | <b>32,5</b> | 30,9        | 27,4 | 21,3 | 10,3 | 8,5  |
| 30            | 36,1                                    | <b>71,8</b> | 68,3        | 61,8 | 45,8 | 24   | 15,4 |
| 45            | 23,3                                    | 48,6        | <b>93,8</b> | 93   | 71,3 | 39,2 | 14,9 |

Transaminasa: Los valores promedio para los niveles de alanina aminotransferasa, o transaminasa, del hígado, que se correlacionan con la toxicidad, se presentan en la Tabla 18 a continuación. El intervalo normal de alanina aminotransferasa es de 9 a 60 UI/L.

**Tabla 18 - Resumen de los valores promedio para la alanina aminotransferasa seleccionada por tratamiento y punto de tiempo**

| Punto de tiempo | Placebo | Dosis (mg/kg) |      |      |      |      |      |       |       |
|-----------------|---------|---------------|------|------|------|------|------|-------|-------|
|                 |         | 0,25          | 0,75 | 2,0  | 5,0  | 10,0 | 15,0 | 30,0  | 45,0  |
| Línea base      | 26,97   | 40,0          | 24,8 | 27,0 | 34,3 | 25,8 | 25,3 | 29,75 | 24,50 |
| 12 h            | 25,84   | 40,8          | 21,0 | 25,0 | 33,5 | 26,5 | 25,3 | 35,25 | 33,25 |
| 24 h            | 26,47   | 39,3          | 19,8 | 23,8 | 34,5 | 25,3 | 26,5 | 37,75 | 32,00 |
| 48 h            | 26,16   | 39,5          | 21,8 | 22,3 | 35,8 | 23,5 | 29,0 | 36,25 | 28,50 |
| 72 h            | 27,22   | 39,5          | 23,8 | 22,5 | 35,5 | 22,8 | 31,5 | 36,50 | 29,00 |
| 7 d             | 27,97   | 40,3          | 25,3 | 24,8 | 33,5 | 20,0 | 43,3 | 35,75 | 27,00 |
| 14 d            | 30,72   | 41,8          | 26,3 | 25,5 | 37,5 | 21,5 | 25,8 | 32,00 | 24,00 |
| 21 d            | 29,13   | 49,7          | 25,0 | 27,0 | 32,3 | 22,3 | 34,3 | 28,50 | 23,25 |

**Eventos adversos:** Un total de 7 (22%) sujetos presentaron eventos adversos. Ninguno de los sujetos presentó eventos adversos considerados por el investigador como al menos posiblemente relacionados con el fármaco en estudio. No parece haber ninguna tendencia relacionada con la dosis en la aparición de eventos adversos. Ninguno de los sujetos presentó un efecto adverso grave y ningún sujeto se retiró del estudio debido a un evento adverso. La tabla 19 a continuación proporciona un resumen de los eventos adversos por sistema corporal:

**Tabla 19 – Resumen de efectos adversos por sistema corporal [Número (%) de sujetos]**

|                                     |                     | Dosis del complejo     |                        |                       |                       |                      |                      |                      |                      |
|-------------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Evento adverso del sistema corporal | Placebo<br>(N = 32) | 0,25<br>mg/kg<br>(N=4) | 0,75<br>mg/kg<br>(N=4) | 2,0<br>mg/kg<br>(N=4) | 5,0<br>mg/kg<br>(N=4) | 10<br>mg/kg<br>(N=4) | 15<br>mg/kg<br>(N=4) | 30<br>mg/kg<br>(N=4) | 45<br>mg/kg<br>(N=4) |
| <b>Sistema gastrointestinal</b>     |                     |                        |                        |                       |                       |                      |                      |                      |                      |
| Diarrea                             | 0 (0%)              | 0 (0%)                 | 0 (0%)                 | 0 (0%)                | 0 (0%)                | 0 (0%)               | 1<br>(25%)           | 0 (0%)               | 0 (0%)               |
| Dolor abdominal/calambres           | 0 (0%)              | 0 (0%)                 | 0 (0%)                 | 0 (0%)                | 0 (0%)                | 0 (0%)               | 0 (0%)               | 1<br>(25%)           | 0 (0%)               |
| <b>Sistema musculoesquelético</b>   |                     |                        |                        |                       |                       |                      |                      |                      |                      |
| Lesión del dedo del pie             | 0 (0%)              | 0 (0%)                 | 0 (0%)                 | 0 (0%)                | 0 (0%)                | 0 (0%)               | 0 (0%)               | 0 (0%)               | 1<br>(25%)           |
| <b>Infecciones e infestaciones</b>  |                     |                        |                        |                       |                       |                      |                      |                      |                      |
| Orzuelo                             | 0 (0%)              | 0 (0%)                 | 1<br>(25%)             | 0 (0%)                | 0 (0%)                | 0 (0%)               | 0 (0%)               | 0 (0%)               | 0 (0%)               |
| síntomas de resfriado               | 1 (3%)              | 0 (0%)                 | 0 (0%)                 | 0 (0%)                | 0 (0%)                | 0 (0%)               | 0 (0%)               | 0 (0%)               | 0 (0%)               |

|                           |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>Sistema nervioso</b>   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Episodio vasovagal</b> | 1 (3%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| <b>Respiratorio</b>       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Tos</b>                | 1 (3%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| <b>Dolor de garganta</b>  | 1 (3%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

### 13.3. Conclusiones

5 Este estudio de fase I, que administró una preparación de una solución estéril que comprende un complejo de lipoproteína cargado negativamente de Fórmula H en dosis IV únicas de 0,25, 0,75 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 30,0 y 45,0 mg/kg, dio lugar a las siguientes conclusiones.

10 La preparación fue bien tolerado en todas las dosis en todos los sujetos con un perfil de efectos adversos similar al observado con placebo. El complejo no parece afectar a los parámetros de la química clínica, hematología o coagulación de forma diferente que al placebo. No se observaron efectos adversos en ECG. No se detectaron anticuerpos para ApoA-I tras la administración de dosis única.

15 Las concentraciones plasmáticas de ApoA-I y esfingomielina aumentaron con la dosis: los niveles de ApoA-I volvieron a la línea de base en 24 horas después de la dosis para dosis de hasta 10 mg/kg y en 72 horas después de la dosis para las dosis superiores a 10 mg/kg. Los niveles de esfingomielina volvieron a la línea de base en 24 horas después de la dosis para dosis de hasta 5 mg/kg, en 72 horas después de la dosis para las dosis de 10 a 30 mg/kg, y en 7 días después de la dosis para los sujetos dosificados con 45 mg/kg.

20 La movilización del colesterol aumentó con dosis crecientes: se observó movilización en la fracción HDL de colesterol libre con dosis tan bajas como 2,0 mg/kg (incremento medio del 23% del valor basal) y aumentó con la dosis. Los niveles de triglicéridos se incrementaron transitoriamente por encima de los niveles observados con placebo en dosis de 15 mg/kg y superiores.

25 Además, la administración del complejo no aumentó significativamente los niveles de transaminasas hepáticas, y en todos los casos, los niveles se mantuvieron dentro del intervalo normal. Esto está en contraste con CSL-111, una ApoA-I reconstituida humana purificada a partir de plasma complejado con fosfatidilcolina de soja, que se ha observado que eleva los niveles de alanina aminotransferasa hasta más de 100 veces el límite superior normal en algunos pacientes, cuando se administra a una dosis de 80 mg/kg de peso del paciente. Tardif et al, 2007, JAMA 297: 1675-1682.

30 Por lo tanto, los complejos de la descripción se pueden administrar en dosis más bajas que los descritos para otras preparaciones que imitan HDL y todavía logran mejoras clínicamente significativas en los parámetros de lípidos sin efectos secundarios perjudiciales.

### 35 14. EJEMPLO 9: ESTUDIO CLÍNICO EN FASE II DE LOS COMPLEJOS DE APOA-I/SM/DPPG EN EL TRATAMIENTO DE SUJETOS CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO

40 Se llevó a cabo un ensayo clínico para confirmar adicionalmente el beneficio terapéutico de dosis bajas de complejos de lipoproteínas cargadas negativamente de Fórmula H (ApoA-I, esfingomielina de huevo (SM de huevo) y DPPG, en una relación en peso de apolipoproteína:fosfolípido de 1:2,7, con una relación en peso de SM de huevo con respecto a DPPG de 97:3) en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. La ApoA-I se prepara mediante la expresión en células CHO tal como se describe anteriormente en los Ejemplos 1, y los complejos son generados mediante los procedimientos de termociclado del Ejemplo 4.

45 Los sujetos que presentan síntomas de ACS son elegibles para ser seleccionados para este estudio. En el momento de la cateterización de línea de base, los sujetos deben tener una adecuada evaluación de ultrasonido intravascular (IVUS) de una arteria "diana" para IVUS que no esté influenciada por PCI previa o presente, y los 4 cm proximales de la arteria diana deben tener una estenosis de diámetro entre 0 y 50% mediante la evaluación angiográfica visual, un diámetro de referencia  $\geq 2,5$  mm y estar libre de defectos de llenado sugestivos de trombos. Una vez que la IVUS basal ha sido evaluada por el laboratorio central de IVUS de calidad general, la presencia de un vaso diana adecuada y la ausencia de factores técnicos que pueden impedir la lectura exacta de las imágenes de IVUS, el sujeto se asigna al azar para recibir una infusión intravenosa, administrada durante una hora, de placebo o de una de tres dosis de los complejos (3, 6, o 12 mg/kg). Los sujetos aleatorizados vuelven a intervalos semanales (es decir, cada 7 a 11 días) para cinco infusiones adicionales. Los laboratorios de fin de tratamiento se extraen una semana (5 a 9 días) después de la última infusión. Una IVUS de seguimiento se lleva a cabo aproximadamente 3 semanas (14 a 35 días) después de la última infusión. Una visita de seguimiento se produce aproximadamente 6 meses (+/- 2 semanas) después de la última infusión para recoger muestras para las pruebas de anticuerpo anti-Apo AI y para monitorizar los puntos finales de los principales eventos cardíacos adversos (MACE).

60 El criterio de valoración principal es el cambio nominal en el volumen total de la placa en un segmento de 30 mm de la arteria coronaria diana evaluada por IVUS tridimensional. Otras medidas de eficacia incluyen el cambio porcentual

en el volumen de la placa y el cambio porcentual en el volumen de ateroma en el segmento de 30 mm diámetro, el cambio en el volumen de vasos totales en el segmento de 30 mm diámetro, así como los cambios en los volúmenes de la placa, lumen y vasos totales con respecto a la línea de base para el seguimiento en segmentos anatómicamente comparables de 5 mm centrados en el sitio con la carga de la placa más pequeña en la línea base y la carga de placas más grande en la línea base en una IVUS tridimensional. El cambio porcentual en el volumen de la placa se calcula como el cambio nominal dividido por el valor de la línea de base, multiplicado por 100. El porcentaje del volumen de ateroma (obstruktiva) se calcula dividiendo el volumen de placa entre el volumen de la membrana externa elástica (EEM) y a continuación multiplicando por 100.

# 10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CERENIS THERAPEUTICS HOLDING S.A.

<120> COMPLEJOS DE LIPOPROTEÍNAS Y FABRICACIÓN Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 376201-015WO (114437)

<140>

<141>

<150> US 61/487,263

<151> 2011-05-17

<150> US 61/452,630

<151> 2011-03-14

<150> US 61/440,371

<151> 2011-02-07

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp  
20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp  
35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys  
50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr  
65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp  
85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys  
100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

# ES 2 717 455 T3

|    | 115                                                                                     | 120 | 125 |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 5  | Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu<br>130 135 140          |     |     |
| 10 | Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu<br>145 150 155 160      |     |     |
| 15 | Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala<br>165 170 175          |     |     |
| 20 | Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp<br>180 185 190          |     |     |
| 25 | Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn<br>195 200 205          |     |     |
| 30 | Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu<br>210 215 220          |     |     |
| 35 | Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln<br>225 230 235 240      |     |     |
| 40 | Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala<br>245 250 255          |     |     |
| 45 | Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln<br>260 265                                  |     |     |
| 50 | <210> 2<br><211> 18<br><212> PRT<br><213> Homo sapiens                                  |     |     |
| 55 | <220><br><221> SEÑAL<br><222> (1)..(18)                                                 |     |     |
| 60 | <400> 2<br>Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser<br>1 5 10 15 |     |     |
| 65 | Gln Ala                                                                                 |     |     |
| 70 | <210> 3<br><211> 6<br><212> PRT<br><213> Homo sapiens                                   |     |     |
| 75 | <220><br><221> PROPEP<br><222> (1)..(6)                                                 |     |     |

<400> 3  
 Arg His Phe Trp Gln Gln  
 1 5

5

<210> 4  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (22)..(22)  
 <223> Ácido Isonipecótico

20

<400> 4  
 Lys Leu Lys Gln Lys Leu Ala Glu Leu Leu Glu Asn Leu Leu Glu Arg  
 1 5 10 15

25

Phe Leu Asp Leu Val Xaa  
 20

## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una población de complejos de lipoproteínas, comprendiendo cada una
  - (a) una fracción lipídica que comprende al menos un lípido neutro y al menos un lípido cargado negativamente; y
  - (b) una fracción de apolipoproteína que consiste esencialmente en una apolipoproteína A-I ("ApoA-I"), en la que
    - (i) al menos el 80% de la apolipoproteína en la composición está en forma de complejo;
    - (ii) al menos el 80% del lípido en la composición está en forma de complejo;
    - (iii) no más del 20% de los residuos de metionina en la apolipoproteína están oxidados;
    - (iv) la distribución del tamaño de los complejos de lipoproteínas es al menos un 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 97% homogénea, tal como se refleja por un solo pico en la cromatografía de permeación en gel, y
    - (v) la población no contiene ningún detergente.
2. Composición, según la reivindicación 1, **caracterizada** además por una, dos, tres o cuatro de las siguientes características:
  - (a) al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% de los complejos de lipoproteína están en forma de partículas de 4 nm a 15 nm de tamaño, de 6 nm a 15 nm de tamaño, de 4 nm a 12 nm de tamaño, de 6 nm a 12 nm de tamaño o de 8 nm a 12 en tamaño, medido por cromatografía de permeación en gel ("GPC") o dispersión de luz dinámica ("DLS");
  - (b) al menos el 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% en peso de ApoA-I en dicha población está en forma madura;
  - (c) no más del 25%, no más del 20%, no más del 15%, no más del 10% o no más del 5% en peso de ApoA-I en dicha población está en forma inmadura; y
  - (d) no más del 25%, no más del 20%, no más del 15%, no más del 10%, no más del 5% en peso de ApoA-I en la población está en forma trunca.
3. Composición, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que al menos el 98% en peso de la ApoA-I en la población es ApoA-I no trunca.
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** además por una, dos, tres, cuatro o cinco de las siguientes características:
  - (a) no más del 20%, no más del 15%, no más del 10 %, no más del 5%, no más del 3%, no más del 2% o no más del 1% de cada una de metionina 112 y metionina 148 en dicha ApoA-I en dicha población están oxidadas;
  - (b) no más del 15%, no más del 10%, no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2% o no más del 1% de los aminoácidos de la ApoA-I en dicha población están desamidados;
  - (c) la población no contiene más de 1 UE, no más de 0,5 UE, no más de 0,3 UE o no más de 0,1 UE de endotoxina por miligramo de ApoA-I;
  - (d) la población contiene no más de 100 picogramos, no más de 50 picogramos, no más de 25 picogramos, no más de 10 picogramos o no más de 5 picogramos de ADN de célula huésped por miligramo de ApoA-I; y
  - (e) la población contiene no más de 500 nanogramos, no más de 200 nanogramos, no más de 100 nanogramos, no más de 50 nanogramos o no más de 20 nanogramos de proteína de célula huésped por miligramo de ApoA-I.
5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene no más de 200 ppm, no más de 100 ppm o no más de 50 ppm de un disolvente no acuoso.
6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, producida mediante un proceso que no comprende una etapa de fraccionamiento por tamaño para la purificación de los complejos de lipoproteínas.
7. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que no más del 15%, o no más del 10%, no más del 5% o no más del 2% en peso del lípido en la fracción lipídica en dichos complejos es colesterol.
8. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha ApoA-I es una proteína ApoA-I humana.
9. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicha ApoA-I es una ApoA-I recombinante.
10. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha ApoA-I tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con una proteína correspondiente a los aminoácidos 25 a 267 de la SEQ ID NO: 1.
11. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha fracción lipídica comprende fosfolípidos neutros, opcionalmente en la que los fosfolípidos neutros consisten esencialmente en esfingomielina.
12. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el lípido cargado negativamente consiste esencialmente en 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (DPPG).
13. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la relación molar de los componentes

del lípido cargado negativamente con respecto al fosfolípido neutro y con respecto a la ApoA-I en la población es 2-6:90-120:1.

- 5 14. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha fracción lipídica consiste esencialmente en  
(a) del 95 al 99% en peso de fosfolípido neutro y del 1 al 5% en peso de fosfolípido cargado negativamente; o  
(b) del 96 al 98% en peso de fosfolípido neutro y del 2 al 4% en peso de fosfolípido cargado negativamente.
- 10 15. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha fracción lipídica consiste esencialmente en 97% en peso de fosfolípido neutro y 3% en peso de fosfolípido cargado negativamente, opcionalmente en la que el lípido neutro es esfingomielina natural o esfingomielina sintética, y opcionalmente en la que el lípido tiene un valor de peróxido de menos de 5 meq O/kg, menos de 4 meq O/kg, menos de 3 meq O/kg o menos de 2 meq O/kg.
- 15 16. Composición, según la reivindicación 15, en la que la esfingomielina es esfingomielina de huevo.
17. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en la que el fosfolípido cargado negativamente comprende fosfatidilglicerol.
- 20 18. Composición, según la reivindicación 17 en la que el fosfolípido cargado negativamente comprende o consiste en una sal de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (DPPG).
- 25 19. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que tiene una relación de la fracción de apolipoproteína con respecto a la fracción de fosfolípido que varía de 1:2 a aproximadamente 1:3 en peso.
20. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 97% de la lipoproteína está en forma de complejo.
- 30 21. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en la que al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o 100% de los lípidos están en forma de complejo.
22. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que los complejos de lipoproteínas comprenden además un agente activo hidrófobo, hidrófilo o apolar, opcionalmente en la que el agente activo comprende:  
(a) un ácido graso, un fármaco, un ácido nucleico, una vitamina, un nutriente, o una combinación de los mismos;  
(b) un analgésico, un agente antiinflamatorio, un antihelmíntico, un agente antiarrítmico, un agente antibacteriano, un agente antiviral, un anticoagulante, un antidepresivo, un antidiabético, un antiepiléptico, un agente antifúngico, un agente antigota, un agente antihipertensivo, un agente antimalaria, un agente antimigraña, un agente antimuscarínico, un agente antineoplásico, un agente de mejora de la disfunción eréctil, un inmunosupresor, un agente antiprotosomas, un agente antitiroideos, un agente ansiolítico, un sedante, un agente hipnótico, un neuroléptico, un  $\beta$ -bloqueante, un agente inotrópico cardíaco, un corticosteroide, un diurético, un agente antiparkinsoniano, un agente gastrointestinal, un antagonista del receptor de histamina, un queratolítico, un agente regulador de lípidos, un agente antiangiogénico, un inhibidor de COX-2, un inhibidor de leucotrienos, un macrólido, un relajante muscular, un agente nutricional, un ácido nucleico, que es, opcionalmente, un ARN de interferencia pequeño, un analgésico opioide, un inhibidor de la proteasa, una hormona sexual, un estimulante, un relajante muscular, un agente antiosteoporosis, un agente antiobesidad, un potenciador de la cognición, un agente contra la incontinencia urinaria, un aceite nutricional, un agente contra la hipertrofia de próstata benigna, un ácido graso esencial, un ácido graso no esencial, o una combinación de los mismos; o  
(c) acetretina, albendazol, albuterol, aminoglutetimida, amiodarona, amlodipina, anfetamina, anfotericina B, atorvastatina, atrovacuona, azitromicina, baclofeno, beclometasona, benezepril, benzonatato, betametasona, bicalutanida, budesonida, bupropion, busulfán, butenafina, calcifediol, calcipotriol, calcitriol, camptotecina, candesartán, capsaicina, carbamazepina, carotenos, celecoxib, cerivastatina, cetirizina, clorfeniramina, colecalciferol, cilostazol, cimetidina, cinarizina, ciprofloxacina, cisaprida, claritromicina, clemastina, clomifeno, clomipramina, clopidogrel, codeína, la coenzima Q10, ciclobenzaprina, ciclosporina, danazol, dantroleno, dexclorfeniramina, diclofenaco, dicumarol, digoxina, dehidroepiandrosterona, dihidroergotamina, dihidrotaquisterol, diritromicina, donepezilo, efavirenz, eposartan, ergocalciferol, ergotamina, fuentes de ácidos grasos esenciales, etodolaco, etopósido, famotidina, fenofibrato, fentanilo, fexofenadina, finasteride, fluconazol, flurbiprofeno, fluvastatina, fosfenitoína, frovatriptán, furazolidona, gabapentina, gemfibrozil, glibenclámda, glipizida, gliburida, glimepirida, griseofulvina, halofantrina, ibuprofeno, irbesartán, irinotecán, dinitrato de isosorbida, isotretinoína, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, ketorolac, lamotrigina, lansoprazol, leflunomida, lisinopril, loperamida, loratadina, lovastatina, L-tiroxina, luteína, licopeno, medroxiprogesterona, mifepristona, mefloquina, acetato de megestrol, metadona, metoxsalen, metronidazol, miconazol, midazolam, miglitol, minoxidil, mitoxantrona, montelukast, nabumetona, nalbufina, naratriptán, nelfinavir, nifedipino, nilsolidipina, nilutanida, nitrofurantoína, nizatidina, omeprazol, oprevelkin, estradiol, oxaprozina, paclitaxel, paracalcitol, paroxetina, pentazona, pioglitazona, pizofetin, pravastatina, prednisolona, probucol, progesterona, pseudoefedrina, piridostigmina, rabeprazol, raloxifeno, rofecoxib, repaglinida, rifabutina, rifapentina, rimexolona, ritanovir, rizatriptán, rosiglitazona, saquinavir, sertralina, sibutramina,

- 5 citrato de sildenafil, simvastatina, sirolimus, espironolactona, sumatriptán, tacrina, tacrolimus, tamoxifeno, tamsulosina, targretina, tazaroteno, telmisartan, tenipósido, terbinafina, terazosina, tetrahidrocannabinol, tiagabina, ticlopidina, tirofibrán, tizanidina, topiramato, topotecán, toremifeno, tramadol, tretinoína, troglitazona, trovafloxacin, ubidecarenona, valsartán, venlafaxina, verteporfina, vigabatrina, vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, zafirlukast, zileuton, zolmitriptán, zolpidem y zopiclona o una sal de cualquier de los anteriores.
23. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que está en forma de una composición farmacéutica y comprende además uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 24. Forma de dosificación unitaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la reivindicación 23.
25. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que los complejos de lipoproteínas comprenden además un marcador, opcionalmente en la que:
- 15 (a) la ApoA-I está marcada con el marcador;  
 (b) uno o más de los lípidos en la fracción lipídica están marcados con el marcador;  
 (c) el marcador comprende:
- 20 (i) un radiomarcador, que es opcionalmente  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ;  
 (ii) un marcador fluorescente;  
 (iii) un marcador enzimático;  
 (iv) un colorante;  
 o
- 25 (d) una combinación de (a) - (c).
26. Composición, según la reivindicación 25, que está en forma de una composición farmacéutica y comprende adicionalmente uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

# ES 2 717 455 T3

|                    |                           |                    |            |
|--------------------|---------------------------|--------------------|------------|
| 1                  | 2                         | 3                  | 4          |
| 1234567890         | 1234567890                | 1234567890         | 1234567890 |
| <b>MKAAVLT LAV</b> | <b>LFLTGSQA</b> <u>RH</u> | <u>FWQQ</u> DEPPQS | PWDRVKDLAT |
| 5                  | 6                         | 7                  | 8          |
| 1234567890         | 1234567890                | 1234567890         | 1234567890 |
| VYVDVLKDSG         | RDYVSQFEGS                | ALGKQLNLKL         | LDNWDSVTST |
|                    | 1                         | 1                  | 1          |
| 9                  | 0                         | 1                  | 2          |
| 1234567890         | 1234567890                | 1234567890         | 1234567890 |
| FSKLREQ LGP        | VTQEFWDNLE                | KETEG LRQEM        | SKDLEEVKAK |
| 1                  | 1                         | 1                  | 1          |
| 3                  | 4                         | 5                  | 6          |
| 1234567890         | 1234567890                | 1234567890         | 1234567890 |
| VQPYLDDFQK         | KWQEEME LYR               | QKVEPLRAEL         | QEGARQKLHE |
| 1                  | 1                         | 1                  | 2          |
| 7                  | 8                         | 9                  | 0          |
| 1234567890         | 1234567890                | 1234567890         | 1234567890 |
| LQEKLSPLGE         | EMRDRARAHV                | DALRTHLAPY         | SDELRQRLAA |
| 2                  | 2                         | 2                  | 2          |
| 1                  | 2                         | 3                  | 4          |
| 1234567890         | 1234567890                | 1234567890         | 1234567890 |
| RLEALKENGG         | ARLA EYHAKA               | TEHLSTLSEK         | AKPALEDLRQ |
| 2                  | 2                         |                    |            |
| 5                  | 6                         |                    |            |
| 1234567890         | 1234567890                | 1234567            |            |
| GLLPVLESFK         | VSFLSALE EY               | TKKLNTQ            |            |

FIG. 1

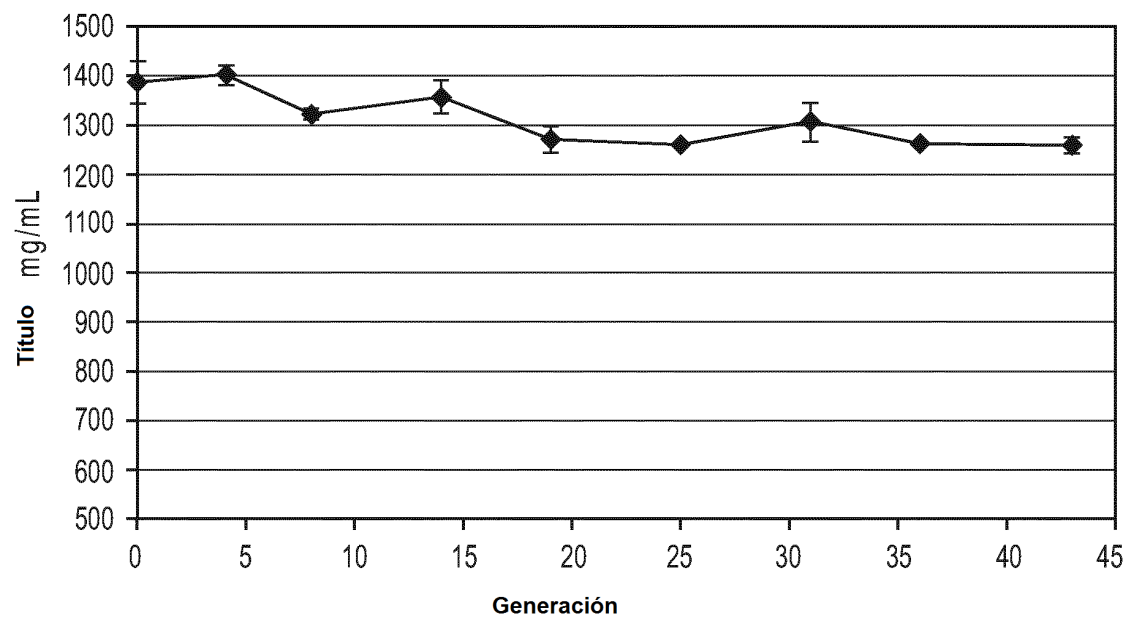


FIG. 2

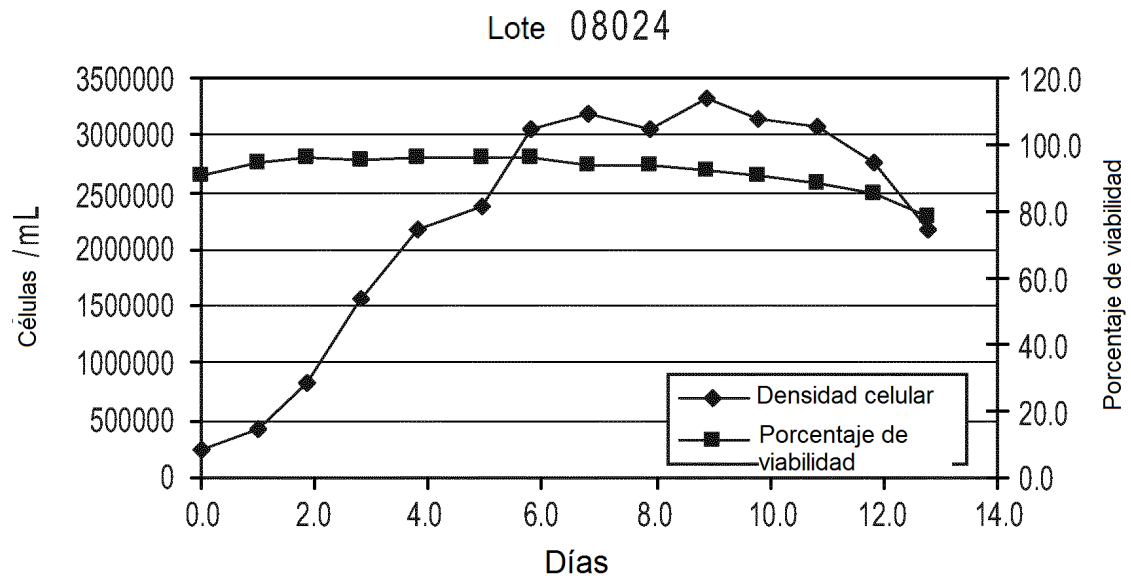


FIG. 3A

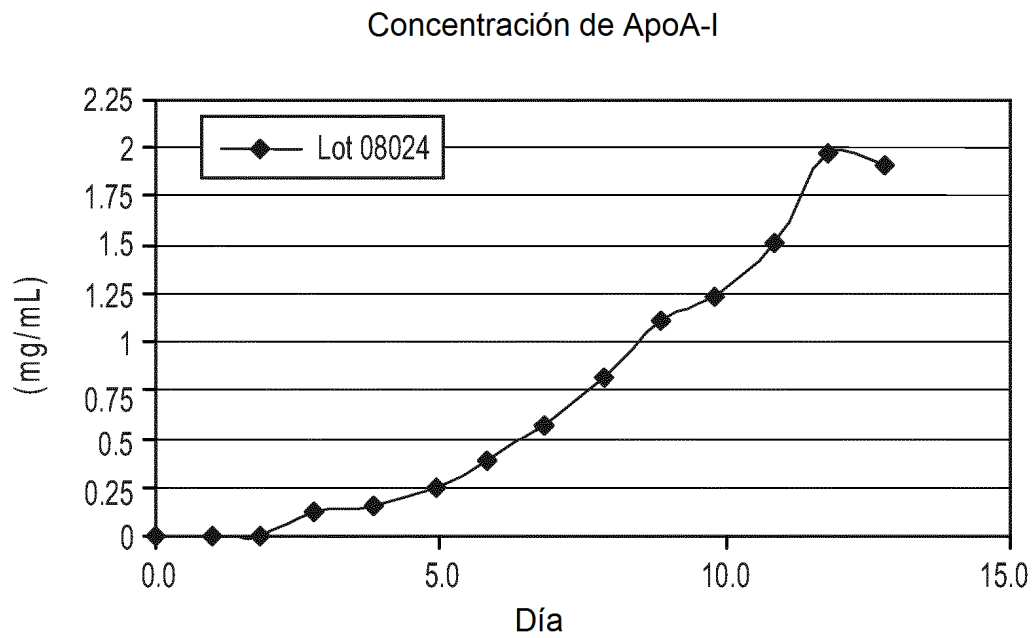


FIG. 3B

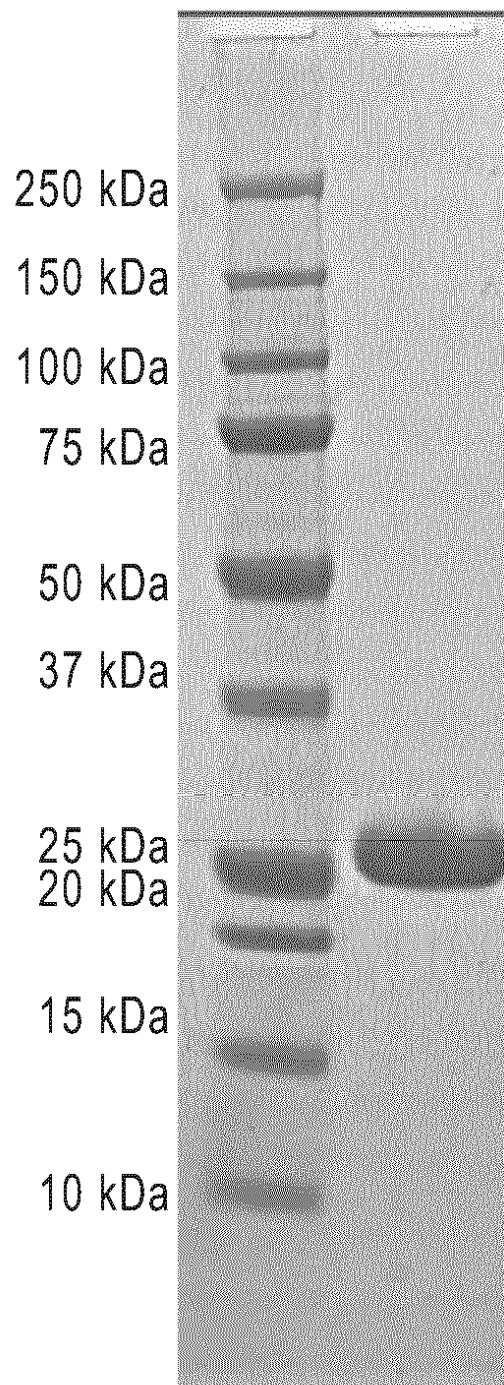


FIG. 4

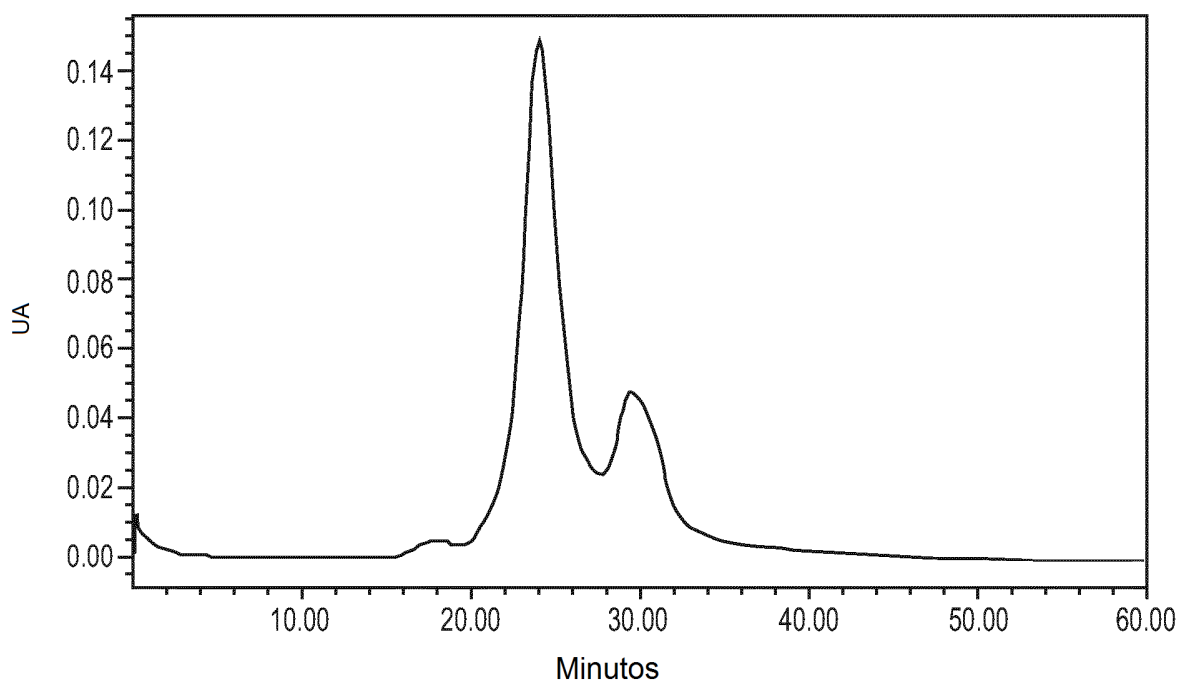


FIG. 5A

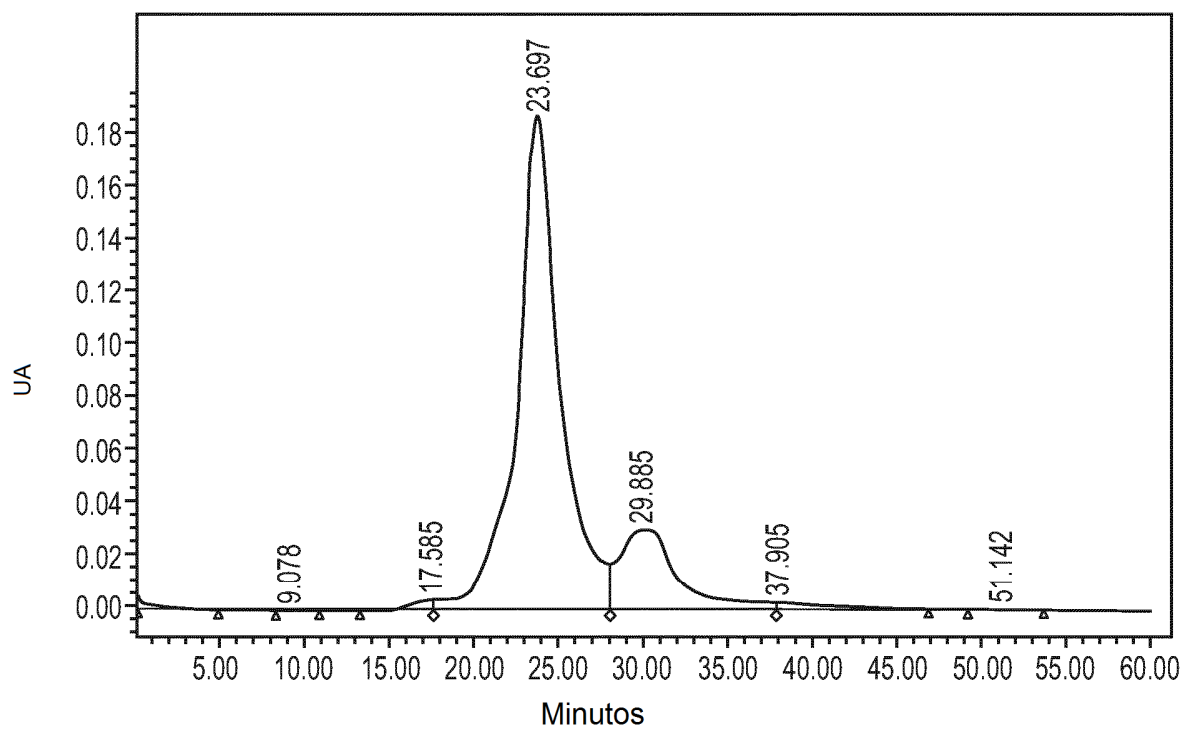


FIG. 5B

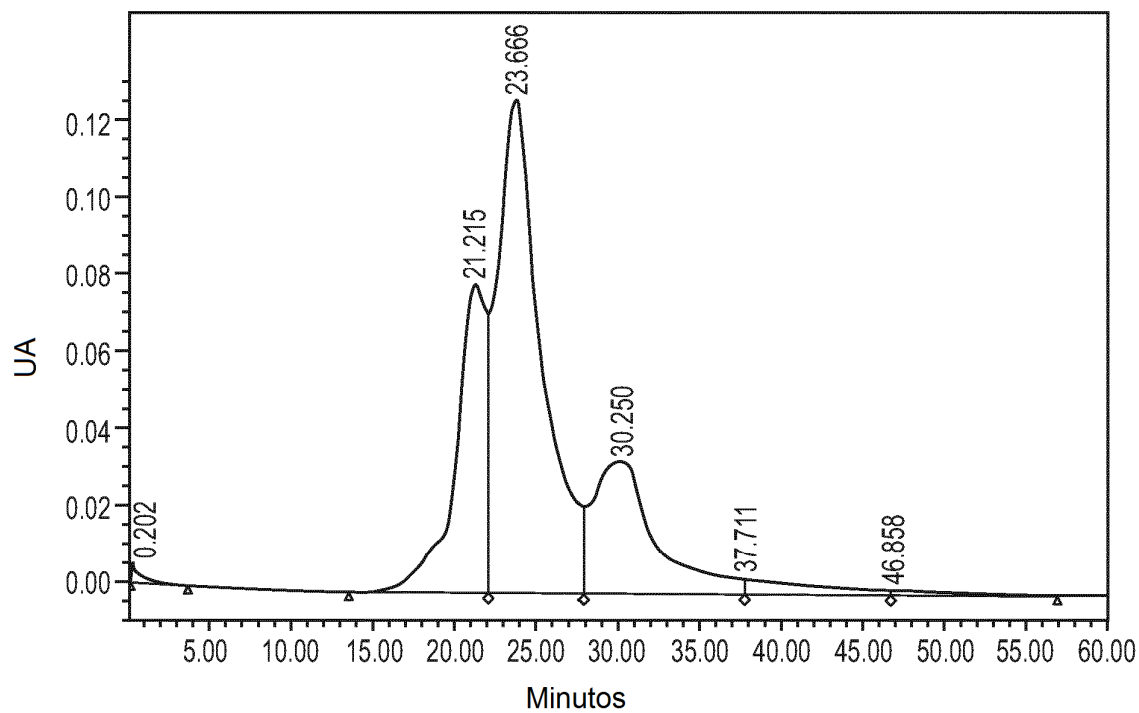


FIG. 5C

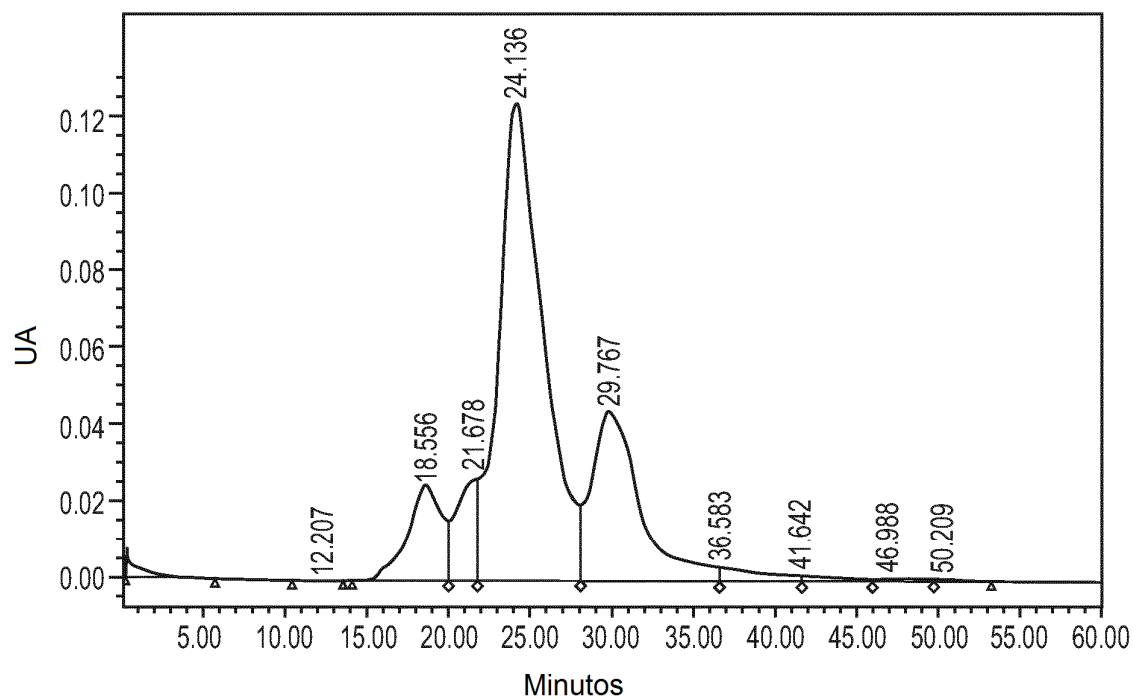


FIG. 5D

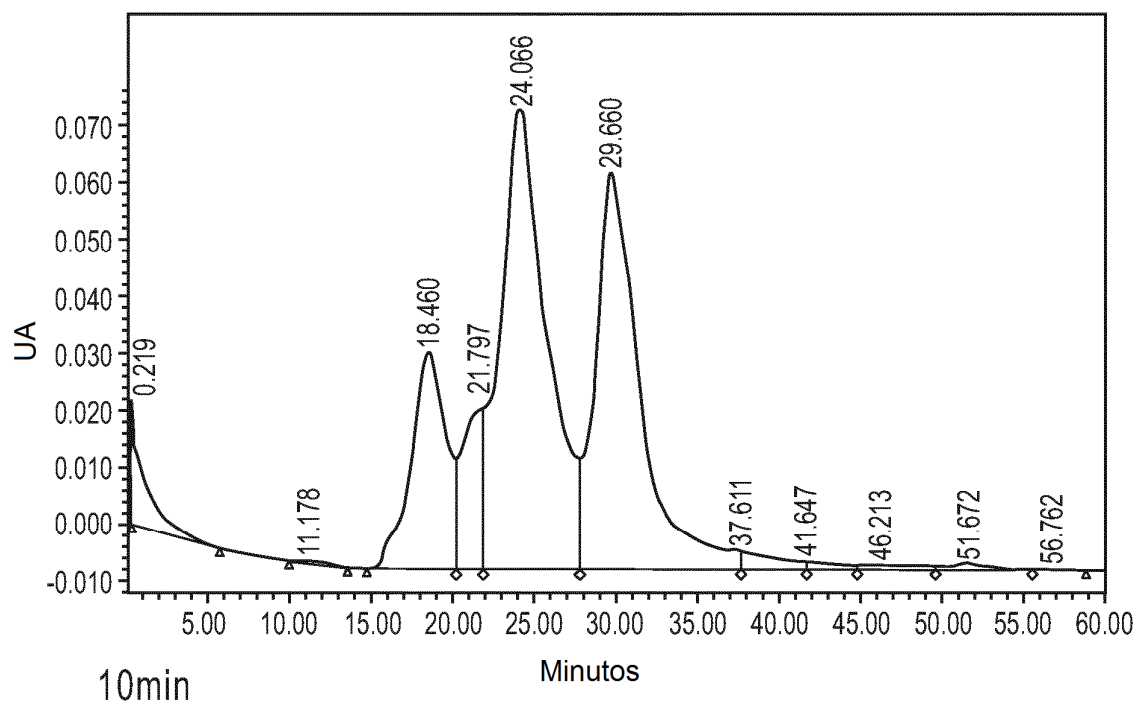


FIG. 6A

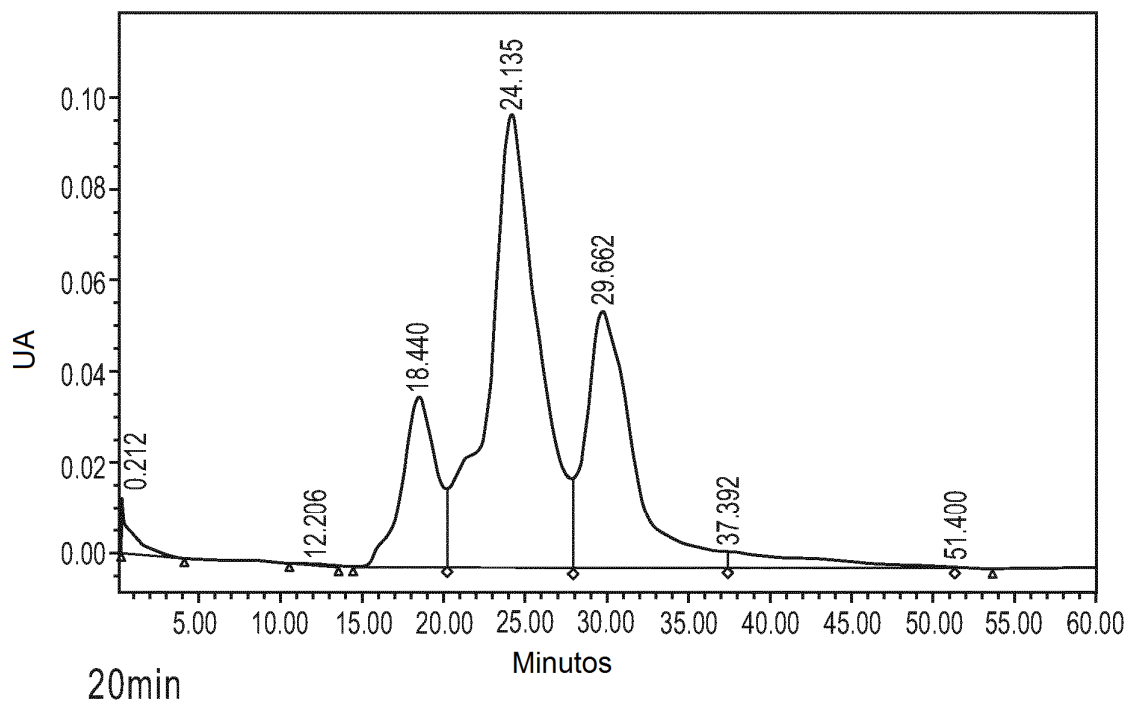


FIG. 6B

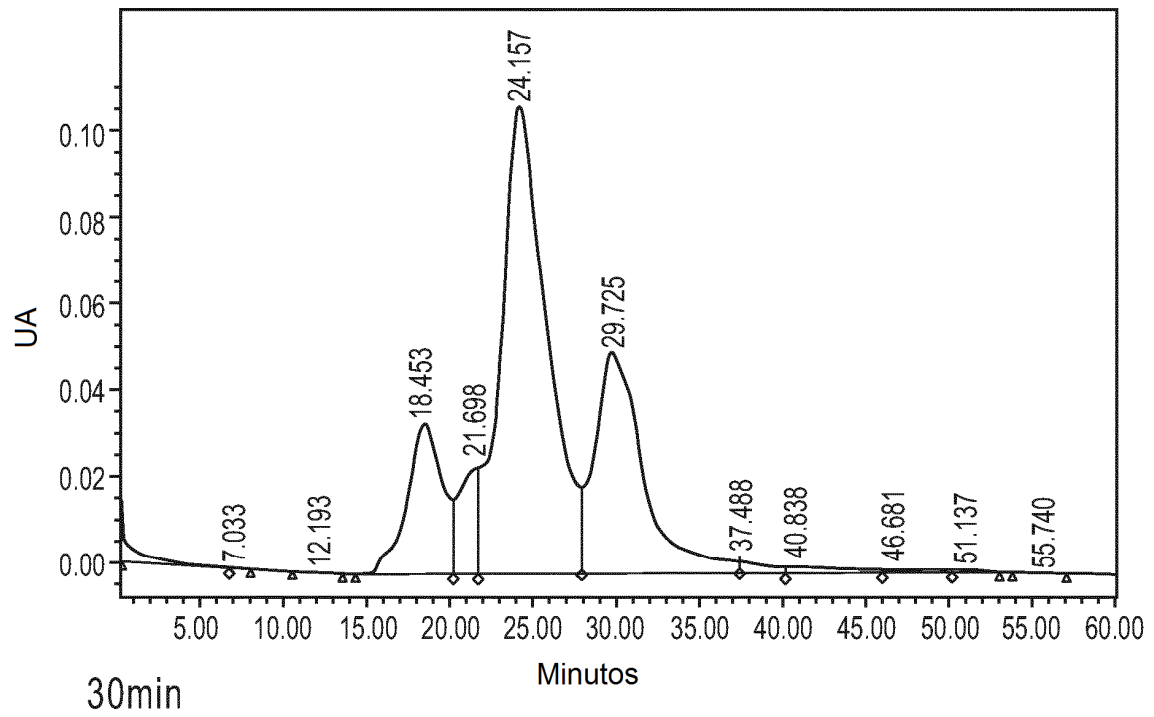


FIG. 6C

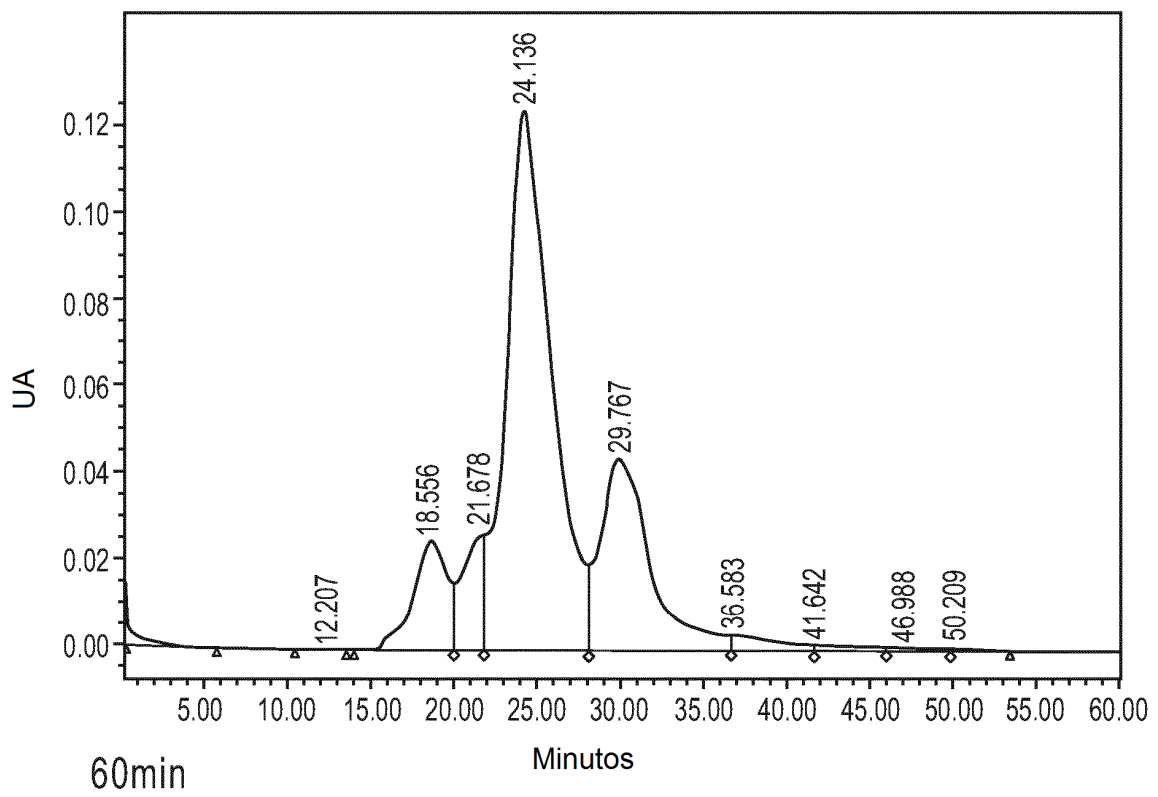


FIG. 6D

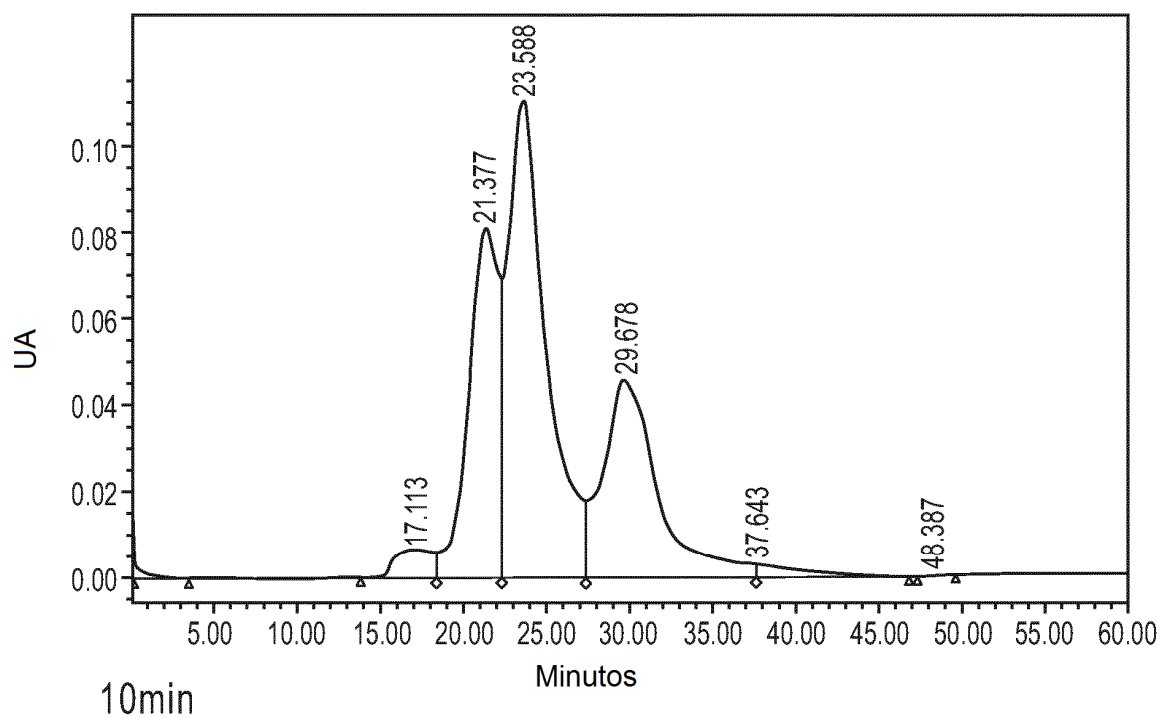


FIG. 7A

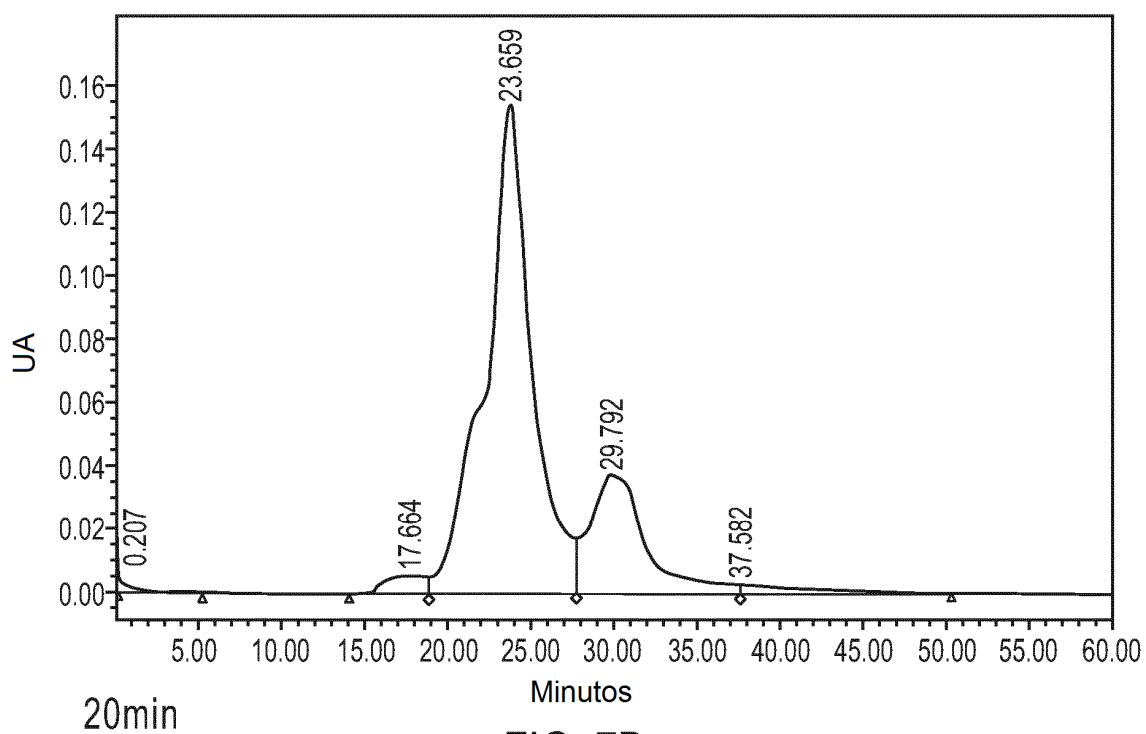


FIG. 7B

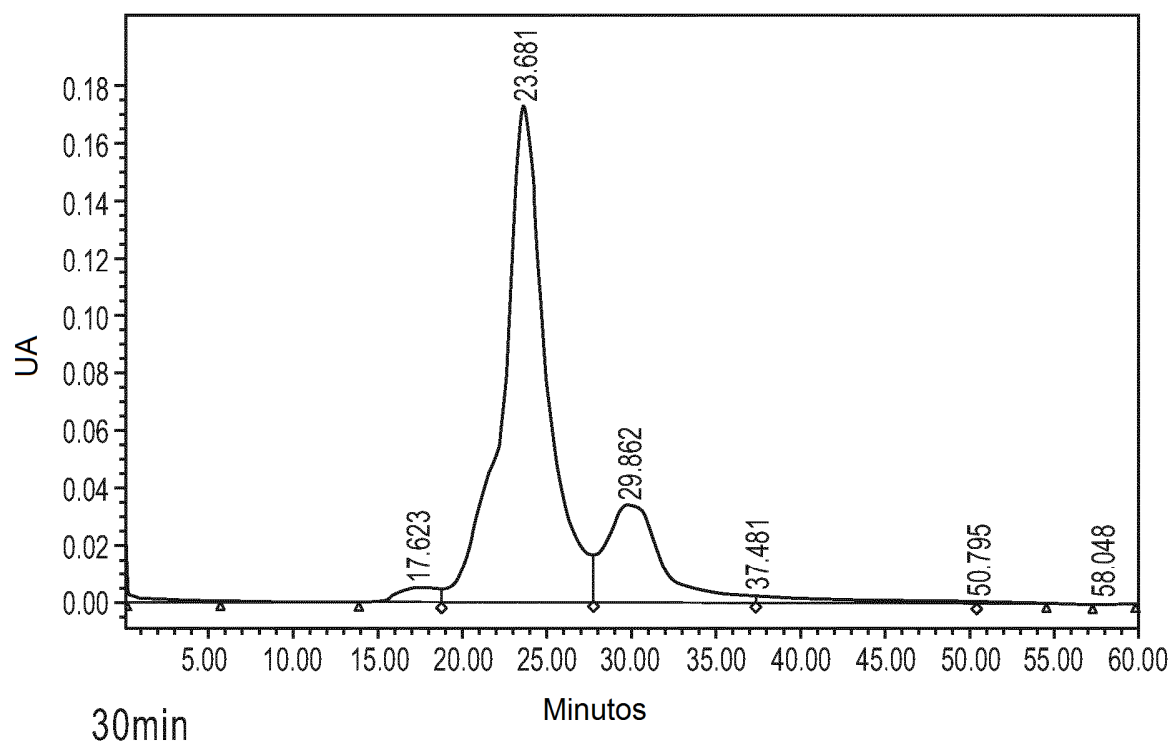


FIG. 7C

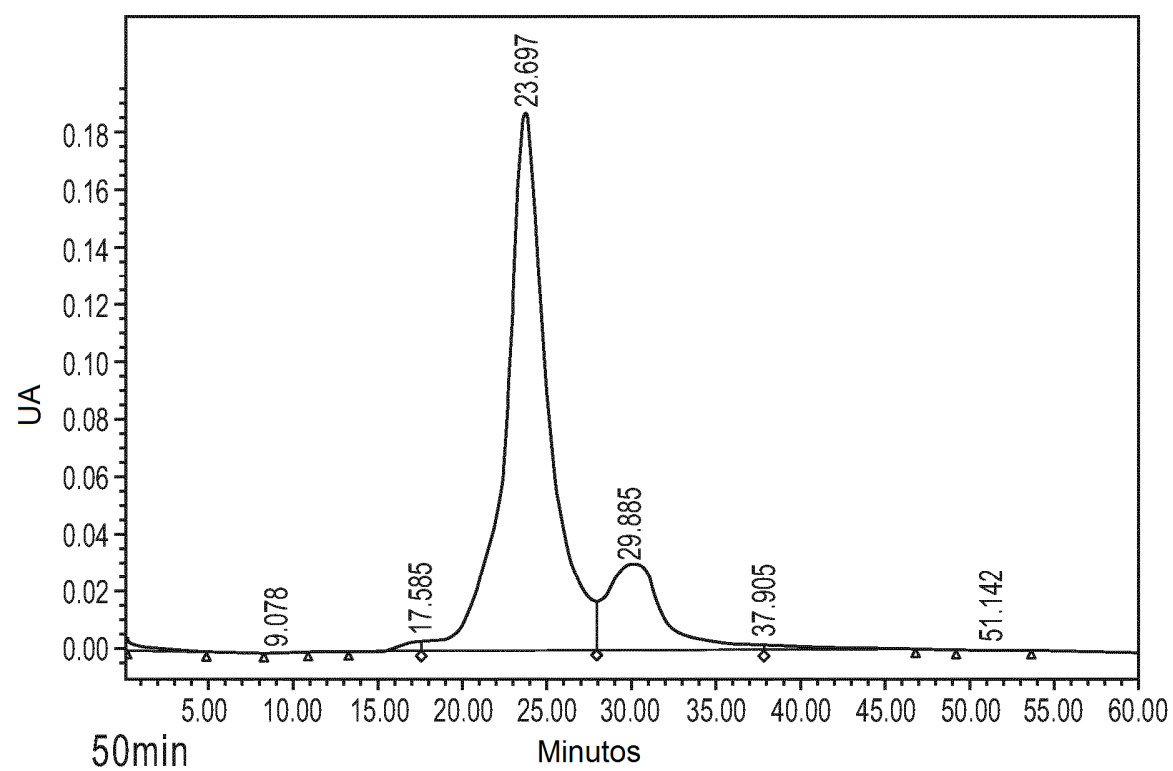
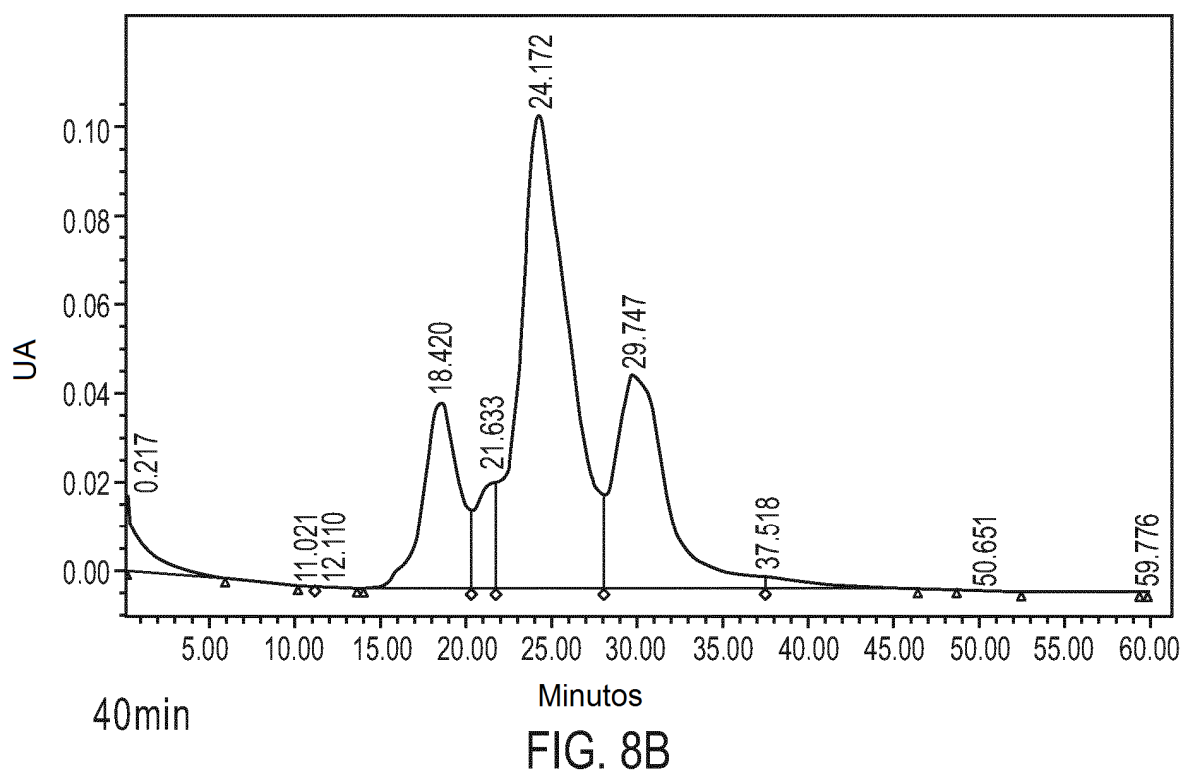
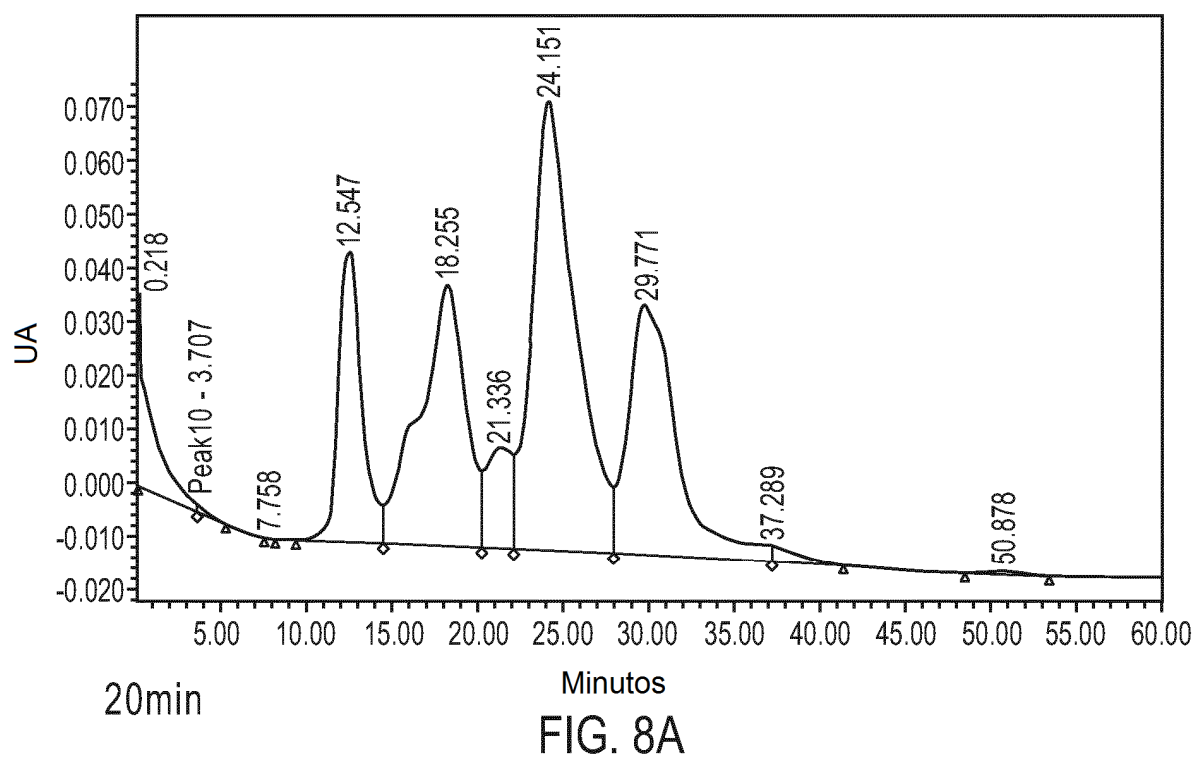


FIG. 7D



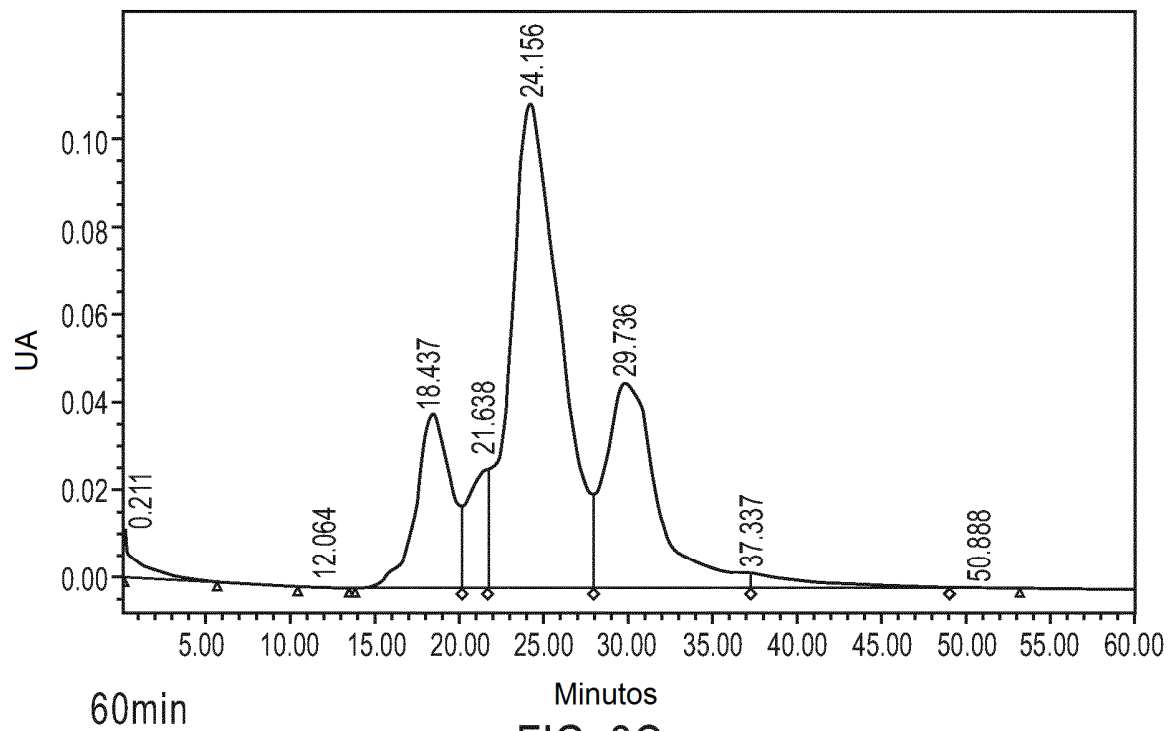


FIG. 8C

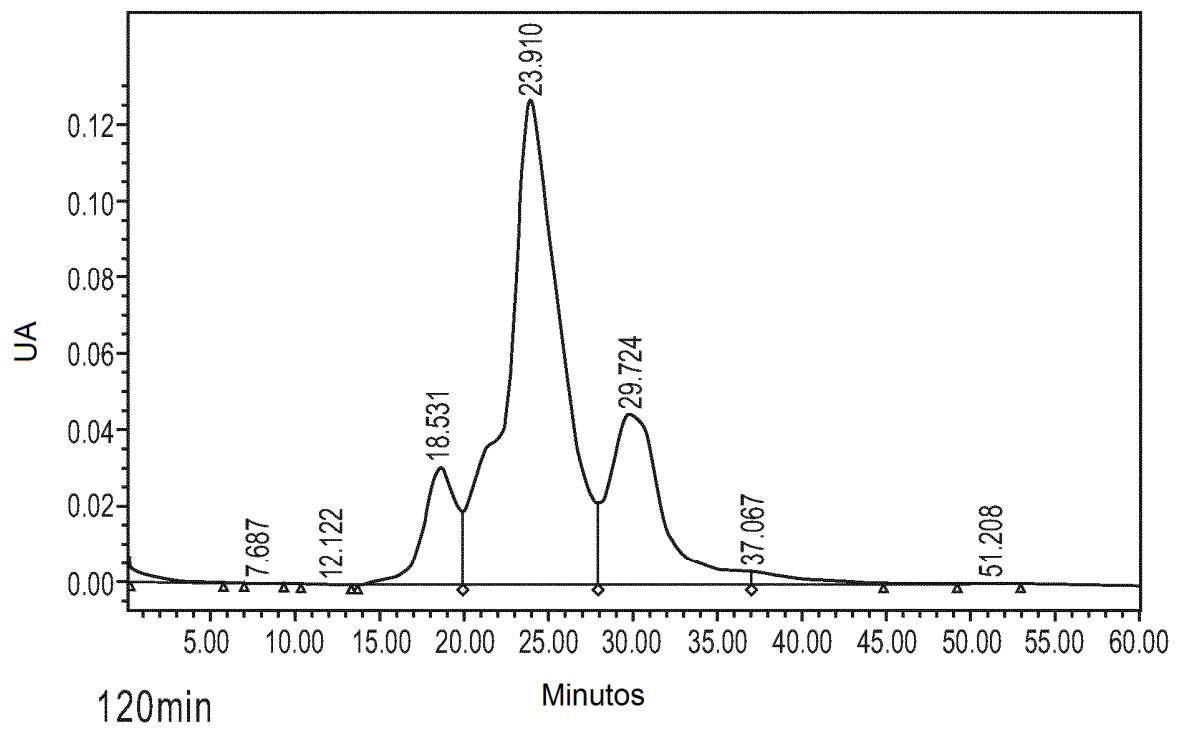


FIG. 8D

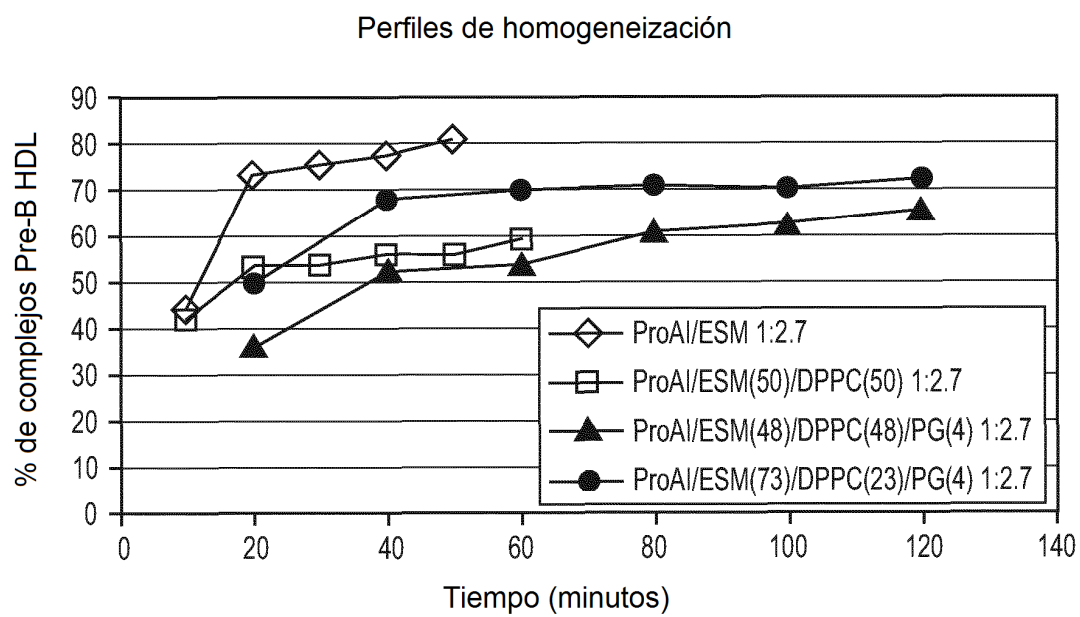


FIG. 9

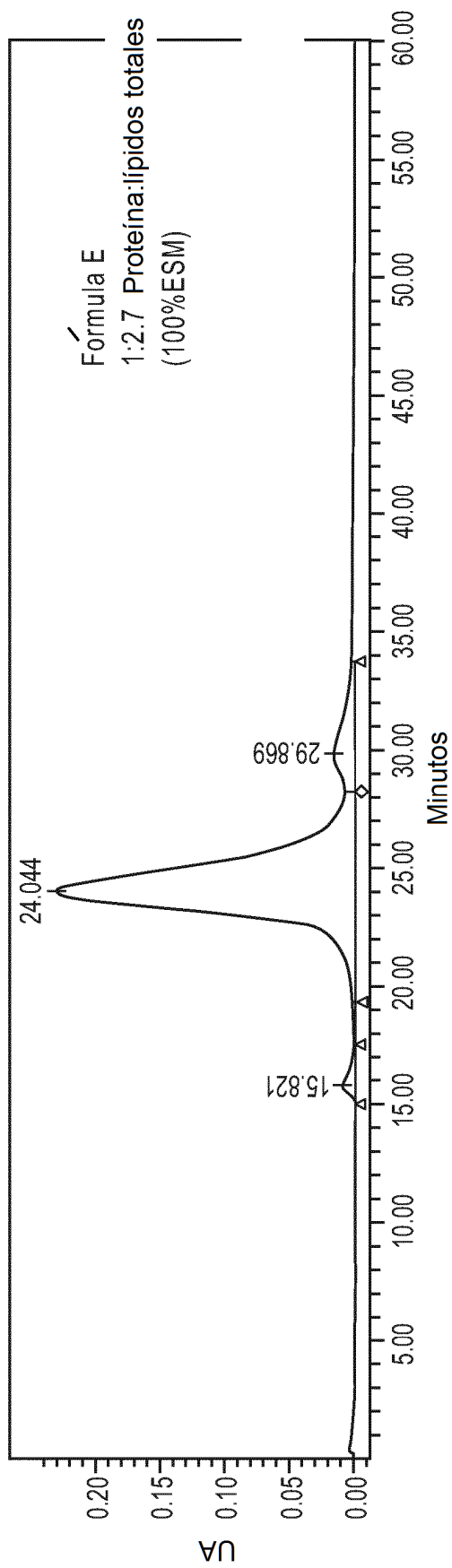


FIG. 10A

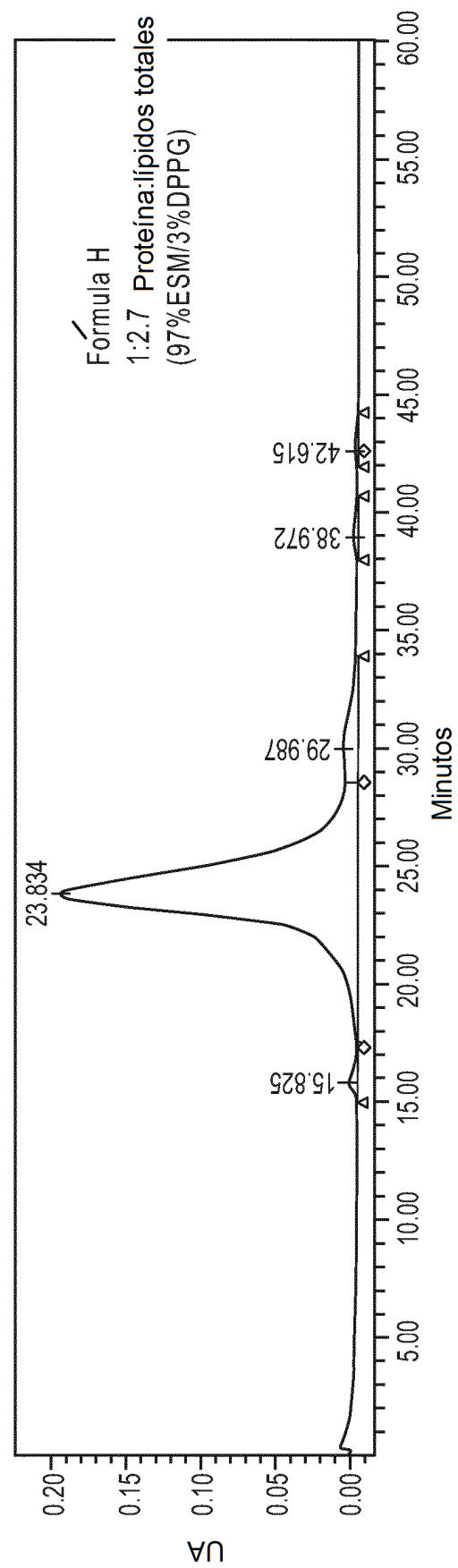


FIG. 10B

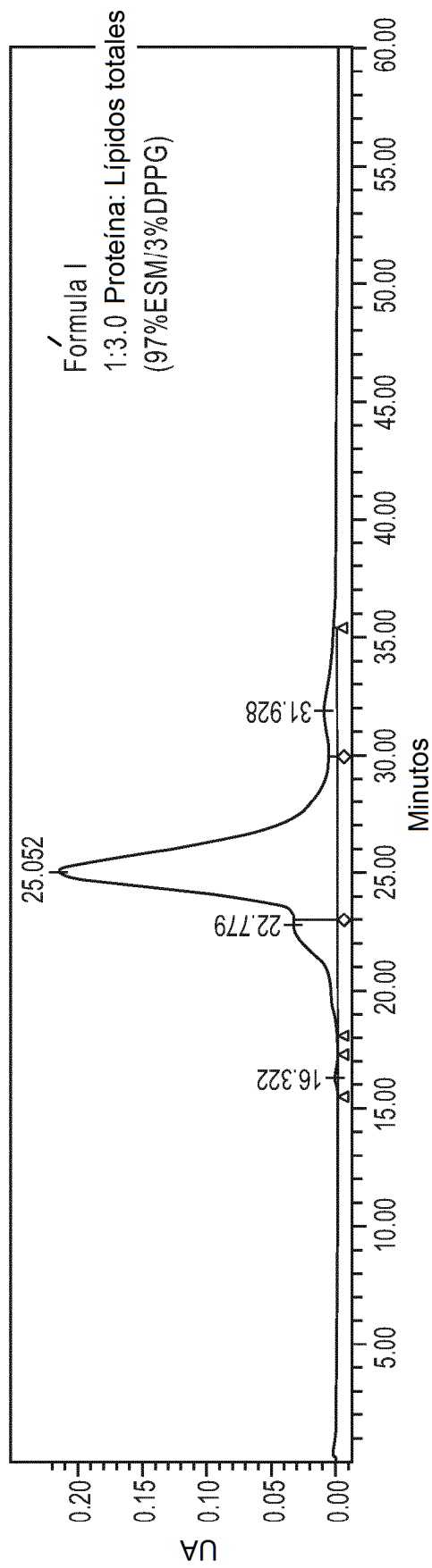


FIG. 10C

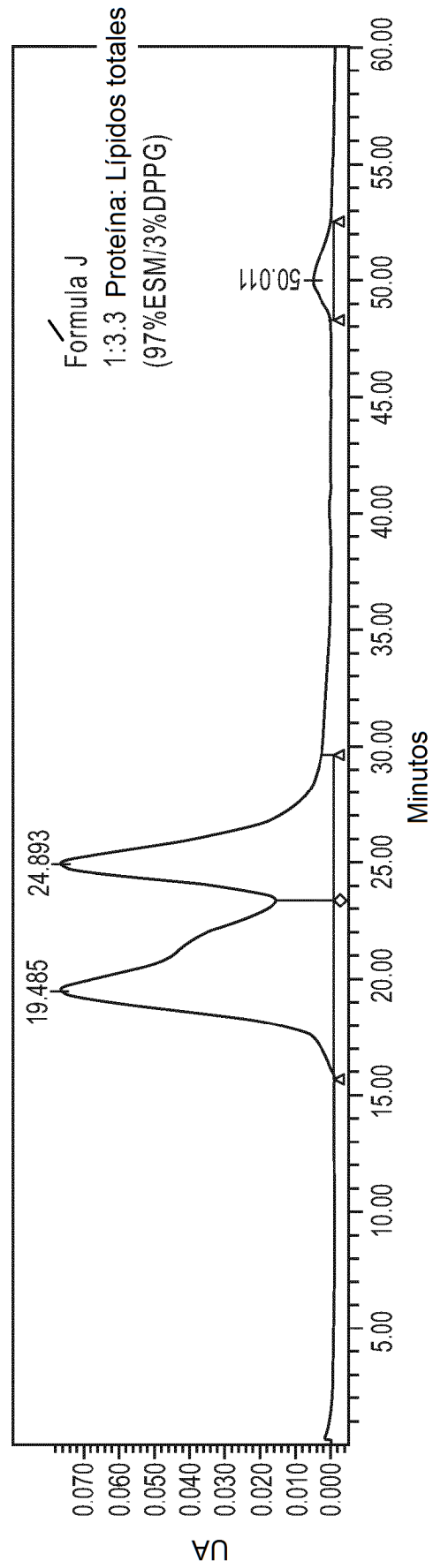


FIG. 10D

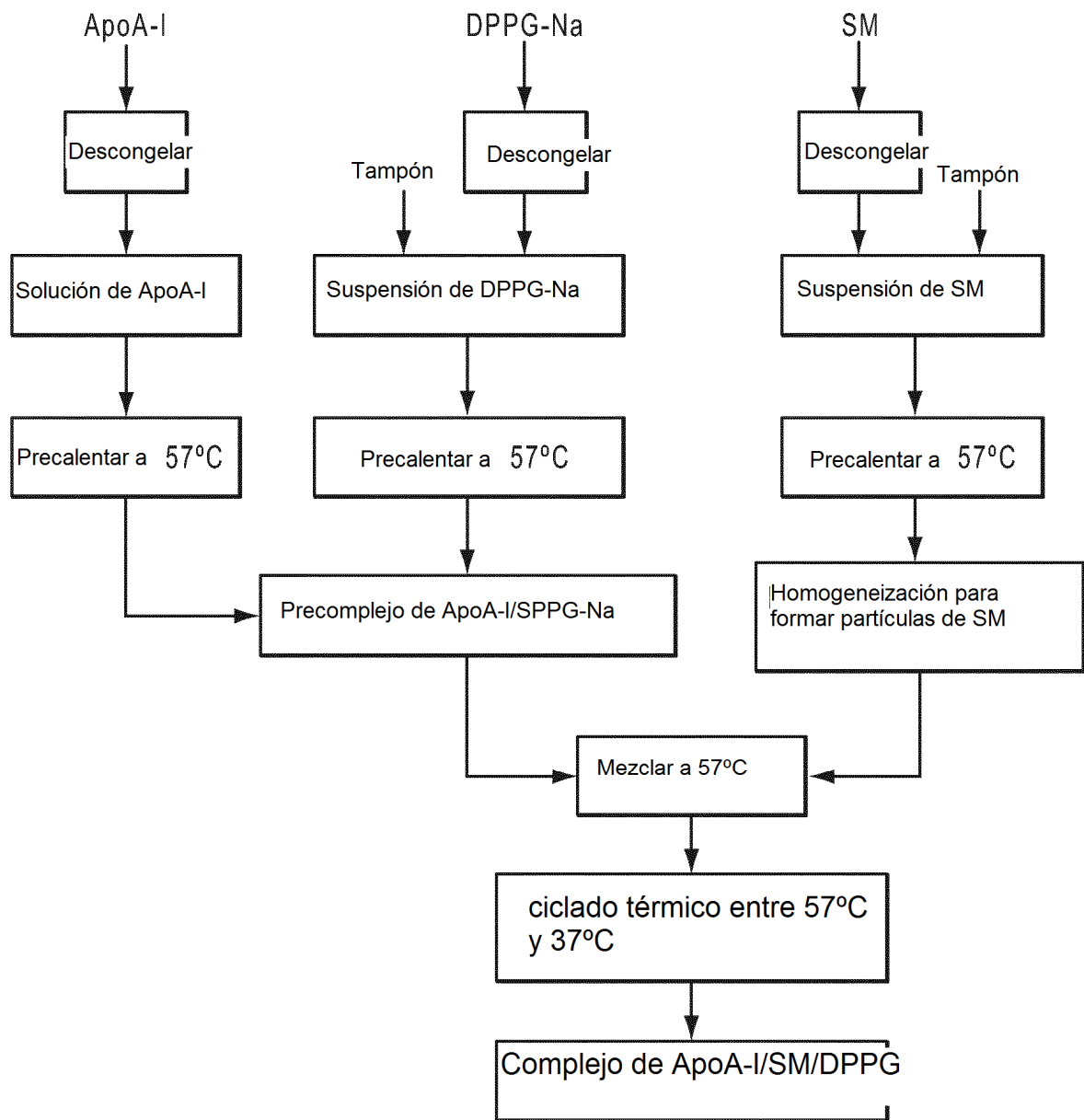


FIG. 11

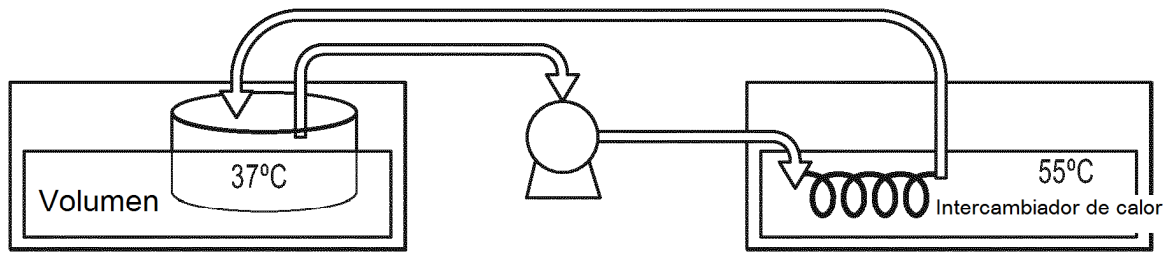


FIG. 12

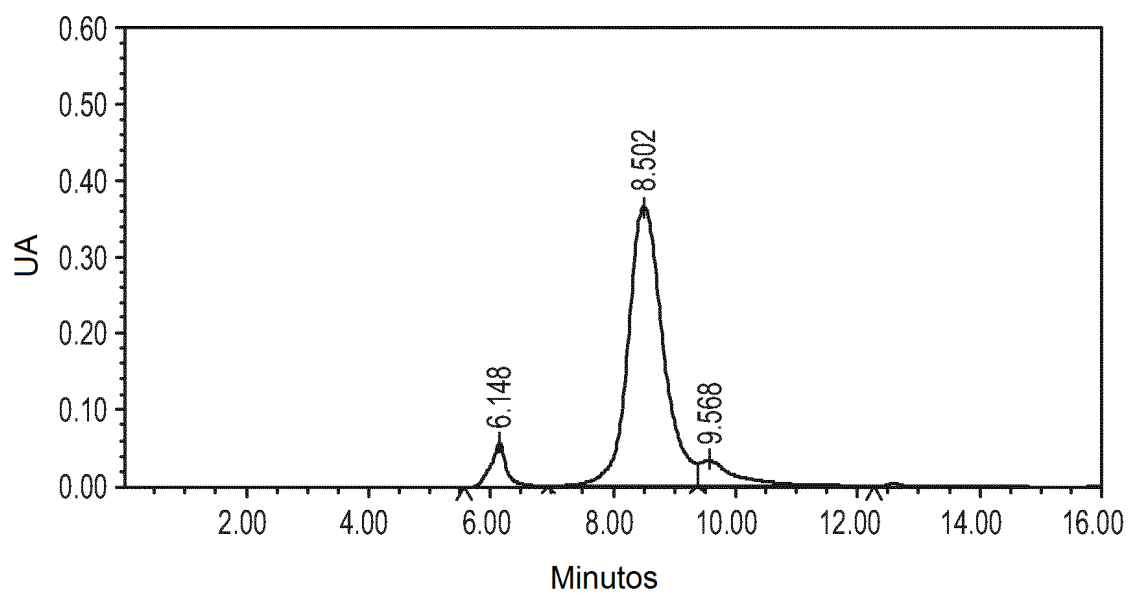


FIG. 13A

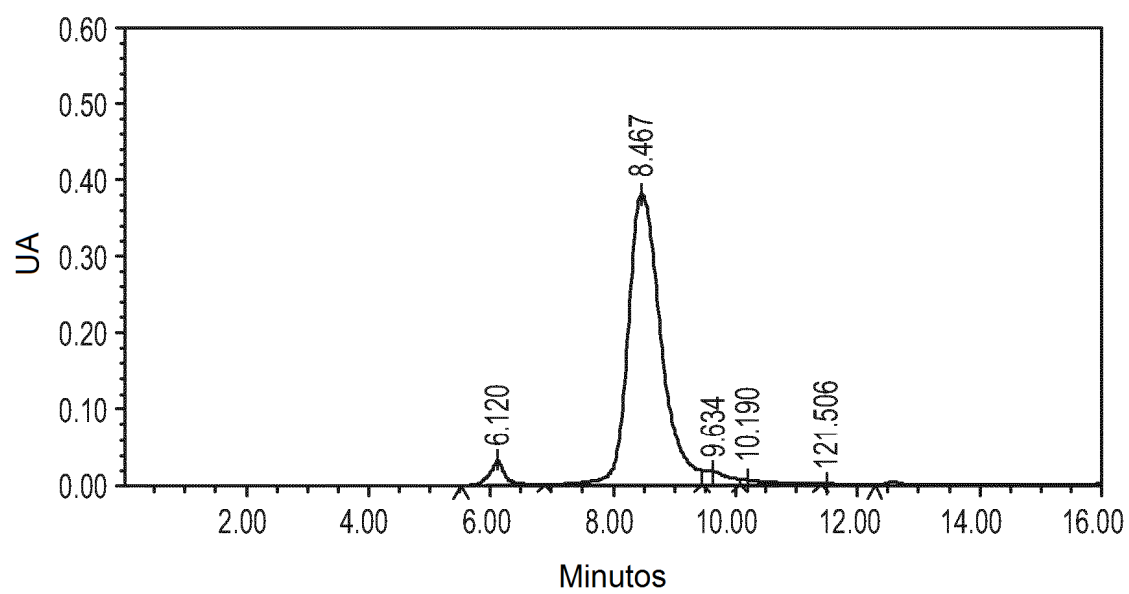


FIG. 13B

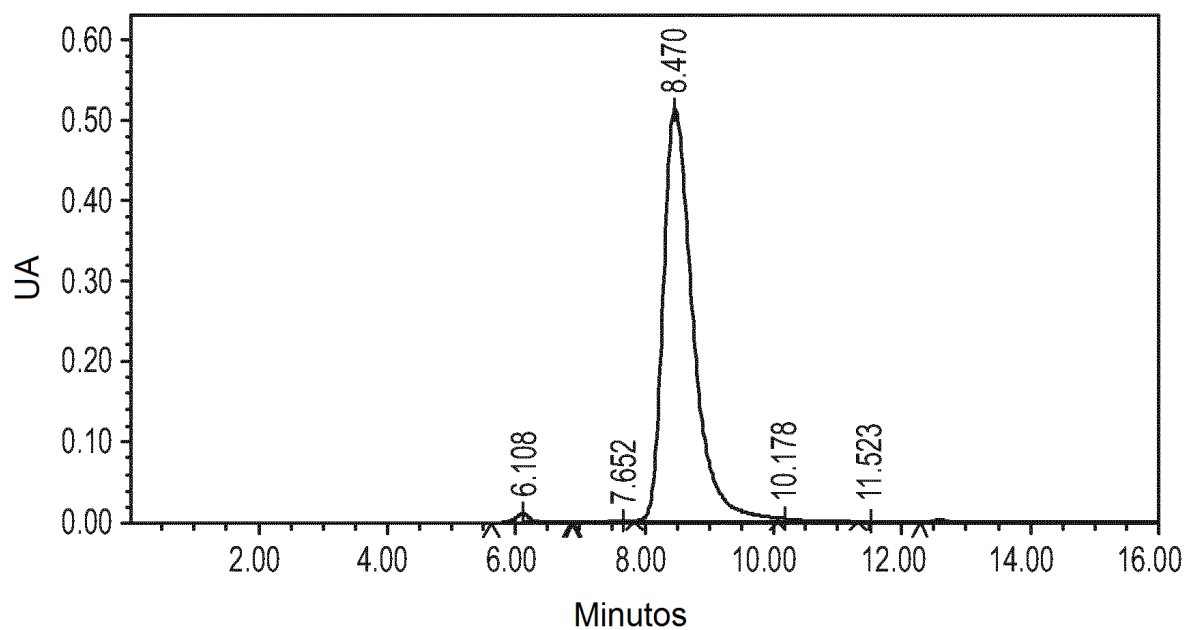


FIG. 13C

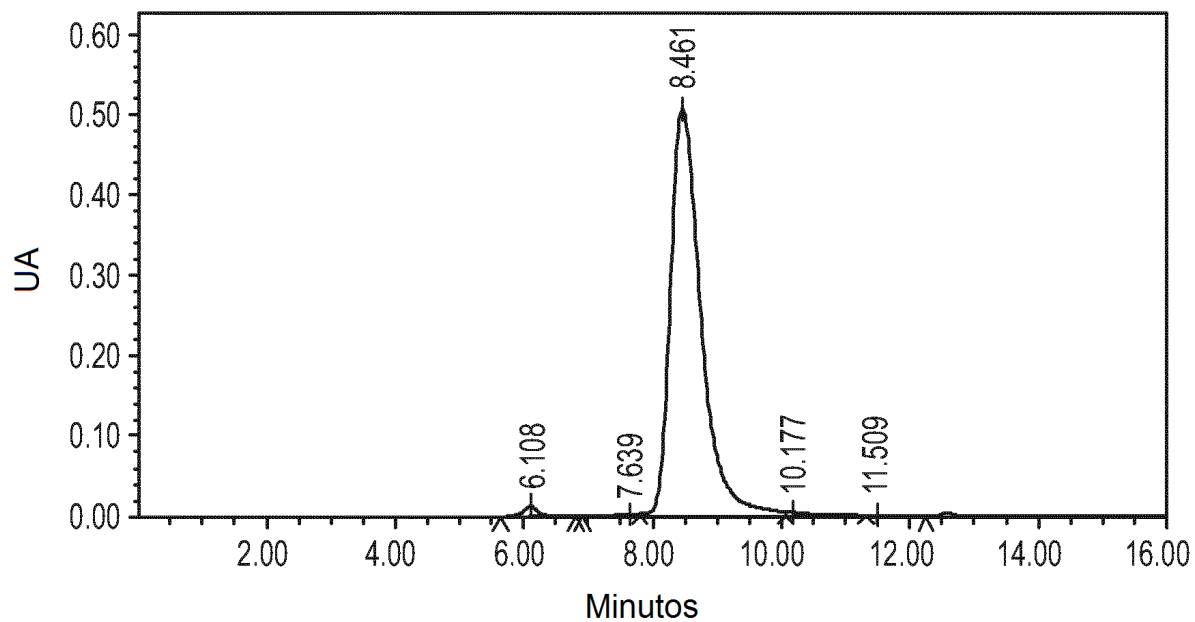


FIG. 13D

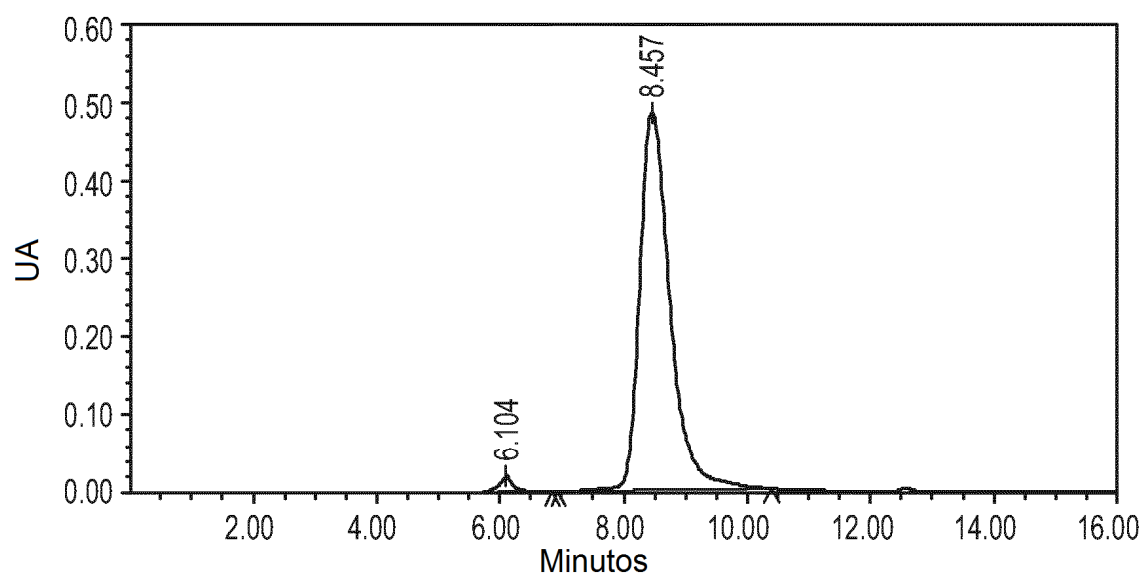


FIG. 13E

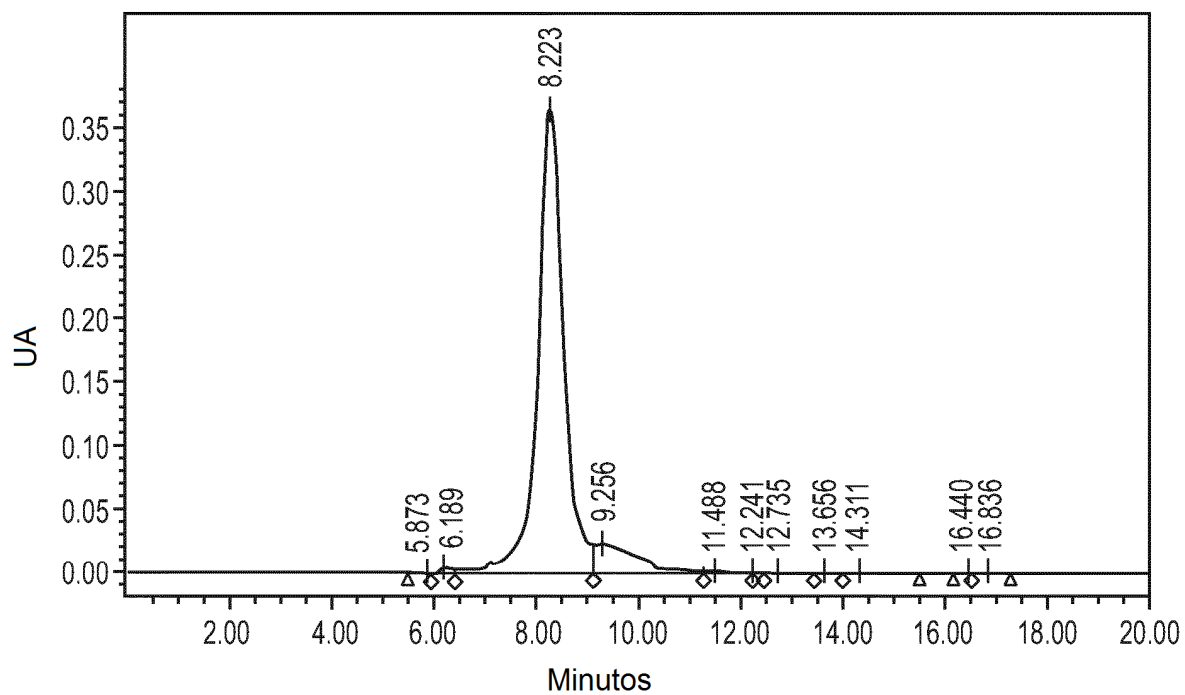


FIG. 14

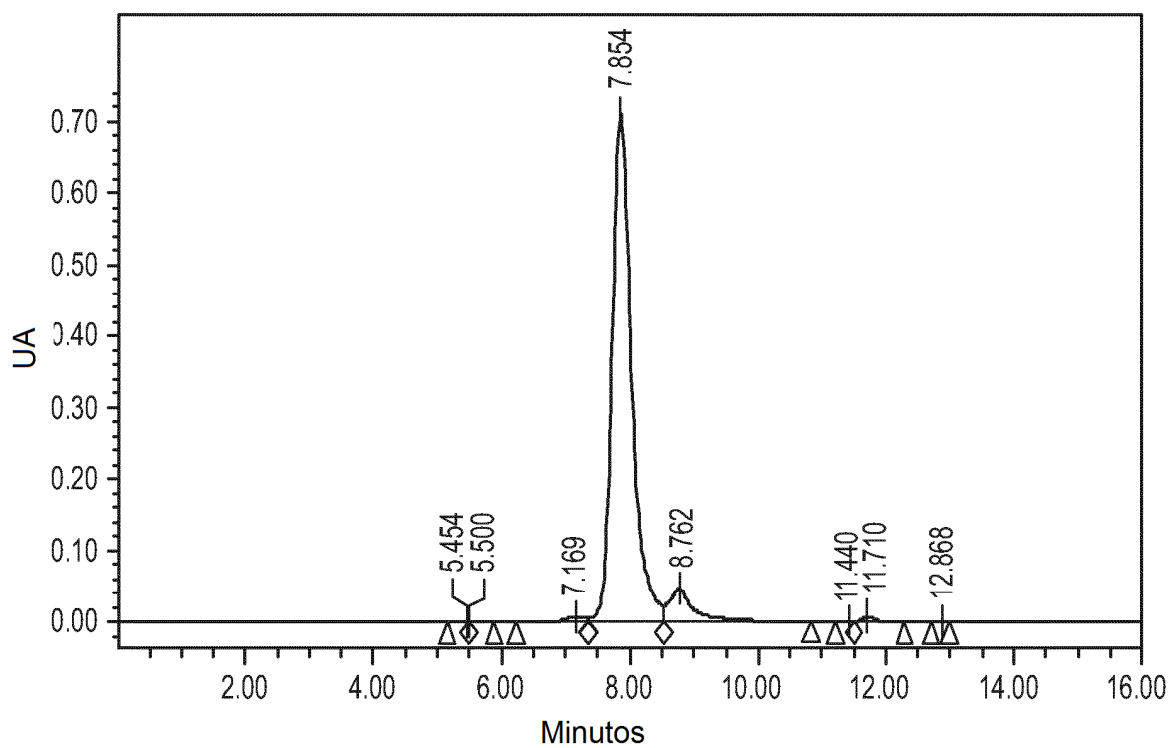


FIG. 15

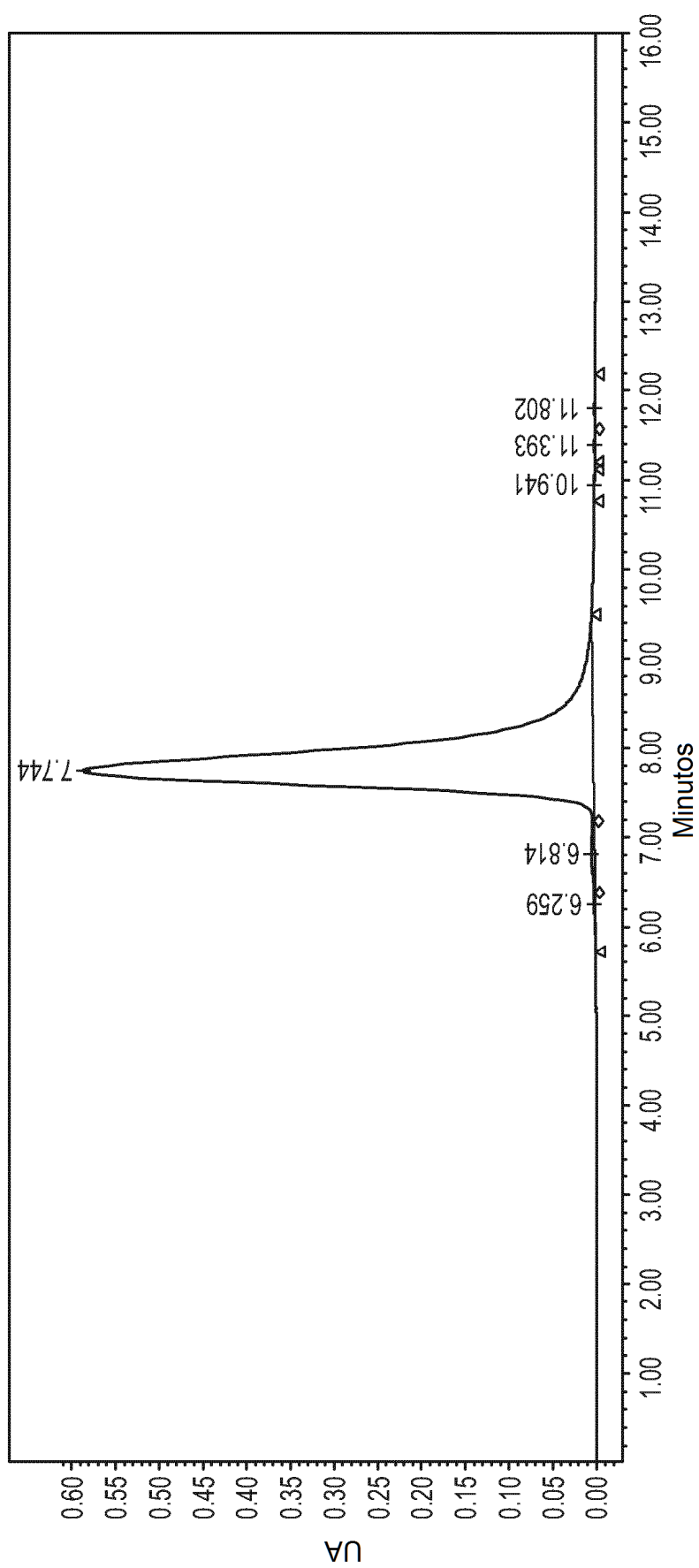


FIG. 16

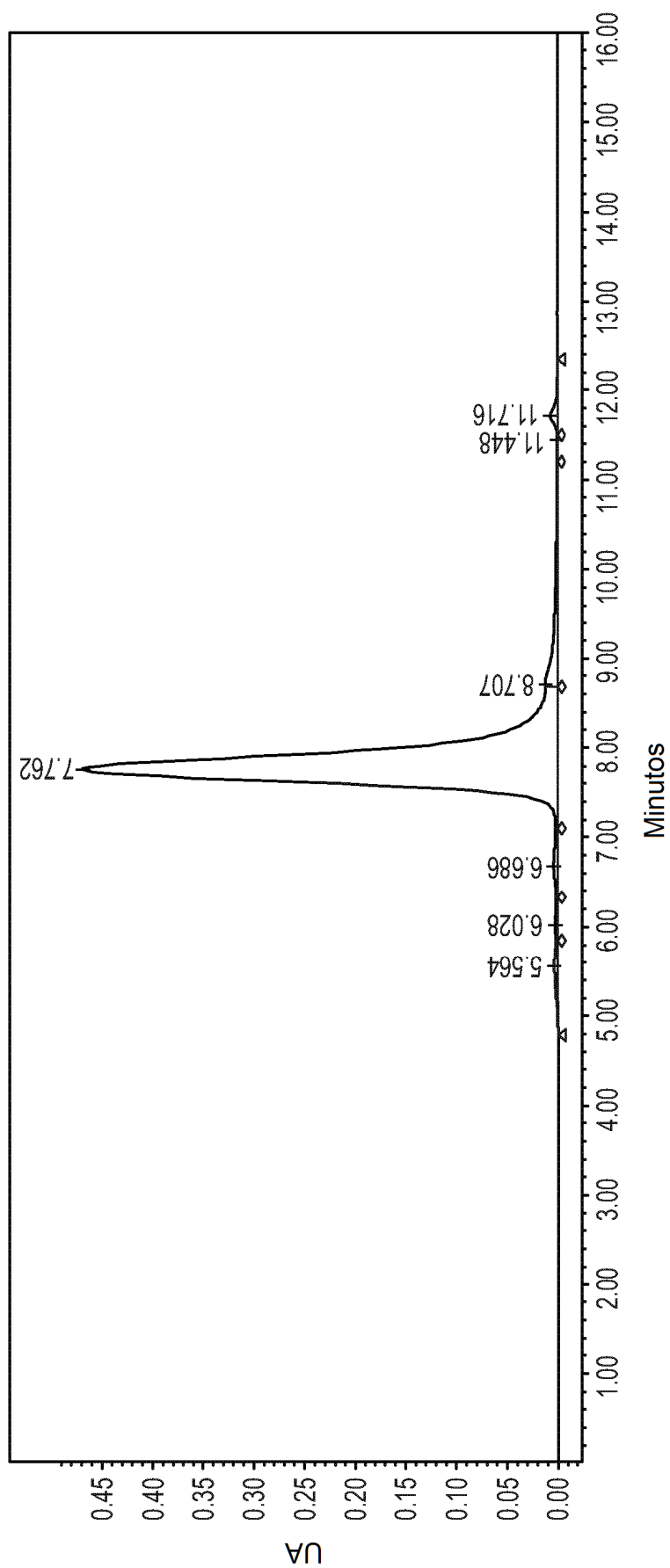


FIG. 17

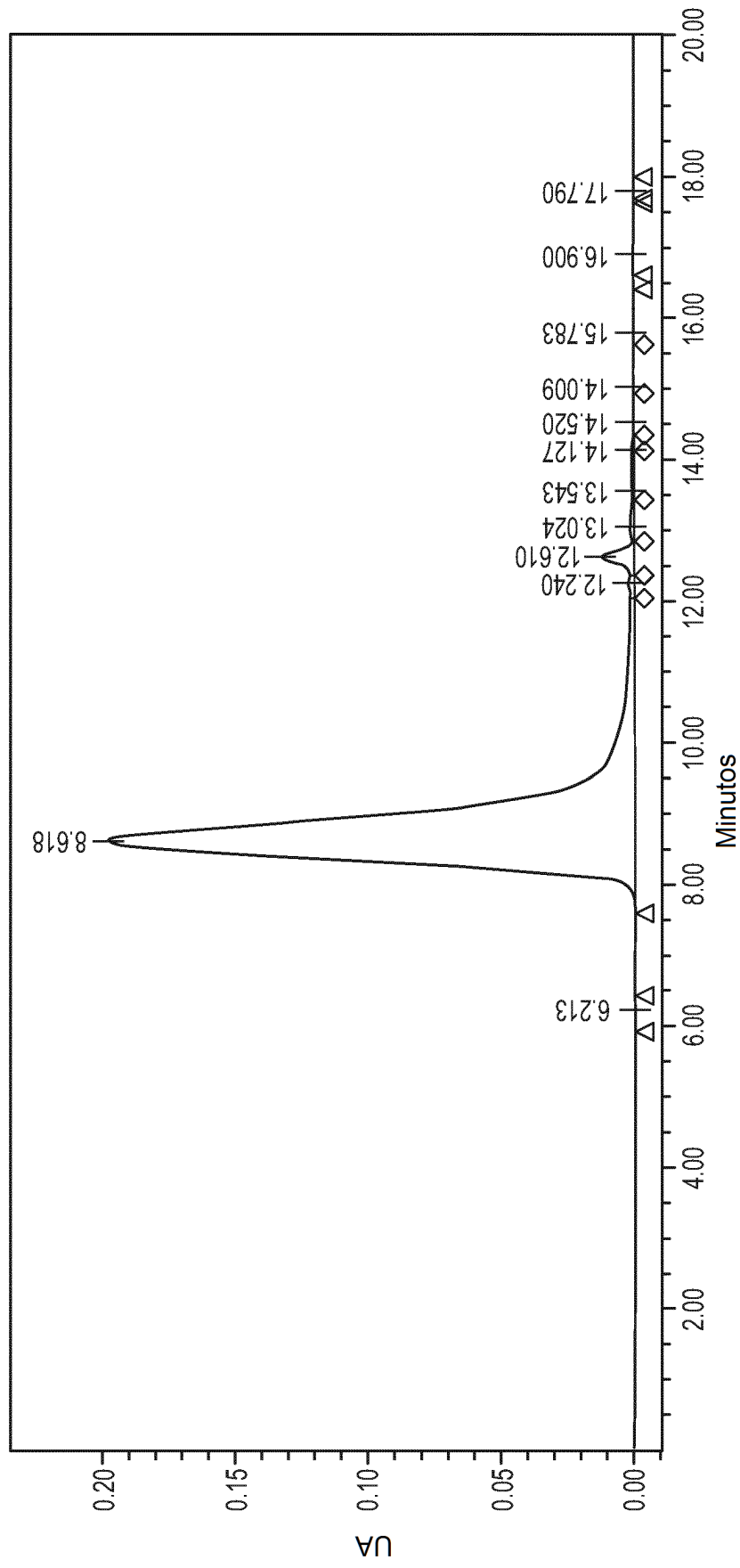


FIG. 18

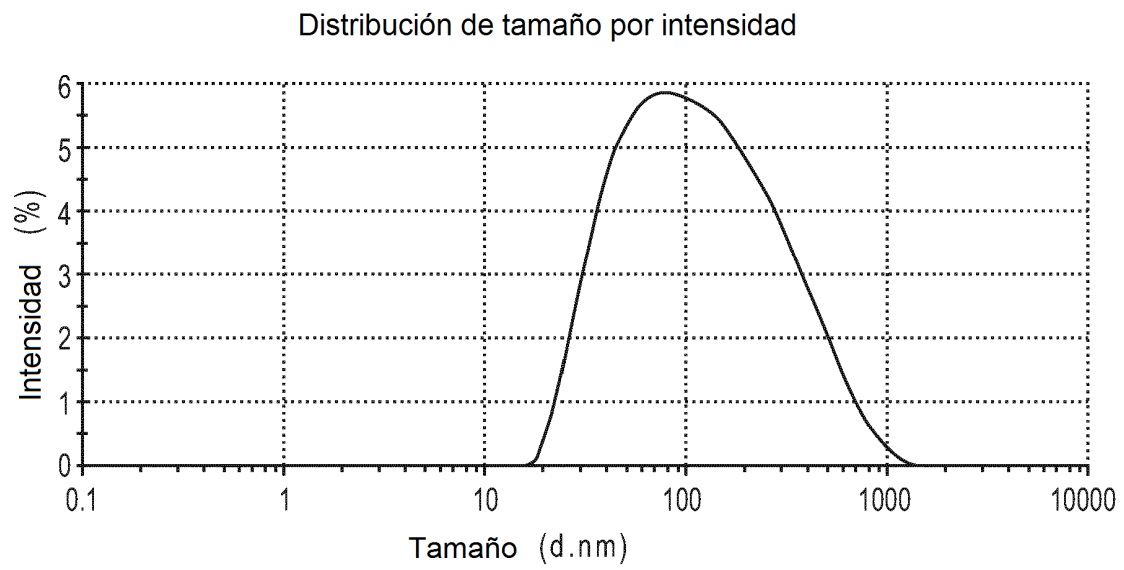


FIG. 19A

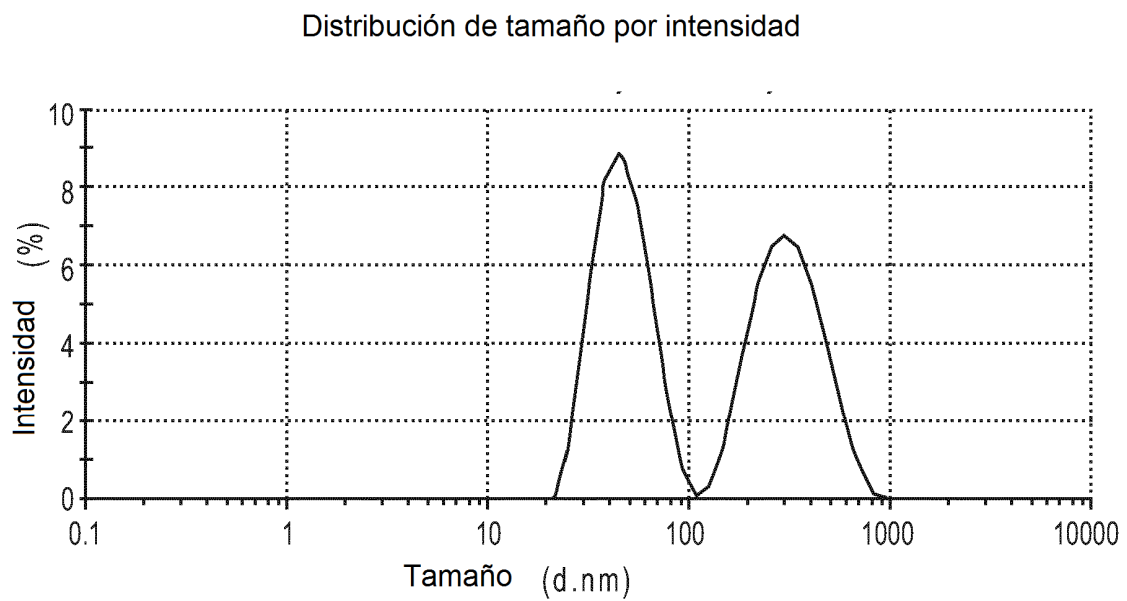


FIG. 19B

Distribución de tamaño por intensidad

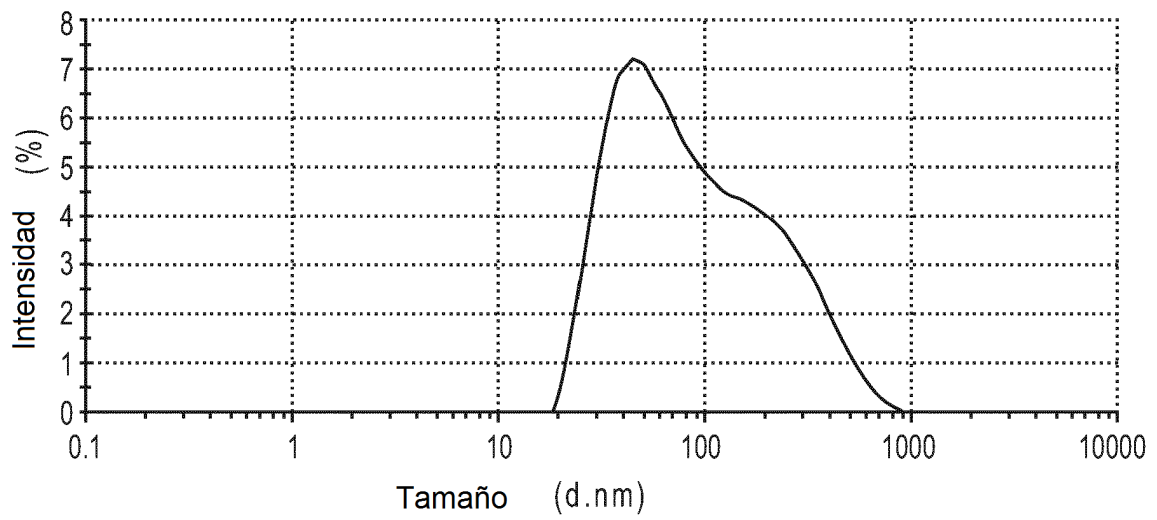


FIG. 19C

Distribución de tamaño por intensidad

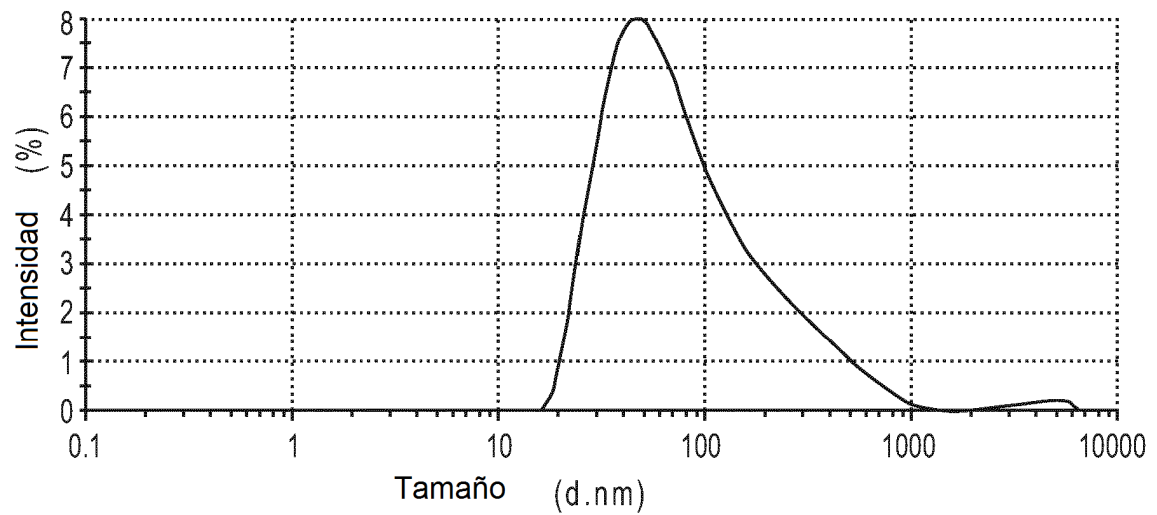


FIG. 19D

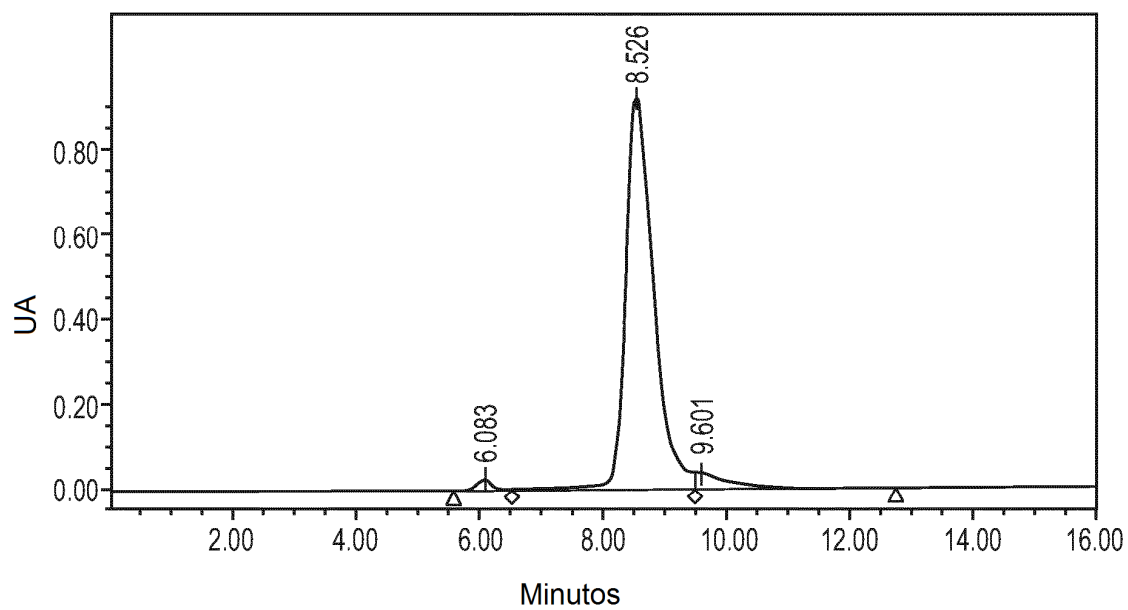


FIG. 20A

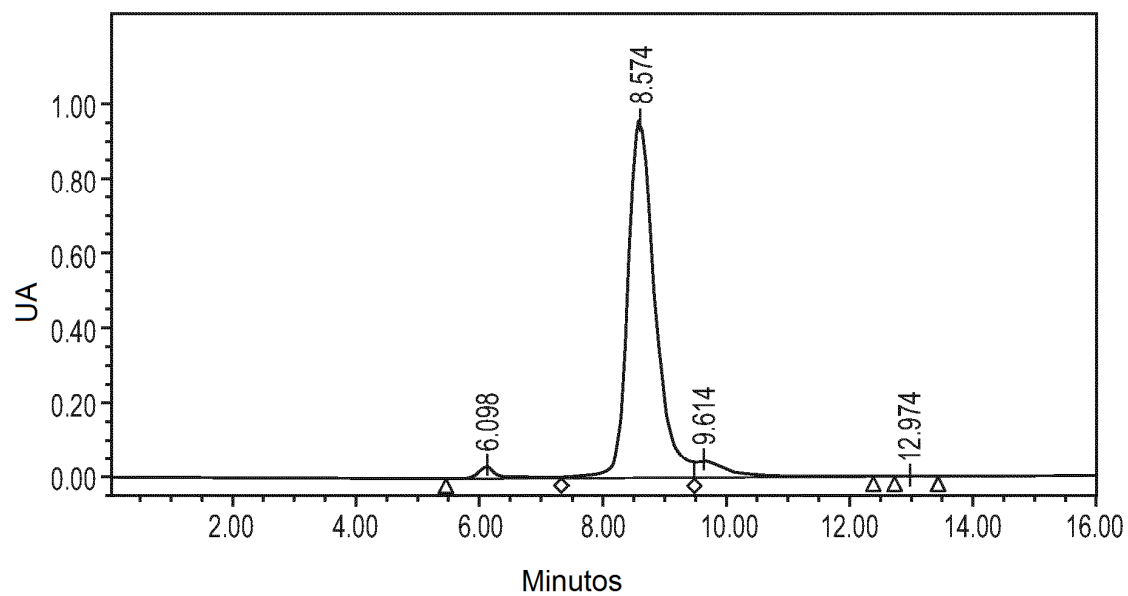


FIG. 20B

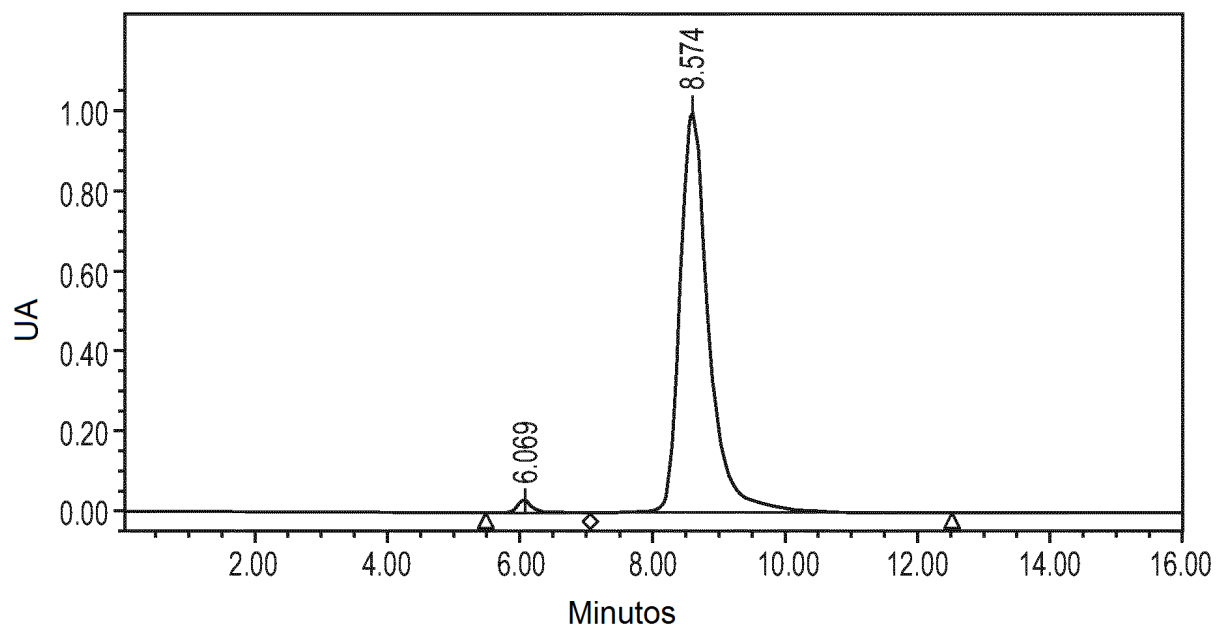


FIG. 20C

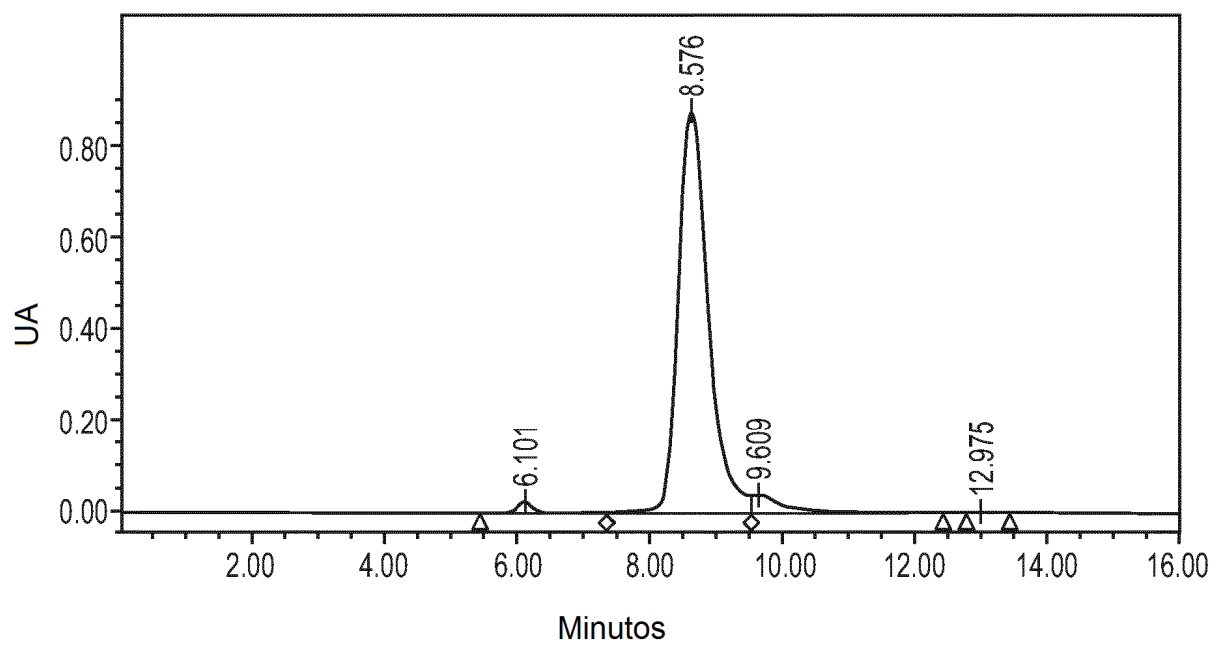


FIG. 20D

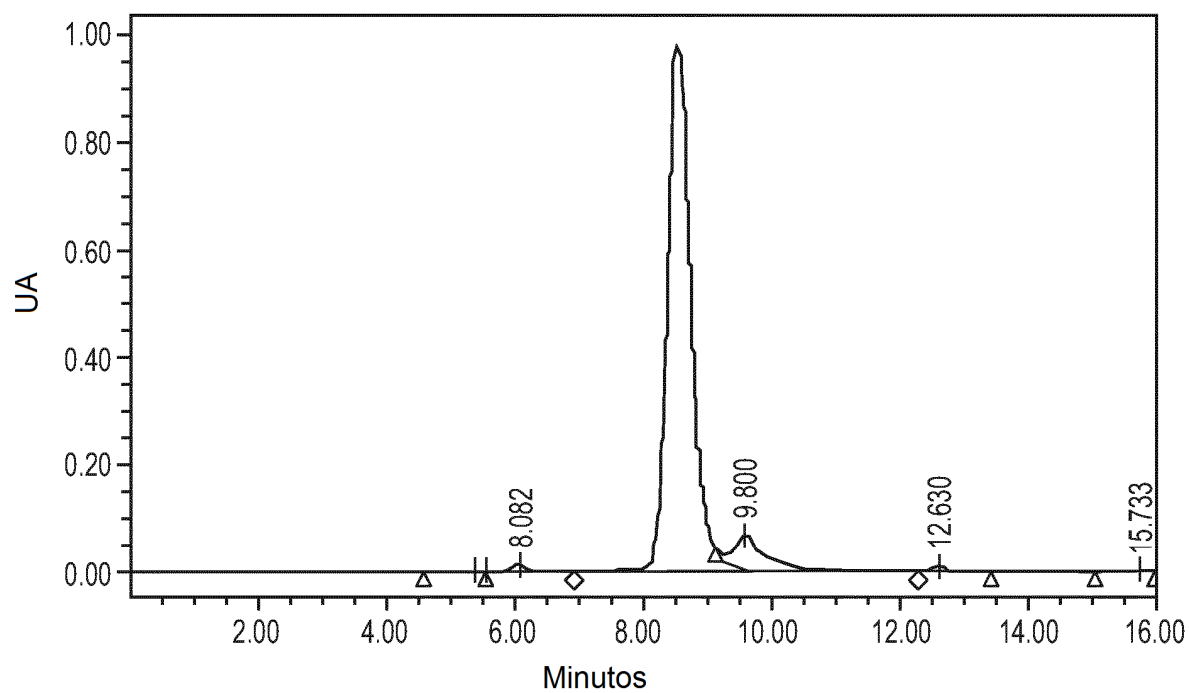


FIG. 21A

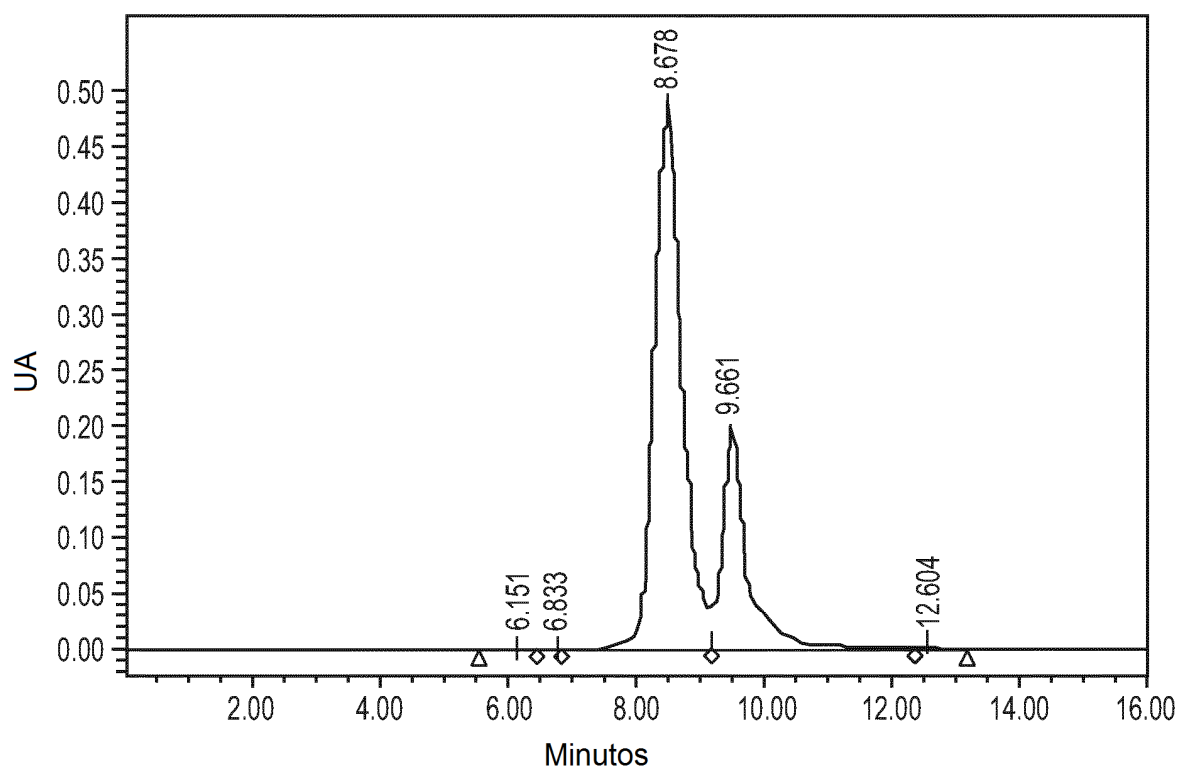


FIG. 21B

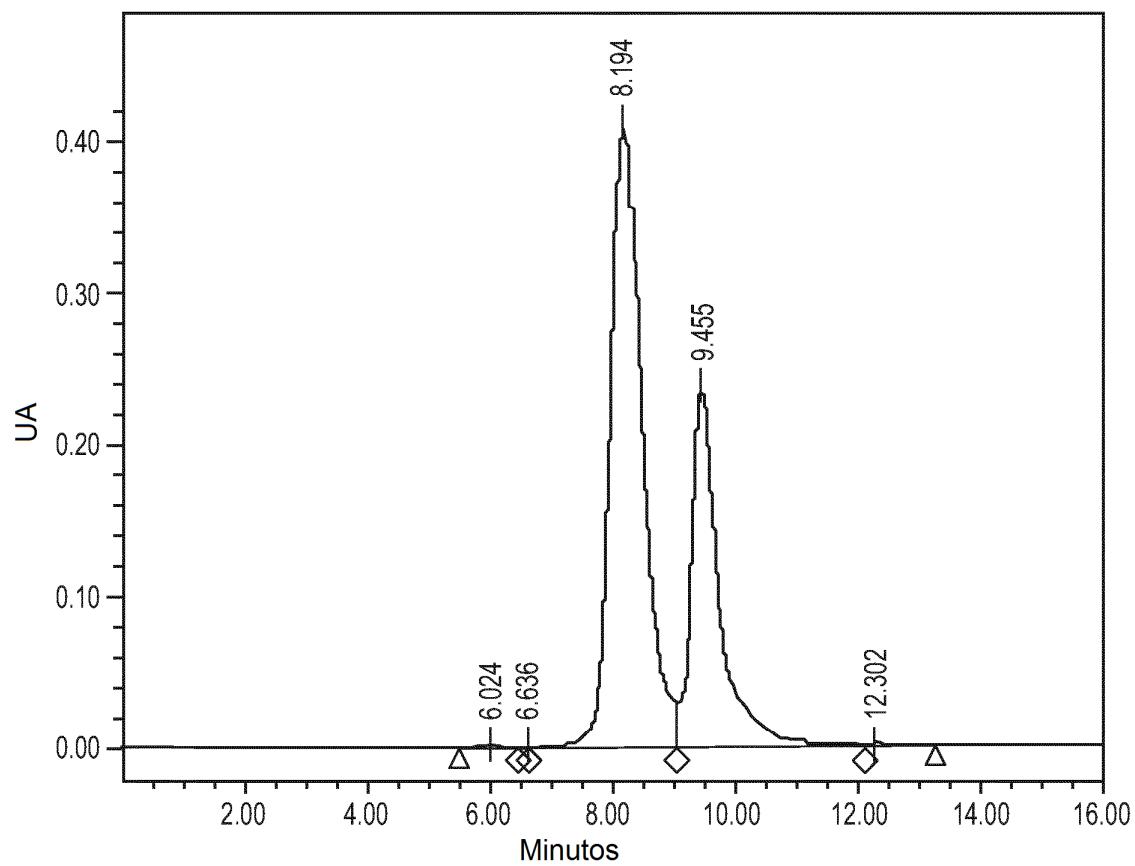


FIG. 22

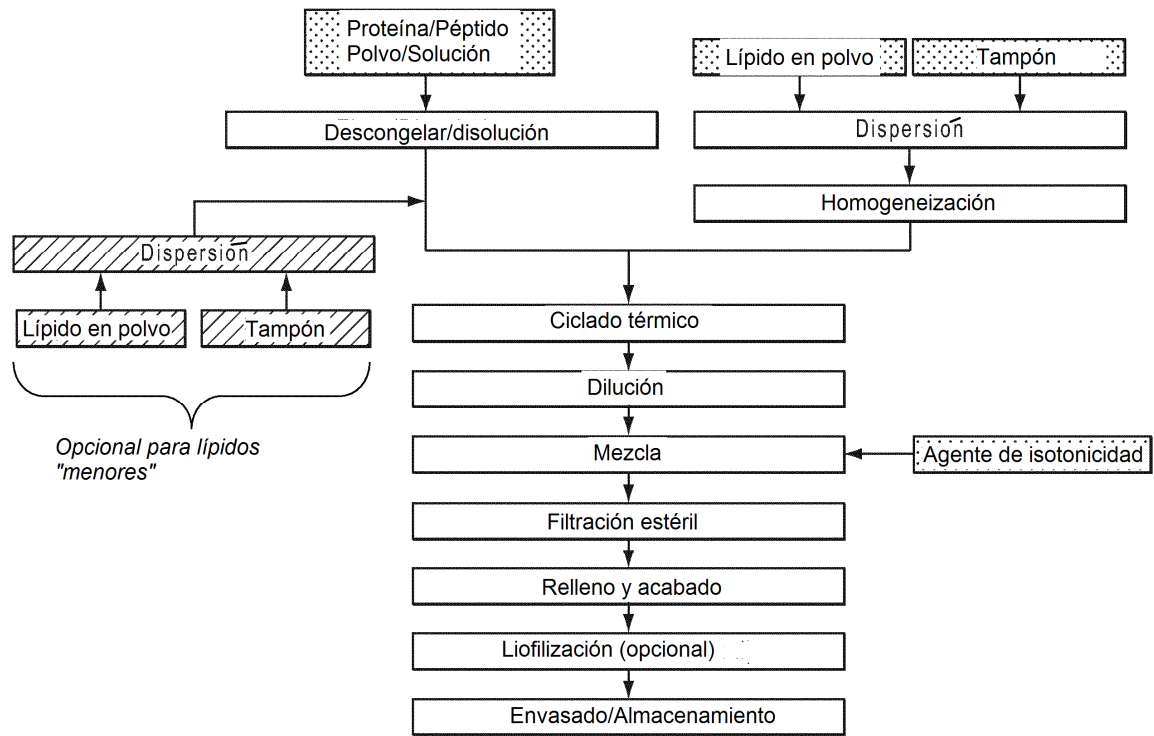


FIG. 23

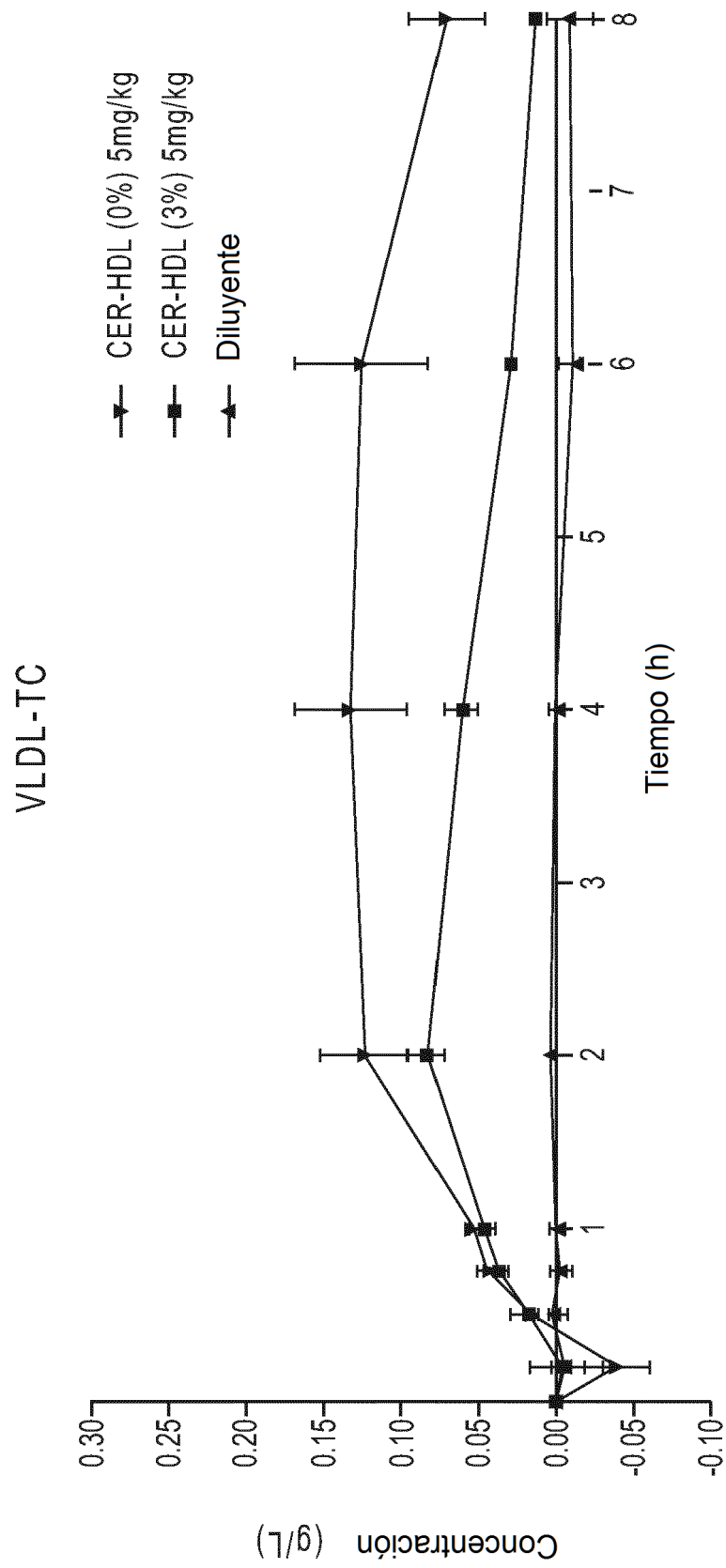


FIG. 24

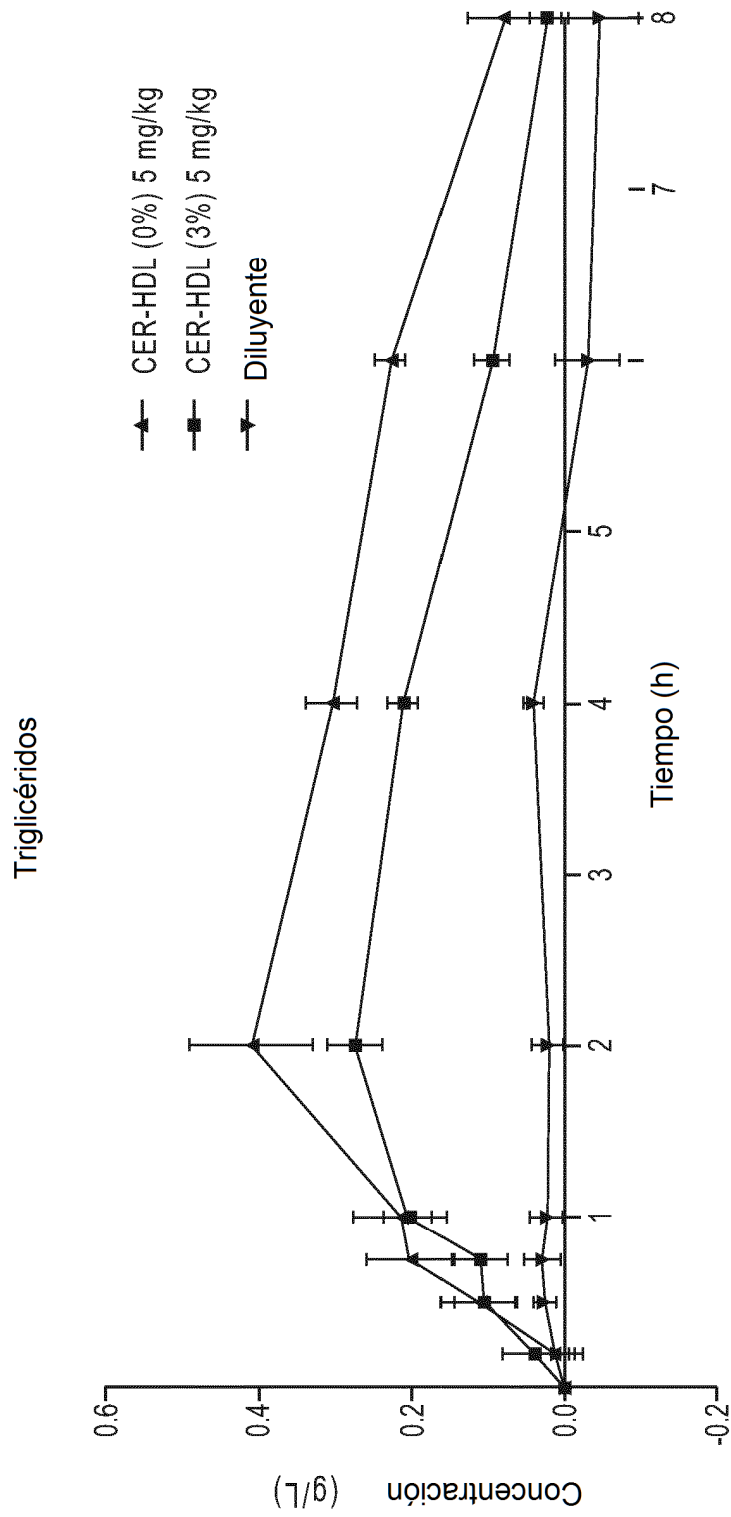


FIG. 25

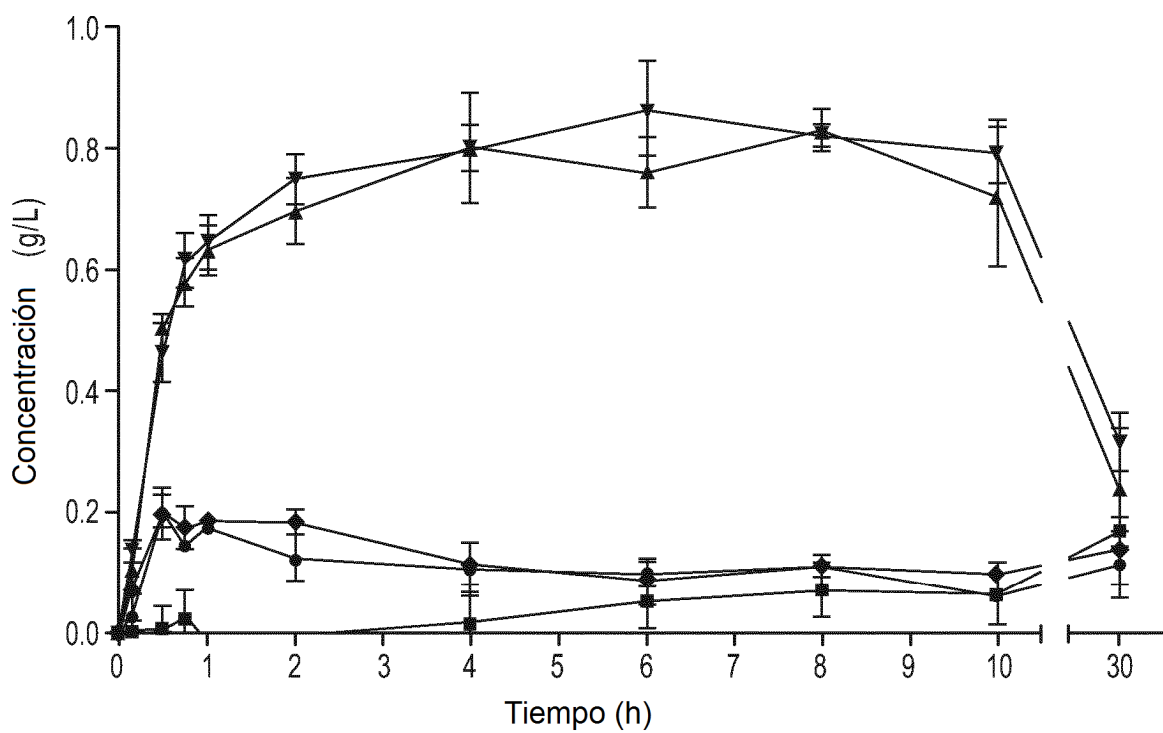


FIG. 26A

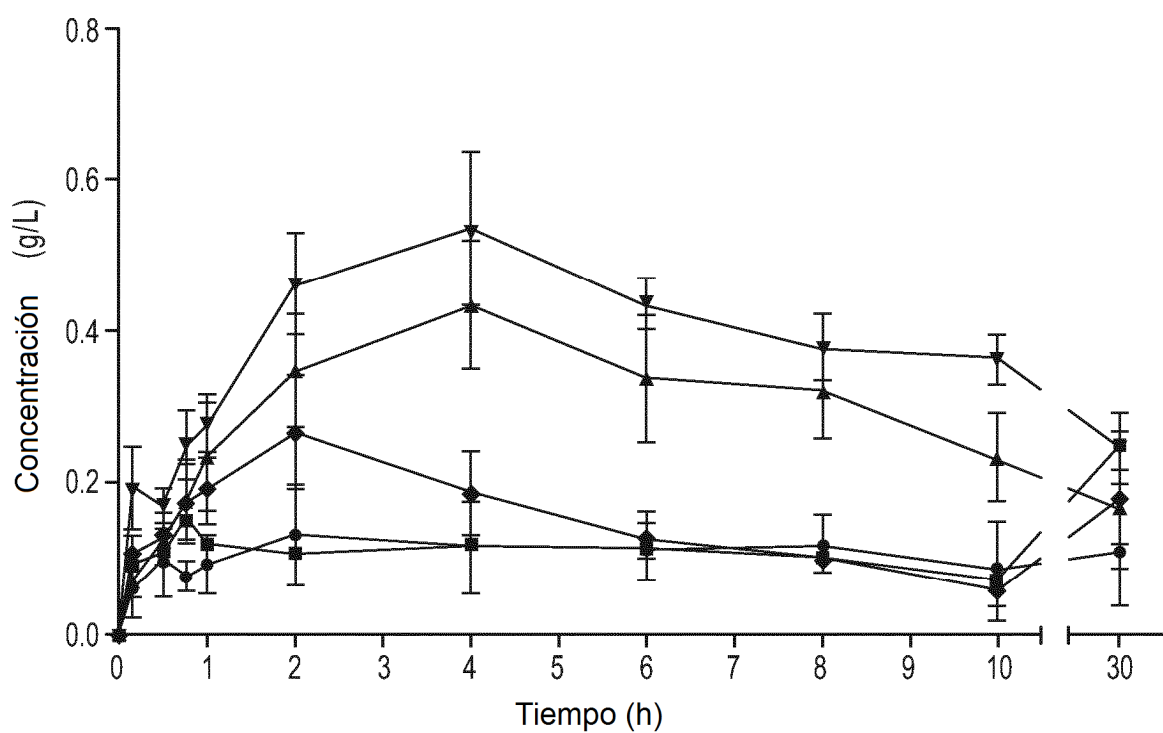


FIG. 26B

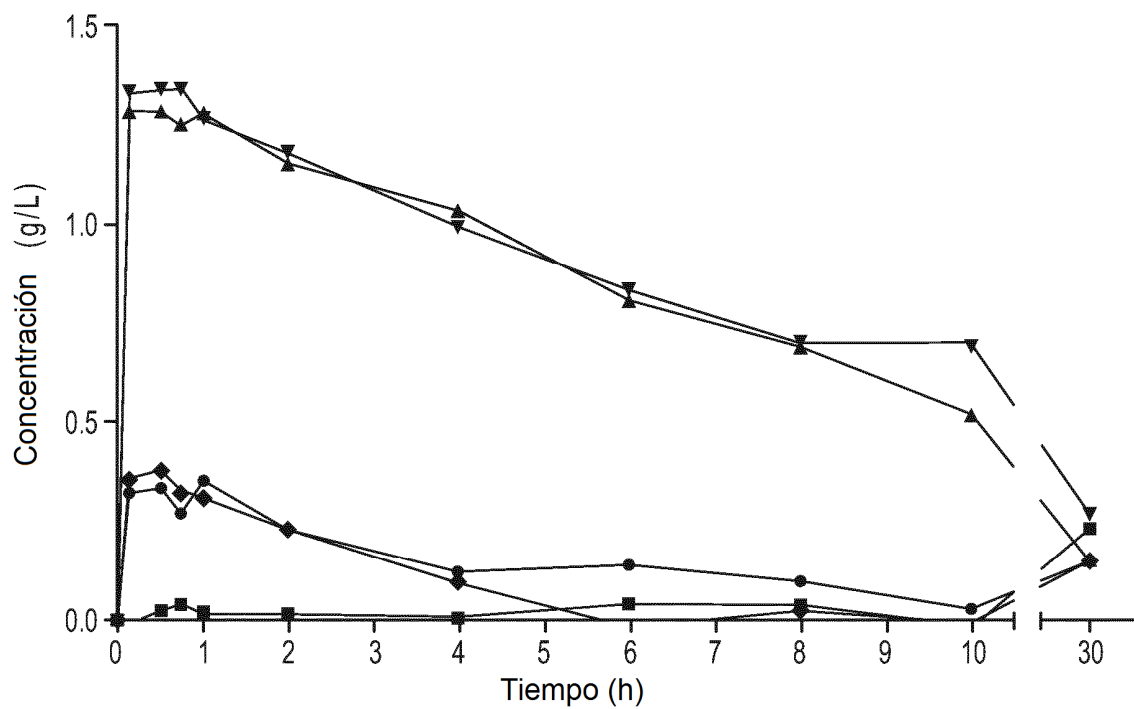


FIG. 26C

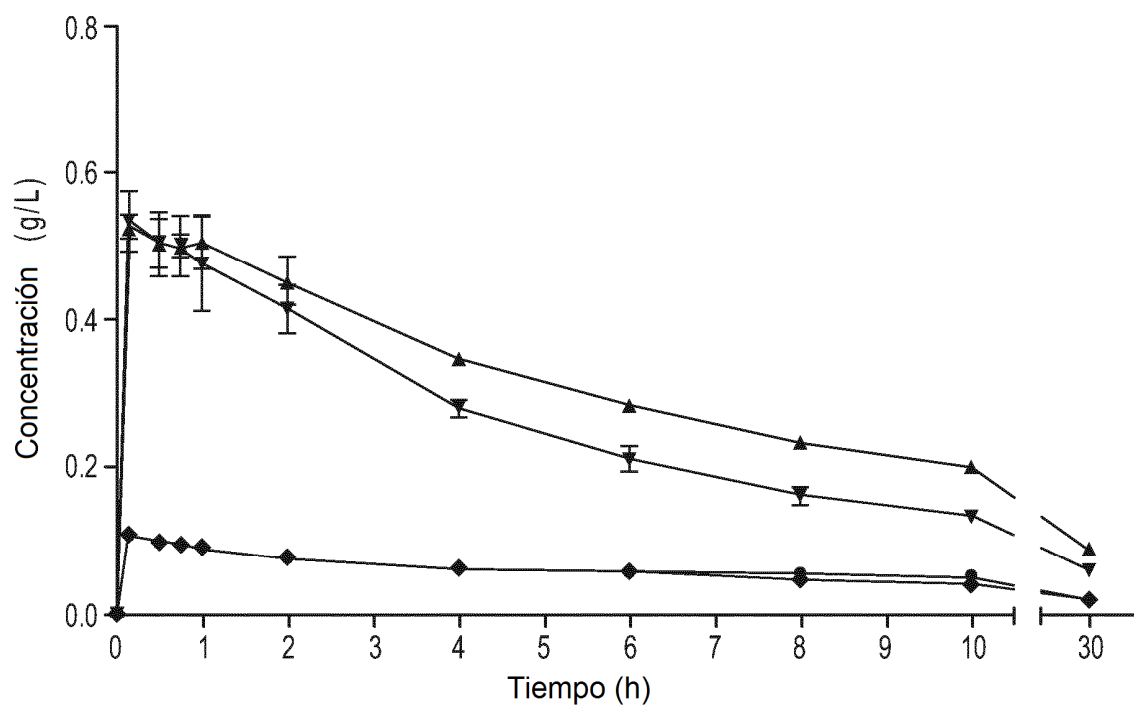


FIG. 26D

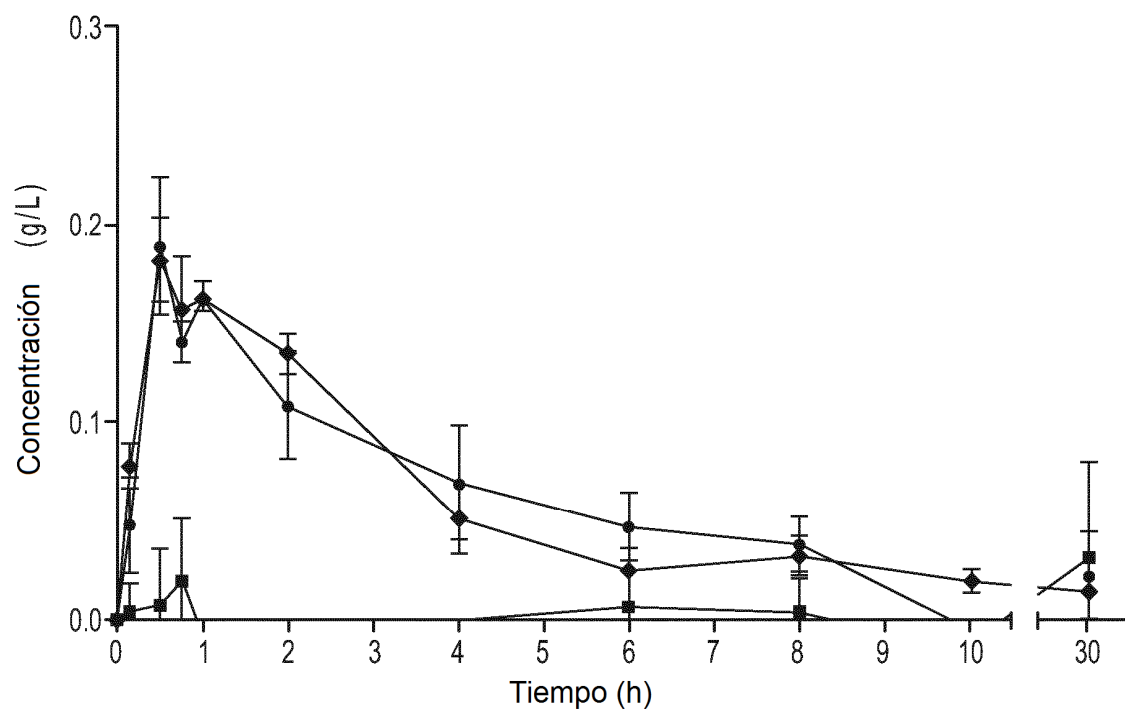


FIG. 27A

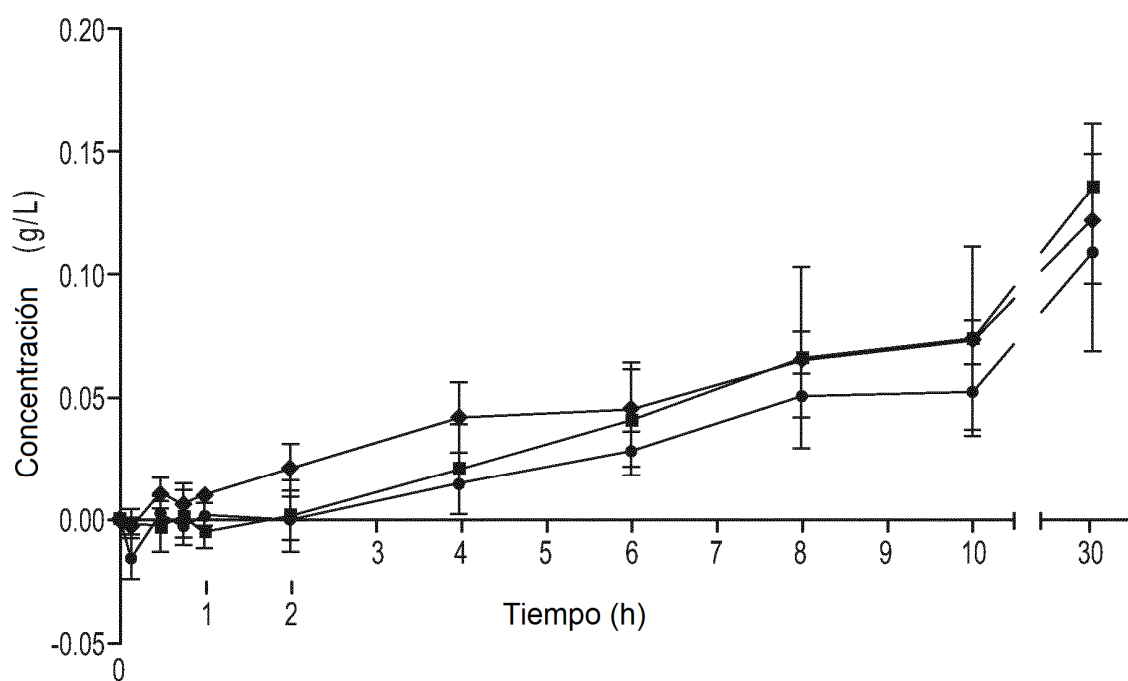


FIG. 27B

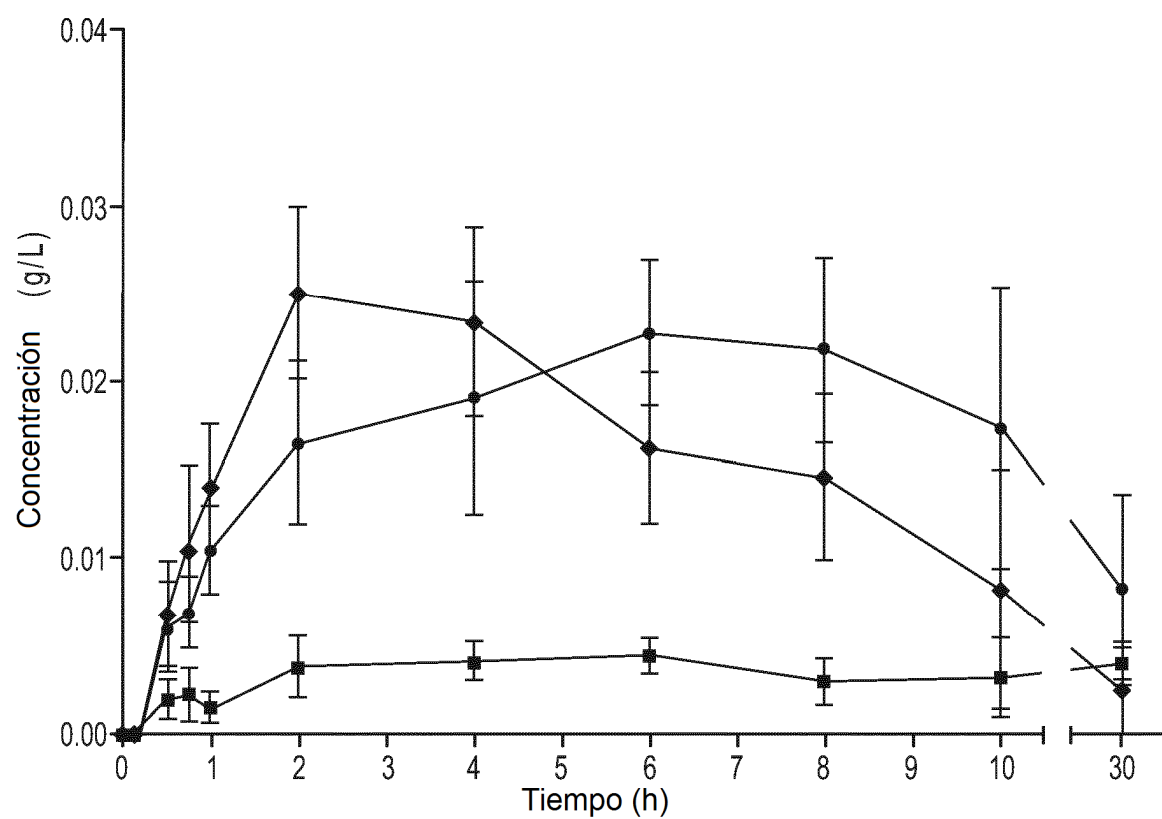


FIG. 27C