

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 275**

51 Int. Cl.:

C07K 14/775 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2013 PCT/AU2013/001260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14066943**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2013 E 13851610 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2916857**

54 Título: **Formulación de lipoproteína de alta densidad reconstituida**

30 Prioridad:

02.11.2012 US 201261721771 P

04.02.2013 EP 13153903

14.03.2013 US 201313803863

10.04.2013 AU 2013205684

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

09.07.2019

73 Titular/es:

CSL LIMITED (100.0%)

45 Poplar Road

Parkville VIC 3052, AU

72 Inventor/es:

**VUCICA, YVONNE y
WARREN, GARY LEE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 719 275 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

Formulación de lipoproteína de alta densidad reconstituida

5 Área técnica

La presente invención se refiere a formulaciones de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas, y en particular a formulaciones con estabilidad y propiedades biológicas adecuadas para el uso farmacéutico.

10 Antecedentes técnicos

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) constituyen una gama de partículas de lipoproteína que se encuentran en el suero normal. Las partículas de HDL maduras están presentes en forma de una estructura globular que contiene proteínas y lípidos. Dentro de la capa externa de estas partículas se encuentran los lípidos más polares, los fosfolípidos y el colesterol libre, todos con grupos cargados orientados hacia afuera, hacia el entorno acuoso. Los lípidos más hidrófobos, como el colesterol esterificado y los triglicéridos, residen en el núcleo de la partícula. Las partículas de HDL nacientes o recién formadas carecen de lípidos y tienen forma discoidal. Los componentes proteínicos están incluidos en la capa externa. El componente proteínico principal es la apolipoproteína A-I (Apo A-I) con menores cantidades de Apo A-II, Apo A-IV, Apo CIII, Apo D, Apo E y Apo J. Varias otras proteínas residen en la partícula de HDL, como lecitina-colesterol acetiltransferasa, PAF acetilhidrolasa y paraoxonasa. Las HDL se caracterizan por una alta densidad (> 1.063 g/ml) y un tamaño pequeño (diámetro de Stoke = 5 a 17 nm).

Se han hecho esfuerzos por desarrollar HDL artificiales que puedan ser infundidas en el torrente circulatorio de los pacientes para imitar los efectos biológicos de las HDL de origen natural. Estas partículas artificiales se denominan generalmente "HDL reconstituidas" (rHDL), o a veces miméticos de HDL o partículas de HDL sintéticas. Las partículas artificiales contienen componentes de las partículas naturales, en particular Apo A-I y lípidos. Por ejemplo, WO 2012/000048 describe rHDL que contienen Apo A-I, fosfatidilcolina (PC) y una pequeña cantidad de colato de sodio. WO 2012/109162 describe rHDL que contienen Apo A-I, esfingomielina (SM) y fosfatidilglicerol (por ej., 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (DPPG)).

Es conveniente liofilizar (deshidratar por congelación) las formulaciones de rHDL antes de su uso. La liofilización es un método utilizado comúnmente para preparar productos farmacéuticos proteínicos sólidos. Sin embargo, este proceso genera diversas tensiones de congelación y deshidratación, como la concentración de la proteína solubilizada, la formación de cristales de hielo, los cambios de pH, etc. Todas estas tensiones pueden desnaturalizar las proteínas en diversos grados. Por lo tanto, a menudo son necesarios estabilizantes en una formulación proteínica para proteger la estabilidad de la proteína durante el proceso de congelación y deshidratación. Para mantener la estabilidad de las formulaciones de rHDL durante la liofilización, se han utilizado estabilizantes como azúcares y alcoholes de azúcar. Por ejemplo, US 5,089,602 da a conocer lipoproteínas derivadas del plasma que son estabilizadas con 10% de sacarosa o una mezcla de 10% de sacarosa y 5% de manitol. WO 2012/000048 da a conocer estabilizantes de azúcar y de alcohol de azúcar utilizados a una concentración entre aproximadamente 65 y 85 g/L de la formulación de rHDL (equivalente aproximadamente a 6.5 a 8.5% p/p). WO 2012/109162 da a conocer sacarosa y manitol como estabilizantes, utilizados en una mezcla a una concentración de 4% p/p y 2% p/p, respectivamente. En Kim et al, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16, 785-792 (2011) se llevó a cabo una investigación sobre la estabilidad durante la fabricación y el almacenamiento de rHDL. En ella, no se pudo estabilizar suficientemente rHDL con una relación de Apo A-I:PC de soja de 1:150 con 1 o 5% de sacarosa, mientras que una concentración de 10% de sacarosa se describió como óptima.

US 5652339 da a conocer un método para producir formulaciones de HDL reconstituidas con una mezcla de apolipoproteína-lípido-detergente en la que el detergente es al menos parcialmente eliminado. Las partículas resultantes tienen una relación entre apolipoproteína y lípido de 1:100 a 1:150 y son estabilizadas con un disacárido (sacarosa), un monosacárido o manitol en cantidades de 2-10%. EP0663407 se refiere análogamente a la fabricación de formulaciones de rHDL con una relación molar entre apolipoproteína y lípido de 1:50 a 1:180 y estabilizadas con un disacárido (5-15%) o un monosacárido (2-10%).

Las formulaciones de rHDL de estos documentos están destinadas a la terapia de infusión, pero concentraciones elevadas de azúcares en productos para infusión pueden causar o exacerbar problemas renales. Este es un problema particular en la población de pacientes destinataria de las rHDL, porque estos pacientes sufren a menudo de insuficiencia renal.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención fue proporcionar formulaciones de rHDL alternativas o mejoradas en comparación con estas formulaciones previas. En particular, los inventores buscaron formulaciones de rHDL estables con menor toxicidad renal.

Este problema se resuelve mediante la formulación de acuerdo con la reivindicación 1. Otras realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

Sorprendentemente, se encontró que la formulación de rHDL de la reivindicación 1 presenta una buena estabilidad a largo plazo. Al contener menos estabilizante de la liofilización que las formulaciones previas, la formulación también presenta menor riesgo de toxicidad renal. La baja concentración de estabilizante de la liofilización también podría permitir que las rHDL se comportaran de mejor manera en los ensayos funcionales de la función de las rHDL. Los inventores también encontraron que los aminoácidos, en particular prolina, son estabilizantes de la liofilización, útiles para las formulaciones de rHDL.

Resumen de la invención

La invención proporciona una formulación de rHDL que contiene una apolipoproteína, un lípido y un estabilizante de la liofilización, en la que la relación entre la apolipoproteína y el lípido es de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:120 (mol:mol).

Preferentemente, el estabilizante de la liofilización está presente en una concentración de aproximadamente 1.0% a aproximadamente 6.0% (p/p de la formulación de rHDL), por ej., de 1.0, 1.1, 1.2 o 1.3 a 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 o 6.0. Esta baja cantidad de estabilizante de la liofilización puede reducir el riesgo de toxicidad renal. También es particularmente adecuada para pacientes que reciben agentes de contraste durante la terapia del síndrome coronario agudo (SCA), puesto que estos agentes pueden competir con el estabilizante de la liofilización por la depuración en los riñones. En una realización preferida, el estabilizante de la liofilización está presente en una concentración de aproximadamente 1.0% a menos de 6.0% por ej., de aproximadamente 1.0% a 5.9%. Preferentemente, el estabilizante de la liofilización está presente en una concentración de aproximadamente 3.0 a menos de 6.0%, por ej., de aproximadamente 3.0 a 5.9%. Más preferentemente, el estabilizante de la liofilización está presente en una concentración de aproximadamente 4.0 a 5.5%, particularmente de 4.3 a 5.3%, más particularmente de 4.3 a 5.0%, y muy preferentemente de 4.6 a 4.8% (p/p). Dichas formulaciones presentan una buena estabilidad y una baja toxicidad renal.

Alternativamente, o además, se prefiere que la relación entre la apolipoproteína y el estabilizante de la liofilización sea entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:3 (p:p). En particular, la relación entre la apolipoproteína y el estabilizante de la liofilización es entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:2.4 (p:p), por ej., menor de 1:2 (p:p). Los inventores encontraron que estas formulaciones permanecen estables sin presentar cambios, o muy pocos, en la distribución del tamaño de las muestras liofilizadas, incluso después del almacenamiento durante varios meses. Sin embargo, en algunas realizaciones, la relación entre la apolipoproteína y el estabilizante de la liofilización puede ser menor que esta, por ej., entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:7, y en particular entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:5 (p:p).

La presente divulgación también proporciona una formulación de rHDL que contiene una apolipoproteína, un lípido y un estabilizante de la liofilización, en la que el estabilizante de la liofilización contiene un aminoácido. Preferentemente el aminoácido es prolina. Los inventores encontraron que los aminoácidos son buenos estabilizantes de la liofilización para las formulaciones de rHDL, particularmente cuando están en una mezcla con bajas cantidades de otros estabilizantes.

La presente divulgación también proporciona la formulación de rHDL mencionada previamente para prevenir o tratar una enfermedad, un trastorno o una afección en un ser humano. Adecuadamente, la enfermedad, el trastorno o la afección responden a la administración profiláctica o terapéutica de la formulación de rHDL.

Descripción detallada de la invención

En el contexto de la presente invención, la expresión "formulación de HDL reconstituida (rHDL)" significa cualquier formulación o composición de lipoproteína, producida artificialmente, que sea funcionalmente similar a, análoga a, corresponda a, o imite a, la lipoproteína de alta densidad (HDL) habitualmente presente en el plasma sanguíneo. Las formulaciones de rHDL abarcan "los miméticos de HDL" y "las partículas de HDL sintéticas".

En el contexto de la presente invención, la expresión "estabilizante de la liofilización" significa una sustancia que estabiliza la proteína durante la liofilización. Dichos estabilizantes de la liofilización son bien conocidos en el área y se tratan, por ejemplo, en Wang (2000) International Journal of Pharmaceuticals 203:1-60. Un estabilizante de la liofilización preferido para utilizar en la divulgación, contiene un azúcar, un alcohol de azúcar, un aminoácido o una mezcla de estos. Por ejemplo, los inventores encontraron que los disacáridos como la sacarosa, son azúcares particularmente adecuados para usar como estabilizantes de la liofilización. Otros disacáridos que también se pueden utilizar incluyen fructosa, trehalosa, maltosa y lactosa. Además de los disacáridos, se pueden utilizar trisacáridos como rafinosa y maltotriosa. También pueden ser adecuados oligosacáridos más grandes, por ej., maltopentaosa, maltohexaosa y maltoheptaosa. Alternativamente, se pueden utilizar monosacáridos como glucosa, manosa y

galactosa. Estos mono, di, tri y oligosacáridos más grandes, se pueden usar solos o en combinación unos con otros. Como se indicó antes, se pueden usar estabilizantes de la liofilización que son alcoholes de azúcar. Estos alcoholes de azúcar también se pueden utilizar solos o en combinación. Un alcohol de azúcar particular para utilizar en la presente divulgación es el manitol. Otros alcoholes de azúcar que se pueden utilizar incluyen inositol, xilitol, galactitol y sorbitol. Otros polioles como glicerol, también pueden ser adecuados. Los aminoácidos que se pueden utilizar como estabilizantes de la liofilización incluyen prolina, glicina, serina, alanina y lisina. También se pueden utilizar aminoácidos modificados, por ejemplo 4-hidroxi prolina, L-serina, glutamato de sodio, sarcosina y ácido γ -aminobutírico. Los inventores encontraron que la prolina es un aminoácido particularmente adecuado para usar como estabilizante de la liofilización.

En realizaciones particulares, el estabilizante de la liofilización contiene una mezcla de un azúcar y un alcohol de azúcar. Por ejemplo, se puede utilizar una mezcla de sacarosa y manitol. El azúcar y el alcohol de azúcar se pueden mezclar en cualquier relación adecuada, por ej., de aproximadamente 1:1 (p:p) a aproximadamente 3:1 (p:p), y en particular de aproximadamente 2:1 (p:p). Se prevén particularmente relaciones inferiores a 2:1, por ej., inferiores a 3:2. Generalmente, la relación es mayor de 1:5, por ej., mayor de 1:2 (p:p). En algunas realizaciones, la formulación contiene menos de 4% de sacarosa y 2% de manitol (p/p de la formulación de rHDL), por ejemplo, 3% de sacarosa y 2% de manitol. En algunas realizaciones, la formulación contiene menos de 4% de sacarosa y menos de 2% de manitol, por ej., de aproximadamente 1.0% a 3.9% de sacarosa y de aproximadamente 1.0% a 1.9% (p/p) de manitol.

En realizaciones particulares, el estabilizante de la liofilización contiene una mezcla de un azúcar y un aminoácido. Por ejemplo, se puede utilizar una mezcla de sacarosa y prolina. El azúcar y el aminoácido se pueden mezclar en cualquier relación adecuada, por ej., de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 3:1 (p:p), y en particular de aproximadamente 2:1 (p:p). Se prevén particularmente relaciones inferiores a 2:1, por ej., inferiores a 3:2 (p:p). Generalmente, la relación es mayor de 1:5, por ej., mayor de 1:2 (p:p). Preferentemente, el aminoácido está presente en una concentración de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 2.5%, por ej., de 1.0, 1.2 o 1.3 a 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 o 2.5% (p/p de la formulación de rHDL). En algunas realizaciones, la formulación contiene 1.0% de sacarosa y 2.2% de prolina, o 3.0% de sacarosa y 1.5% de prolina, o 4% de sacarosa y 1.2% de prolina. El aminoácido se puede agregar al azúcar para mantener una solución isotónica. Soluciones con una osmolalidad mayor de 350 mosmol/kg son generalmente hipertónicas, mientras aquellas con una osmolalidad menor de 250 mosmol/kg son generalmente hipotónicas. Las soluciones con una osmolalidad entre 250 mosmol/kg y 350 mosmol/kg son generalmente isotónicas.

En realizaciones particulares, el estabilizante de la liofilización contiene una mezcla de un alcohol de azúcar y un aminoácido. El estabilizante de la liofilización puede contener una mezcla de un azúcar, un alcohol de azúcar y un aminoácido.

La apolipoproteína puede ser cualquier apolipoproteína que sea un componente funcional, biológicamente activo, de una HDL de origen natural o una lipoproteína de alta densidad reconstituida/rHDL. Generalmente, la apolipoproteína o bien deriva del plasma o es una apolipoproteína recombinante como Apo A-I, Apo A-II, Apo A-V, pro-Apo A-I o una variante como Apo A-I Milano. Preferentemente, la apolipoproteína es Apo A-I. Más preferentemente la Apo A-I o bien es derivada recombinantemente y contiene la secuencia de tipo silvestre o la secuencia Milano, o alternativamente se purifica del plasma humano. La apolipoproteína puede estar en forma de un fragmento biológicamente activo de apolipoproteína. Dichos fragmentos pueden ser de origen natural, sintetizados químicamente o recombinantes. Únicamente a modo de ejemplo, un fragmento biológicamente activo de Apo A-I tiene preferentemente al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% a 100% o incluso más de 100% de la actividad estimuladora de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) de Apo A-I.

En la presente divulgación, la relación molar de apolipoproteína:lípido es generalmente de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:120, y preferentemente de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:100, más preferentemente de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:75 (mol:mol), y en particular de 1:45 a 1:65. Este intervalo incluye relaciones molares tales como aproximadamente 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95 y 1:100. Una relación particularmente ventajosa de apolipoproteína:lípido es de 1:40 a 1:65 (mol:mol). Esto asegura que la formulación de rHDL de acuerdo con la presente divulgación contiene un lípido a un nivel que no causa toxicidad hepática.

En otras realizaciones, la relación molar de apolipoproteína:lípido puede ser del orden de aproximadamente 1:80 a aproximadamente 1:120. Por ejemplo, la relación puede ser de 1:100 a 1:115, o de 1:105 a 1:110. En estas realizaciones, la relación molar puede ser por ejemplo de 1:80 a 1:90, de 1:90 a 1:100 o de 1:100 a 1:110. En una realización preferida, la formulación de rHDL de acuerdo con la presente invención, comprende además un detergente para estabilizar aún más las partículas de rHDL. El detergente puede ser cualquier detergente iónico (por ej., catiónico, aniónico, zwitteriónico) o no iónico, inclusive de ácidos biliares y sus sales, adecuado para usar en formulaciones de rHDL. Los detergentes iónicos pueden incluir ácidos biliares y sus sales, polisorbatos (por ej., PS80), 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano-sulfonato-(CHAPS), 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-

propanosulfonato (CHAPSO), bromuro de cetiltrimetilamonio, lauroilsarcosina, ácido tert-octil fenil propanosulfónico y ácido 4'-amino-7-benzamida-taurocólico.

5 Los ácidos biliares son generalmente esteroides dihidroxilados o trihidroxilados con 24 átomos de carbono, que incluyen ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico o ácido ursodesoxicólico. Preferentemente, el detergente es una sal biliar como una sal de colato, desoxicolato, quenodesoxicolato o ursodesoxicolato. Un detergente particularmente preferido es el colato de sodio. La concentración del detergente, en particular de colato de sodio, es preferentemente de 0.3 a 1.5 mg/mL. La concentración de ácido biliar se puede determinar empleando diversos métodos que incluyen un ensayo colorimétrico (por ejemplo, véanse Lerch et. al., 1996, Vox Sang. 71:155-164; Sharma, 2012, Int. J. Pharm Biomed. 3(2), 28-34; & Gallsauren test kit and Gallsauren-Stoppreagens (Trinity Biotech)). En algunas realizaciones dadas a conocer en este documento, la formulación de rHDL contiene niveles de colato de 0.5 a 1.5 mg/mL determinados mediante un ensayo colorimétrico, y un estabilizante de la liofilización en una concentración de aproximadamente 4.0 a 5.5%, particularmente de 4.3 a 5.3%, más particularmente de 4.3 a 5.0%, y muy preferentemente de 4.6 a 4.8% (p/p). En realizaciones particulares, el estabilizante de la liofilización es sacarosa. Dichas formulaciones presentan una buena estabilidad, y una baja toxicidad renal y hepática.

20 La relación entre la apolipoproteína y el estabilizante de la liofilización se ajusta habitualmente de modo que esa relación sea del orden de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:7 (p:p). Más preferentemente, la relación es del orden de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:3, en particular de aproximadamente 1:1.1 a aproximadamente 1:2. En realizaciones específicas, las formulaciones de rHDL tienen por lo tanto relaciones de 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9 o 1:2 (p:p). Sin embargo se contempla que para realizaciones particulares en las que hay bajas cantidades de proteína (por ej. <20 mg/mL) la relación entre la apolipoproteína y el estabilizante de la liofilización se pueda extender a tanto como aproximadamente 1:7 (p:p), por ej., a aproximadamente 1:4.5 (p:p).

25 Adecuadamente, la apolipoproteína está en una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/ml. Esto incluye 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mg/ml y todos los intervalos entre estas cantidades. La apolipoproteína se encuentra, preferentemente, en una concentración de aproximadamente 25 a 45 mg/ml. En otras realizaciones, la apolipoproteína puede estar en una concentración de aproximadamente 5 a 20 mg/ml, por ej., de aproximadamente 8 a 12 mg/ml.

30 El lípido puede ser cualquier lípido que sea un componente funcional, biológicamente activo, de una HDL de origen natural o de una lipoproteína de alta densidad reconstituida/rHDL. Dichos lípidos incluyen fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol, ácidos grasos y/o triglicéridos. Preferentemente, el lípido es al menos un fosfolípido cargado o no cargado, o una de sus mezclas.

35 En una realización preferida, la formulación de rHDL de acuerdo con la presente divulgación contiene una combinación de un detergente y un fosfolípido no cargado. En una realización preferida alternativa, la formulación de rHDL contiene un fosfolípido cargado pero ningún detergente. En otra realización preferida, la formulación de rHDL contiene lípidos cargados y no cargados así como un detergente.

40 Según se usa en este documento, "fosfolípidos no cargados", también denominados fosfolípidos neutros, son fosfolípidos que tienen una carga neta de aproximadamente cero al pH fisiológico. Los fosfolípidos no cargados pueden ser zwitteriones, aunque se conocen y se pueden utilizar otros tipos de fosfolípidos neutros. Los "fosfolípidos cargados" son fosfolípidos que tienen una carga neta al pH fisiológico. El fosfolípido cargado puede comprender un solo tipo de fosfolípido cargado o una mezcla de dos o más fosfolípidos diferentes, generalmente con el mismo tipo de carga. En algunos ejemplos, los fosfolípidos cargados son glicofosfolípidos cargados negativamente.

45 La formulación de acuerdo con la presente divulgación, puede también contener una mezcla de diferentes lípidos, como una mezcla de varios lípidos no cargados o de un lípido no cargado y un lípido cargado. Los ejemplos de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina (lecitina), ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina (cefalina), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y esfingomiélna (SM) o derivados naturales o sintéticos de estos. Los derivados naturales incluyen fosfatidilcolina de huevo, fosfatidilglicerol de huevo, fosfatidilcolina de soja, fosfatidilcolina de soja hidrogenada, fosfatidilglicerol de soja, fosfatidilserina cerebral, esfingolípidos, esfingomiélna cerebral, esfingomiélna de huevo, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, cefalina, cardiolipina y dicetilfosfato. Los derivados sintéticos incluyen dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), didecanoilfosfatidilcolina (DDPC), diérucoilfosfatidilcolina (DEPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DLPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (PMPC), palmitoilsteároylfosfatidilcolina (PSPC), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), diláuroilfosfatidilglicerol (DLPG), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG), ácido dimiristoilfosfatídico (DMPA), ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA), ácido diestearoilfosfatídico (DSPA), dipalmitoilfosfatidilserina (DPSP), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), dioleilfosfatidilserina (DOPS), dipalmitoilfosfatidilserina (DPSP) y diestearoilfosfatidilserina (DSSM). El fosfolípido también puede ser un derivado o análogo de cualquiera de los fosfolípidos anteriores. Los mejores resultados se pudieron obtener con la fosfatidilcolina. En otra realización, los lípidos de la formulación de acuerdo con la presente divulgación son esfingomiélna y un fosfolípido cargado negativamente, como fosfatidilglicerol (por ej., DPPG). Se

contempla específicamente una mezcla de esfingomielina y fosfatidilglicerol (particularmente DPPG) para usar en la presente divulgación. En estas realizaciones, la esfingomielina y el fosfatidilglicerol pueden estar presentes en cualquier relación adecuada, por ej., de 90:10 a 99:1 (p:p), generalmente de 95:5 a 98:2 y muy generalmente de 97:3.

5 La formulación de acuerdo con la presente divulgación, tiene generalmente una concentración del estabilizante de la liofilización de aproximadamente 1.0% a aproximadamente 6.0% por ej., de 1.0, 1.1, 1.2 o 1.3% a 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 o 6.0%, preferentemente de aproximadamente 1.0% a menos de 6.0%, por ej., de aproximadamente 1.0% a 5.9% (p/p de la formulación de rHDL). Preferentemente de aproximadamente 3.0% a menos de 6.0%, por ej., de aproximadamente 3.0% a 5.9%, preferentemente de aproximadamente 4.0 a 5.9%, preferentemente de aproximadamente 4.0% a 5.5%, preferentemente de 4.3 a 5.3%, preferentemente de 4.3 a 5.0%, y muy preferentemente de 4.6 a 4.8% (p/p), y en dicha formulación la relación entre la apolipoproteína y el lípido es preferentemente entre aproximadamente 1:20 y aproximadamente 1:75, más preferentemente entre aproximadamente 1:45 y aproximadamente 1:65 (mol:mol). El estabilizante de la liofilización es preferentemente un azúcar (por ej., sacarosa), opcionalmente en combinación con un alcohol de azúcar como manitol o sorbitol, o un aminoácido como prolina.

En una realización preferida, la formulación de rHDL de acuerdo con la presente divulgación tiene un pH en el intervalo de 6 a 8, preferentemente en el intervalo de 7 a 8. Aún más preferentemente, el pH se encuentra en el intervalo de 7.3 a 7.7.

20 En una realización preferida de la presente invención, la formulación está liofilizada. Debido a la presencia del estabilizante de la liofilización, preferentemente de sacarosa, sacarosa y manitol o sacarosa y prolina, en combinación con la relación de apolipoproteína:lípido, la liofilización produce un polvo estable con una vida útil prolongada. Este polvo se puede almacenar, usar directamente o después del almacenamiento, como un polvo, o usar después de la rehidratación para formar la formulación de lipoproteína de alta densidad reconstituida.

La invención también se puede utilizar para la producción a gran escala de lipoproteína de alta densidad reconstituida. El producto liofilizado se puede elaborar para preparaciones a granel, o alternativamente, la solución mixta de proteína/lípido se puede distribuir en recipientes más pequeños (por ejemplo, unidades de dosis únicas) antes de la liofilización, y tales unidades más pequeñas se pueden usar como formas farmacéuticas unitarias estériles. La formulación liofilizada se puede reconstituir para obtener una solución o una suspensión del complejo proteína-lípido, que constituye la lipoproteína de alta densidad reconstituida. El polvo liofilizado se rehidrata con una solución acuosa hasta un volumen adecuado. Las soluciones acuosas preferidas son agua para inyección (API), solución salina amortiguada con fosfato o solución salina fisiológica. La mezcla se puede agitar para facilitar la rehidratación. Preferentemente, el paso de reconstitución se lleva a cabo a temperatura ambiente.

Es bien conocido por los expertos en el área, cómo obtener una solución que contenga el lípido y la apolipoproteína, tal como se describe en WO 2012/000048.

40 En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un método para producir una formulación de rHDL que incluye el paso de agregar el estabilizante de la liofilización a la solución que contiene el lípido y la apolipoproteína hasta que se alcanza una concentración de aproximadamente 1.0% a aproximadamente 6.0% (p/p de la formulación de rHDL), por ej., de 1.0, 1.1, 1.2 o 1.3 a 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 o 6.0. En una realización preferida, el estabilizante de la liofilización se agrega hasta que se alcanza una concentración de aproximadamente 1.0% a menos de 6.0% por ej., de aproximadamente 1.0% a 5.9%. Preferentemente, el estabilizante de la liofilización se agrega hasta que se alcanza una concentración de aproximadamente 3.0 a menos de 6.0%, por ej., de aproximadamente 3.0 a 5.9%. Más preferentemente, el estabilizante de la liofilización se agrega hasta que se alcanza una concentración de aproximadamente 4.0 a 5.5%, particularmente de 4.3 a 5.3%, más particularmente de 4.3 a 5.0%, y muy preferentemente de 4.6 a 4.8% (p/p). La solución puede ya contener un estabilizante.

50 En realizaciones preferidas, la solución incluye además un detergente como colato de sodio. En una realización preferida, la formulación de rHDL se fabrica combinando Apo A-I purificada del plasma con fosfatidilcolina (PC), en presencia de colato de sodio y sacarosa a una concentración de aproximadamente 1.0% a aproximadamente 6.0%, preferentemente de aproximadamente 1.0% a menos de 6.0% p/p para producir partículas con forma de disco, asociadas no covalentemente (PM aproximadamente 144 kDa).

60 En realizaciones particulares, la formulación de rHDL está compuesta por una Apo A-I (recombinante o purificada del plasma) y fosfatidilcolina, estabilizada mediante colato y sacarosa a una concentración de aproximadamente 1.0% a aproximadamente 6.0% p/p, preferentemente de aproximadamente 1.0% a menos de 6.0%. En realizaciones particulares, los niveles de colato son de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 1.5 mg/mL. Preferentemente, la Apo A-I recombinante comprende una secuencia de tipo silvestre o la secuencia Milano (que cuando se expresa forma dímeros).

La formulación de rHDL liofilizada de la presente invención, se puede elaborar por cualquier método de liofilización conocido en el área, incluida la deshidratación por congelación, es decir la solución que contiene apolipoproteína/lípido se somete a congelación seguido de evaporación a presión reducida.

5 Las formulaciones de rHDL liofilizadas que se proporcionan, pueden retener prácticamente todas sus características de estabilidad originales durante al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 o más meses. Por ejemplo, las formulaciones de rHDL liofilizadas, almacenadas a una temperatura de 2-8 °C o 25 °C pueden retener habitualmente prácticamente la misma distribución de tamaño molecular medida por HPLC-SEC cuando se almacenan durante 6 meses o más. Realizaciones particulares de la formulación de rHDL pueden ser estables y adecuadas para el uso farmacéutico
10 comercial durante al menos 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses o incluso más, cuando se almacenan a una temperatura de 2-8 °C y/o a temperatura ambiente.

La formulación de rHDL de acuerdo con la presente invención, se puede utilizar para prevenir o tratar una enfermedad, un trastorno o una afección en un ser humano. Adecuadamente, la enfermedad, el trastorno o la afección responden a
15 la administración profiláctica o terapéutica de la formulación de rHDL de acuerdo con la presente divulgación. Los ejemplos de dichas enfermedades, dichos trastornos o dichas afecciones incluyen aterosclerosis; enfermedad cardiovascular (por ej., síndrome coronario agudo (SCA) como angina de pecho e infarto de miocardio); o enfermedades, trastornos o afecciones como diabetes que predisponen a SCA; hipercolesterolemia (por ej., elevado nivel de colesterol sérico o elevado nivel de colesterol LDL) e hipocolesterolemia resultante de menores niveles de
20 lipoproteína de alta densidad (HDL), como es sintomático de la enfermedad de Tangier.

Las formulaciones de rHDL de acuerdo con la presente invención, se pueden administrar por cualquier vía de administración conocida en el área. Preferentemente, las formulaciones de rHDL se administran por vía parenteral, tal como infusión o inyección (IV). En realizaciones preferidas, la formulación de rHDL contiene Apo A-I (recombinante o purificada del plasma) que ha sido reconstituida para formar partículas adecuadas para la infusión IV.
25

La dosis administrada de la formulación de rHDL puede ser del orden de aproximadamente 1 a aproximadamente 120 mg/kg de peso corporal. Preferentemente, la dosis es del orden de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 mg/kg inclusive dosis de 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg y 70 mg/kg. Alternativamente, la administración se puede lograr mediante dosis fijas de rHDL, es decir, en una cantidad independiente del peso corporal del paciente. Las dosis fijas preferidas incluyen 0.1-15 g, 0.5-12 g, 1-10 g, 2-9 g, 3-8 g, 4-7 g o 5-6 g de apolipoproteína. Las dosis fijas particularmente preferidas incluyen 1-2 g, 3-4 g, 5-6 g o 6-7 g de apolipoproteína. Los ejemplos de dosis fijas específicas incluyen 0.25 g, 0.5 g, 1.0 g, 1.7 g, 2.0 g, 3.4 g, 4.0 g, 5.1 g, 6.0 g, 6.8 g y 8.0 g de apolipoproteína. Por lo tanto, un vial contiene preferentemente la formulación de rHDL liofilizada con un contenido de proteína de 0.25 g, 0.5 g, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8 o 10 g por vial. Más preferentemente el contenido de proteína es 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 o 10 g por vial.
30
35

La presente divulgación también proporciona un kit de apolipoproteína que contiene una o más dosis de la formulación de la apolipoproteína dada a conocer en este documento y uno o más de otros componentes del kit.
40

Adecuadamente, el kit está destinado a tratar profiláctica o terapéuticamente una enfermedad, un trastorno o una afección en un ser humano, según se describió en este documento precedentemente.

Los ejemplos de uno o más de otros componentes del kit incluyen instrucciones para el uso; viales, envases u otros recipientes de almacenamiento que contienen cada una de las dosis; dispositivos para la administración como agujas, catéteres, jeringas, tubos y similares; y/o un empaque adecuado para el almacenamiento y/o el transporte del kit de manera segura y conveniente. Preferentemente, las instrucciones para el uso son una etiqueta o un prospecto, donde la etiqueta o el prospecto indican que la formulación de apolipoproteína se puede utilizar para tratar una enfermedad o una afección como una enfermedad cardiovascular, mediante la administración de una cantidad de dosis fija a un sujeto humano que la necesita.
45
50

Un 'prospecto' se refiere a las instrucciones incluidas en los envases comerciales de las formulaciones de apolipoproteína, que contiene información acerca de las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias concernientes al uso de dichas formulaciones de apolipoproteína.
55

Para los propósitos de este documento, un 'vial' se refiere a un envase que retiene una formulación de apolipoproteína. El vial puede estar sellado por un tapón perforable por una jeringa. Generalmente, el vial se fabrica de material de vidrio. La formulación de apolipoproteína en el vial puede estar en diversos estados que incluyen líquido, liofilizado, congelado, etc. La formulación de apolipoproteína de dosis fija es preferentemente estable dado que la turbidez es una forma de medición preferida. Un nivel de turbidez inferior a aproximadamente 5, 10, 15, 20 o 30 NTU se puede considerar en general como una dosis estable de una formulación de apolipoproteína. Las mediciones de turbidez se pueden tomar incubando las formulaciones de apolipoproteína en períodos de tiempo como de 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h, 72 h, 7 días y 14 días a temperaturas de almacenamiento como la temperatura ambiente o 2 a 8 °C.
60

Preferentemente, se considera que la formulación de apolipoproteína es estable como un líquido, cuando se almacena durante 14 días a temperatura ambiente y presenta una turbidez inferior a 15 NTU.

5 El kit puede facilitar la administración de la formulación de apolipoproteína por un profesional de la salud o por un cuidador, o la autoadministración por un paciente.

Según se usa en este documento, la expresión "que contiene(n)" abarca "que incluye(n)" así como "que consta(n)" por ej., una formulación o un componente de una formulación que se describe como "que contiene" X puede constar exclusivamente de X o puede incluir algo adicional por ej., X + Y.

10 El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

La palabra "prácticamente" no excluye "completamente" por ej., una composición que está "prácticamente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, la palabra "prácticamente" se puede omitir de la definición de la invención.

20 Cuando la invención proporciona un proceso que implica múltiples pasos secuenciales, la invención también puede proporcionar un proceso que implica menos del total del número de pasos. Los diferentes pasos pueden ser realizados en diferentes momentos, por diferentes personas, en diferentes lugares (por ej., en diferentes países).

A menos que se indique específicamente, un proceso que comprende un paso de mezcla de dos o más componentes, no requiere ningún orden específico de mezcla. Por lo tanto los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes entonces dos componentes se pueden combinar entre sí, y después la combinación se puede combinar con el tercer componente, etc.

25 En este documento se describen varias realizaciones de la invención. Se apreciará que las características especificadas en cada realización se pueden combinar con otras características especificadas, para proporcionar otras realizaciones. En particular, las realizaciones resaltadas en este documento como adecuadas, generales o preferidas se pueden combinar entre sí (a menos que sean mutuamente excluyentes).

30 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Distribución del tamaño molecular de formulaciones que contienen 5 a 10% p/p de sacarosa.

35 Figura 2A: Comparación directa de la distribución del tamaño molecular de formulaciones que contienen 4 y 7.5% p/p de sacarosa.

Figura 2B: Distribución del tamaño molecular de formulaciones que contienen 1, 2, 3, 4 y 7.5% (p/p) de sacarosa.

Figura 2C: Distribución del tamaño molecular de formulaciones que contienen sacarosa y prolina, y 7.5% de sacarosa.

Figuras 3A y 3B: Actividad de LCAT para formulaciones de 4 a 10% p/p de sacarosa.

40 Figure 3C: Actividad de LCAT para formulaciones de 1, 2, 3, 4 y 7.5% p/p de sacarosa.

Figura 3D: Actividad de LCAT para formulaciones que contienen sacarosa y prolina.

Figuras 4A a 4B: Impacto de la concentración de sacarosa sobre la salida de colesterol.

Figura 4C: Impacto de las formulaciones que contienen sacarosa y prolina sobre la salida de colesterol.

Figuras 5A a 5H: Turbidez de formulaciones con diferentes concentraciones de sacarosa, y de formulaciones que contienen sacarosa y prolina.

45 Figura 6: Foto de tortas liofilizadas con diferente concentración de sacarosa.

Figura 7: Foto de tortas liofilizadas con diferentes concentraciones de sacarosa, y sacarosa y prolina.

Ejemplos

50 Ejemplo 1: Preparación de las muestras

Para preparar las muestras para los experimentos siguientes, se disolvió colato de sodio (New Zealand Pharmaceuticals) en tampón (NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, TRIS 10 mM, pH 8.0) y se agitó hasta que se volvió transparente. Se agregó fosfatidilcolina de soja (Phospholipid GmbH) a un volumen apropiado del colato y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Se diluyó la solución de Apo A-I hasta una concentración de proteína de 9.0 mg/mL (determinada mediante DO 280) con NaCl 10 mM y se mezcló con un volumen apropiado de la solución de lípido para obtener una relación entre proteína y lípido del orden de 1:45 a 1:65. La mezcla se agitó a 2-8 °C durante 30 min a 16 h. Se prepararon miméticos de HDL mediante diálisis de colato empleando 1% de sacarosa como tampón de diafiltración. El eluido se concentró hasta una concentración de proteína de 33 a 38 g de proteína/L. Se agregó sacarosa para obtener la concentración deseada (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6.5%, 7%, 10% p/p). El pH de la solución se ajustó con NaOH 0.2 M hasta pH 7.50 ± 0.1 luego de lo cual se agregó API (agua para inyección) para obtener una concentración de proteína de 30 mg/mL. Después, las formulaciones finales se esterilizaron por filtración a través de un filtro de $0.2 + 0.1 \mu\text{m}$, se distribuyeron en viales de vidrio de 100 mL a razón de 1.7 g de proteína por vial y se liofilizaron.

En algunas formulaciones se agregó prolina hasta la concentración deseada. La prolina mantiene una formulación isotónica.

5 Ejemplo 2: Distribución del tamaño molecular

Se determinó la formación de partículas empleando HPLC-SEC y se evaluó mediante la distribución del tamaño molecular de las diversas formulaciones. Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC-SEC) en una columna Superose 6 HR 10/30 (GE Healthcare) con 140 mmol/l de NaCl, 10 mmol/l de fosfato, 0.02% de NaN₃, pH 7.4, con una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Se aplicaron muestras de aproximadamente 90 µg de proteína, y se registraron los perfiles de elución a 280 nm.

Se observó una pequeña diferencia para formulaciones que contenían 5-10% p/p de sacarosa en la formulación final (Figura 1), lo que indica que las formulaciones que contenían \geq 5% p/p de sacarosa no afectaron la estabilidad de las partículas después de la reconstitución. La figura 1 muestra un cromatograma completo de (1) control interno, 2: 5% p/p de sacarosa, 3: 6.5% p/p de sacarosa, 4: 7.5% p/p de sacarosa y 5: 10% p/p de sacarosa.

Además, una comparación directa entre una formulación de 7.5% p/p de sacarosa y una formulación de 4% p/p de sacarosa demostró que estas formulaciones presentaron una distribución del tamaño molecular similar (Figura 2A).

Las figuras 2B y 2C muestran los resultados para concentraciones de sacarosa de 1, 2, 3 y 4% (p/p), y formulaciones que contienen sacarosa y prolina.

Todas las formulaciones probadas fueron estables. El contenido de sacarosa de 4 a 7.5% p/p fue óptimo y no afectó la estabilidad de las partículas después de la reconstitución.

Ejemplo 3: Activación de LCAT

Se determinó una medida de la eficacia de las partículas de rHDL en diversas formulaciones midiendo la actividad de LCAT. Las partículas de HDL son capaces de secuestrar el colesterol de placas formadas a lo largo de las paredes arteriales o las células, mediante la interacción con el transportador de casete de unión a ATP A1 (ABCA1). La lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), una enzima plasmática, convierte el colesterol libre en éster de colesterol (una forma más hidrófoba del colesterol), que después es secuestrado en el núcleo de la partícula de HDL antes de ser transportado al hígado para su metabolización. Si el contenido de sacarosa en la formulación final afectara la eficacia de la partícula de rHDL, la actividad de LCAT disminuiría.

La esterificación de la actividad de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) fue descrita por Stokke y Norum (Scand J Clin Lab Invest. 1971;27(1):21-7). Se incubaron 150 µl de plasma humano mezclado (CSL Behring) con 10 µl de muestra de rHDL y 150 µl de PBS en presencia de 20 µl de [4-¹⁴C]colesterol (7.5 µCi/ml) durante 1.5 h a 4 °C. Para iniciar la esterificación del colesterol, se colocó la mitad de la mezcla de reacción a 37 °C durante 30 min mientras la otra mitad se incubaba a 4 °C durante 30 min (para determinar el ruido de fondo). Para ambas muestras el colesterol y el éster de colesterol se extraen mediante una extracción líquido-líquido con n-hexano. El éster de colesterol se separó del colesterol sin esterificar empleando una columna de extracción de fase sólida (SampliQ Amino, Agilent) y midiendo mediante recuento de centelleo. La tasa de recuento de la muestra almacenada a 4 °C se sustrae de la tasa de recuento de la muestra almacenada a 37 °C. También se realiza el mismo procedimiento con una muestra de referencia. La actividad de LCAT se expresa como % de la muestra de referencia.

Las figuras 3A y 3B muestran la actividad de LCAT para formulaciones de 4-10% p/p de sacarosa. La figura 3C muestra la actividad de LCAT para formulaciones de 1-4% p/p de sacarosa. Se observa una muy pequeña diferencia en la actividad de LCAT cuando la sacarosa varía de 5-10% p/p en la formulación final (Figura 3A), sin embargo es evidente una ligera tendencia a disminuir cuando la sacarosa se reduce posteriormente a 4% p/p (Figura 3B). La figura 3D muestra la actividad de LCAT para formulaciones que contienen sacarosa y prolina. No se observa una tendencia evidente en la actividad de LCAT para formulaciones que contienen sacarosa y prolina. Por lo tanto la eficacia de las partículas de HDL en las formulaciones de sacarosa/prolina se mantiene.

55 Ejemplo 4: Salida de colesterol

El transporte inverso del colesterol (RCT, por sus siglas en inglés) es una ruta mediante la cual el colesterol acumulado es transportado de la pared de los vasos al hígado para su excreción. Las células liberan colesterol libre a Apo A-I con bajo contenido de lípido, a través de la ruta ABCA1. El ensayo de salida de colesterol mide la capacidad de las HDL para aceptar colesterol liberado de las células. Se anticipa que si el contenido de sacarosa afectara la formación de partículas y/o la integridad, las diferencias afectarían la salida de colesterol.

La salida de colesterol de líneas celulares de macrófagos murinos J774 y RAW 264.7 es altamente sensible a la estimulación con cAMP, lo que conduce al aumento de ABCA1 (Bortnick et. al., J Biol Chem. 2000;275(37):28634-40). Se obtuvieron células RAW264.7 de American Type Culture Collection (ATCC). Las células se cultivaron en DMEM (medio modificado de Eagle de Dulbecco, Gibco) complementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternero (FCS, Gibco), glutamina 2 mM, 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina en una estufa de incubación humidificada con CO₂ a 37 °C. Para los experimentos de salida, se sembraron células en placas de 24 pocillos a una densidad de 0.35 x 10⁶ células por pocillo. Al día siguiente, las células se marcaron con [1,2-³H]colesterol (1 µCi/mL, GE) en DMEM complementado con 5% (v/v) de FCS. Después de un período de marcado de 36 h, las células se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y después se incubaron en DMEM que contenía 0.2% de seroalbúmina bovina exenta de ácido (BSA) en ausencia o presencia de sal sódica de 8-bromoadenosin monofosfato-3',5'-cíclico-cAMP (8Br-cAMP) 0.3 mM durante 16 h para aumentar a ABCA1. Después de dos lavados con PBS, las células se incubaron con diferentes aceptores de colesterol en DMEM/0.2% de medio BSA exento de ácido. Después de 5-6 h de incubación, las placas se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos para eliminar todas las células flotantes y los desechos celulares. Se midió la radiactividad en los sobrenadantes celulares mediante recuento de centelleo en líquido. El [³H]colesterol total asociado a células, se determinó después de la extracción de las células en pocillos de control durante al menos 30 minutos con Triton X-100 0.1 M. La salida de colesterol se expresó como el porcentaje de la radiactividad liberada en el medio por las células, en relación con la radiactividad total de las células en el medio. La diferencia en la salida entre el control y las células estimuladas con 8Br-cAMP se tomó como una medida de la salida dependiente de ABCA1.

Las figuras 4A y 4B muestran que a medida que la concentración de sacarosa disminuye de 7.5% p/p a 4% p/p, aumenta la salida de colesterol. No se observó una diferencia evidente en la salida de colesterol entre las formulaciones que contenían prolina y la formulación que contenía 7.5% de sacarosa (Figura 4C).

25 Ejemplo 5: Turbidez

El término turbidez se usa para describir la nubosidad o neblinosidad de una solución. Estrictamente, la turbidez surge de los múltiples eventos de dispersión de la luz visible por los elementos presentes en la solución. Dado que la turbidez surge de la luz dispersada neta, depende de la longitud del recorrido de la muestra, la concentración de proteína y el tamaño de la proteína/los agregados/las partículas. Dado que todas las formulaciones de sacarosa reducida contenían la misma concentración de proteína al reconstituirlas, y se midieron con la misma longitud del recorrido, las diferencias en la turbidez se pueden atribuir a las diferencias en el tamaño y/o la cantidad de proteína/agregados/partículas resultantes de las diversas formulaciones de sacarosa.

35 La turbidez se determinó con un nefelómetro LED (Hach 2100AN Turbidimeter, Loveland, CO.) empleando formacina como patrón. Los resultados se indican como dispersión de la luz relativa (NTU).

Las formulaciones que contenían 4-10% p/p de sacarosa produjeron soluciones con una turbidez similar luego de la reconstitución (Figuras 5A y 5B). Las concentraciones de sacarosa inferiores a 4% mostraron una mayor turbidez (Figuras 5E y 5G). Basándose en la turbidez, las concentraciones de sacarosa de 4% (p/p) y superiores se consideran óptimas.

45 Los aumentos relativos en la turbidez de una solución con el almacenamiento, se citan a menudo como una indicación de la agregación en productos biofarmacéuticos proteínicos. Las figuras 5C, 5D, 5F y 5H muestran que hubo muy poco o ningún aumento de la turbidez luego del almacenamiento en forma líquida, lo que indica estabilidad de las partículas.

Ejemplo 6: Aspecto de la torta liofilizada

50 Las formulaciones de sacarosa con 4% p/p y 7.5% p/p de sacarosa produjeron las tortas liofilizadas más estables (Figura 6).

Las formulaciones de sacarosa con 1 a 4% p/p, y las formulaciones que contenían sacarosa y prolina, también produjeron tortas liofilizadas estables (Figura 7).

55 Ejemplo 7: Estabilidad de las formulaciones de rHDL

60 Se examinó la estabilidad de las formulaciones de rHDL liofilizadas (preparadas según el ejemplo 1) antes y después del almacenamiento (protegidas de la luz) a 40 °C durante 12 semanas. Los parámetros probados incluyeron pH, turbidez, activación de LCAT, HPLC-SEC (contenido de agregados, % de lipoproteína en pico único y su tiempo de retención relativo) y salida de colesterol (salida de C) (Tablas 1 y 2). Los resultados indican que las formulaciones permanecen estables durante el período de almacenamiento.

ES 2 719 275 T3

Tabla 1

1385.E009.0	t = 0					t = 12 semanas				
9-40 °C	1% de sacarosa	2% de sacarosa	3% de sacarosa	4% de sacarosa	7.5% de sacarosa	1% de sacarosa	2% de sacarosa	3% de sacarosa	4% de sacarosa	7.5% de sacarosa
Turbidez	12.4	10.4	8.63	6.87	6.06	13.7	11.1	7.24	5.41	5.16
Activación de LCAT	97	102	104	110	111	94	101	100	98	105
Agregados por HPLC-SEC	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
HPLC-SEC - pico de lipoproteína	98.8	99.2	99.5	99.6	99.6	99.3	99.7	99.6	99.6	99.6
Salida de C (salida total)	110	95	103	119	102	109	85	114	116	84

Tabla 2

1385.E009.14-16 /40 °C	t = 0			t = 12 semanas		
	1% de sacarosa/2.2% de prolina	3% de sacarosa/1.5% de prolina	4% de sacarosa/1.2% de prolina	1% de sacarosa/2.2% de prolina	3% de sacarosa/1.5% de prolina	4% de sacarosa/1.2% de prolina
Turbidez	8.20	8.48	7.48	8.74	6.14	6.12
Activación de LCAT	104	116	109	95	103	99
Agregados por HPLC-SEC	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
HPLC-SEC - pico de lipoproteína	98.6	99.4	99.5	99.2	99.5	99.7
Salida de C (salida total)	114	80	97	120	108	99

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una formulación de lipoproteína de alta densidad reconstituida (rHDL) que contiene una apolipoproteína, un lípido y un estabilizante de la liofilización, en la que la relación entre la apolipoproteína y el lípido es entre 1:20 y 1:120 (mol:mol) y el estabilizante de la liofilización contiene sacarosa presente en una concentración de 1.0% a menos de 6.0% (p/p de la formulación de rHDL).
- 10 **2.** La formulación de rHDL de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la relación entre la apolipoproteína y el estabilizante de la liofilización es entre 1:1 (p:p) y 1:3 (p:p).
- 3.** La formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el estabilizante de la liofilización está presente en una concentración de 4.0 a 5.5% (p/p).
- 15 **4.** La formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la formulación contiene además un detergente.
- 5.** La formulación de rHDL de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el detergente comprende colato de sodio.
- 20 **6.** La formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación entre la apolipoproteína y el lípido es entre 1:20 y 1:100 (mol:mol).
- 7.** La formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la concentración de la apolipoproteína es de 5 a 50 mg/ml.
- 25 **8.** La formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la apolipoproteína comprende apolipoproteína A-I (Apo A-I).
- 9.** La formulación de rHDL de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la Apo A-I se purifica del plasma.
- 30 **10.** La formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el lípido contiene al menos un fosfolípido cargado o no cargado, o una mezcla de estos, preferentemente una fosfatidilcolina.
- 11.** La formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la apolipoproteína es Apo A-I purificada del plasma, el lípido es fosfatidilcolina, el estabilizante de la liofilización es sacarosa y la formulación contiene además detergente de colato de sodio.
- 35 **12.** La formulación de rHDL de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la relación entre la apolipoproteína y el lípido es entre 1:45 y 1:65 (mol:mol); el estabilizante de la liofilización está presente en una concentración de 4.6 a 4.8% (p/p); y el colato de sodio está presente en una concentración de 0.5 a 1.5 mg/mL.
- 40 **13.** La formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la formulación tiene un pH en el intervalo de 6 a 8.
- 45 **14.** Una formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la formulación está liofilizada.
- 15.** Un vial que contiene la formulación de rHDL liofilizada de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el contenido de proteína es de 1, 2, 4, 6, 8 o 10 g por vial.
- 50 **16.** Un método para producir una formulación de rHDL que contenga una apolipoproteína, un lípido y un estabilizante de la liofilización, en la que la relación entre la apolipoproteína y el lípido sea entre 1:20 y 1:120 (mol:mol), que dicho método incluya el paso de agregar el estabilizante de la liofilización que contiene sacarosa a la solución que contiene el lípido y la apolipoproteína, hasta que se alcance una concentración de sacarosa de 1.0% a menos de 6.0% (p/p).
- 55 **17.** Una formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para utilizar en el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una afección en un ser humano, donde la enfermedad, el trastorno o la afección incluyen una enfermedad cardiovascular, hipercolesterolemia o hipocolesterolemia.
- 60 **18.** Una formulación de rHDL para utilizar de acuerdo con la reivindicación 17, donde la enfermedad, el trastorno o la afección incluyen el síndrome coronario agudo (SCA), aterosclerosis, angina de pecho e infarto de miocardio.

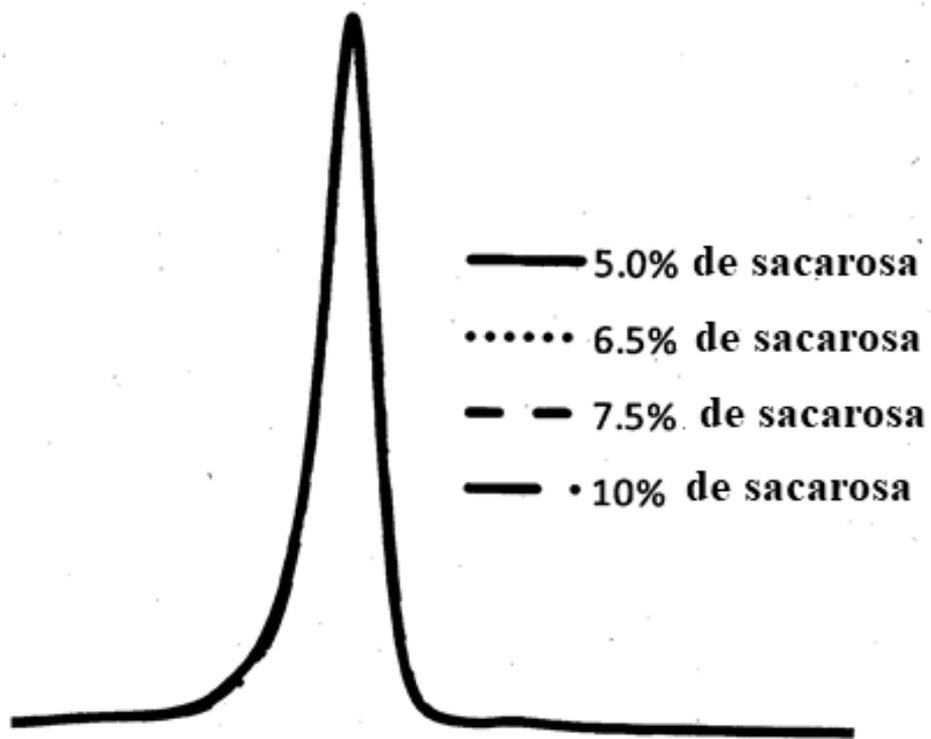


Figura 1

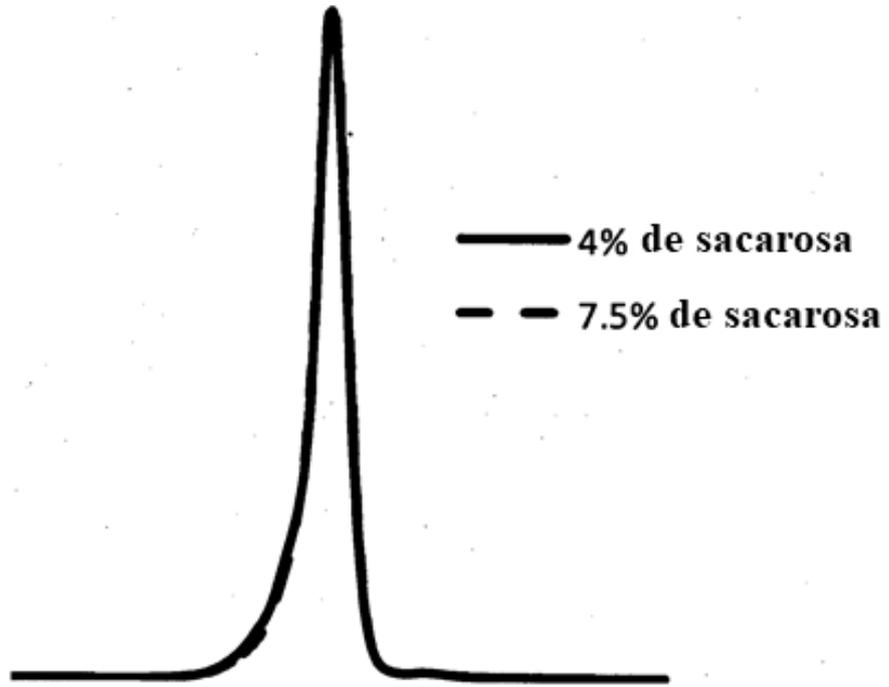


Figura 2A

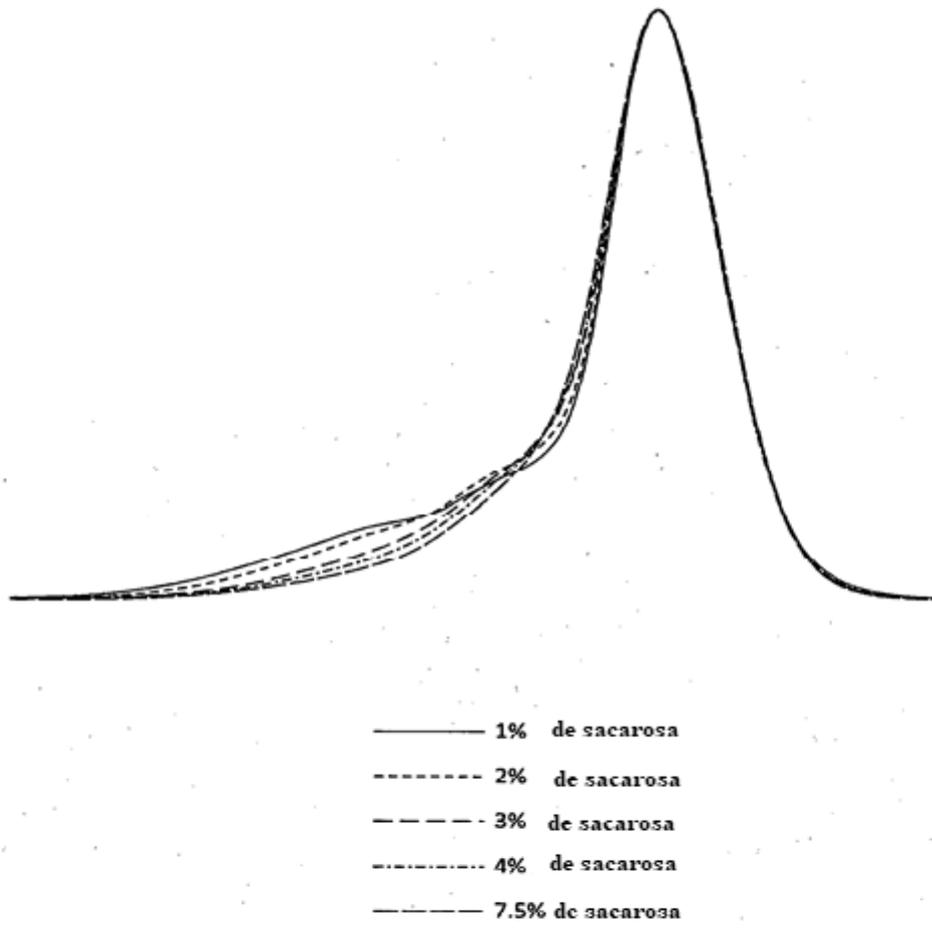


Figura 2B

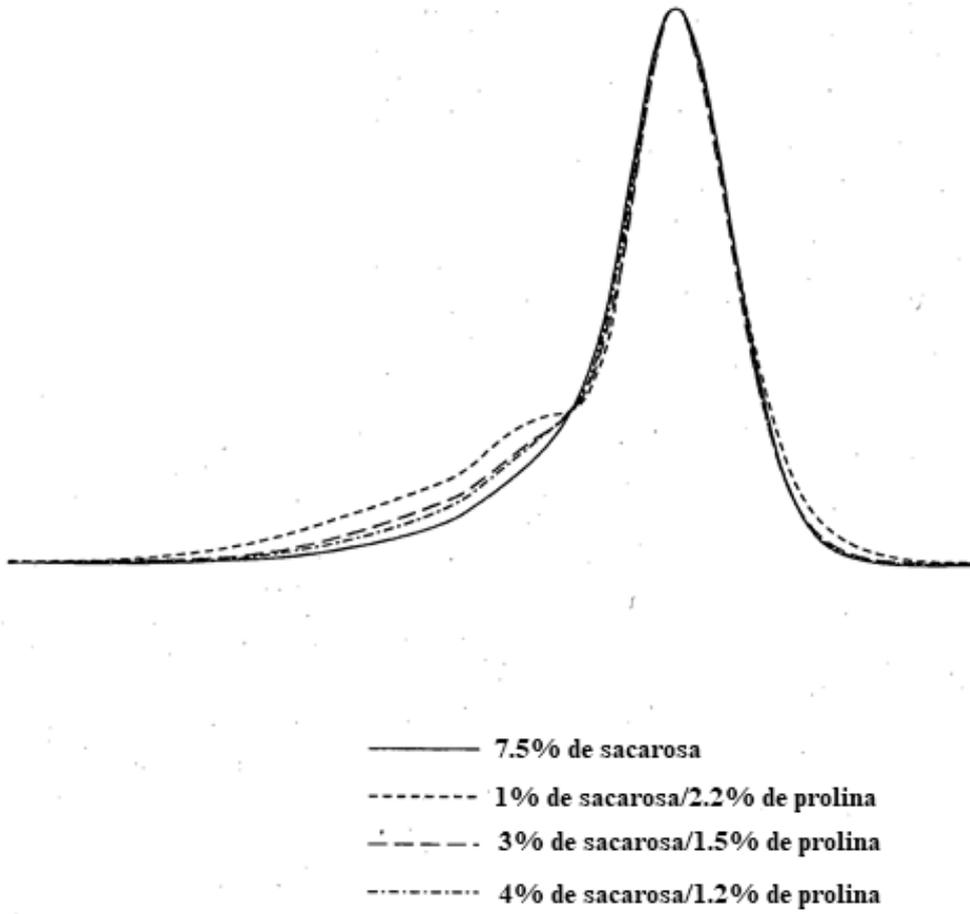


Figura 2C

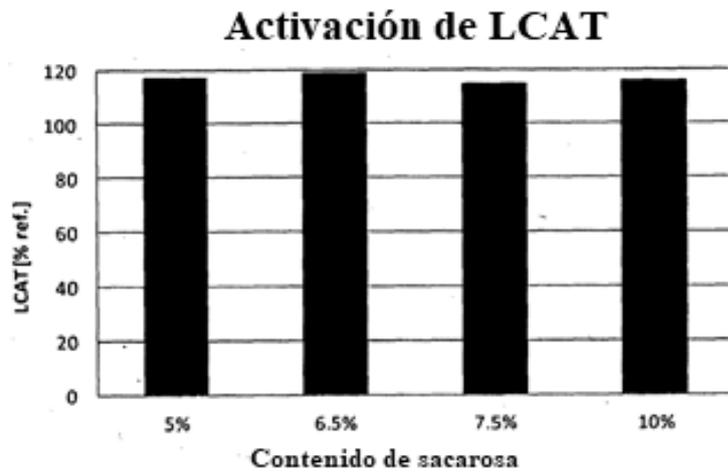


Figura 3A

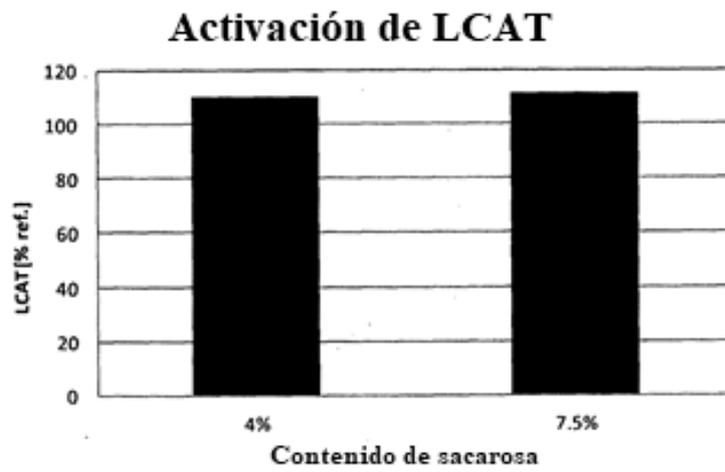


Figura 3B

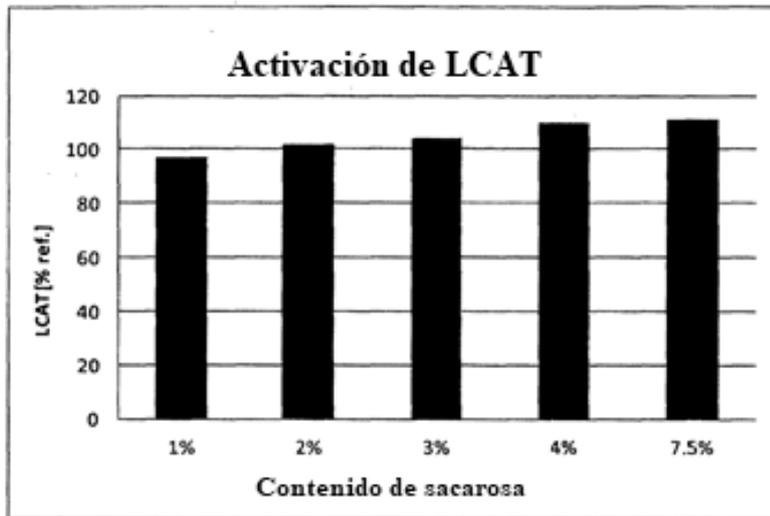


Figura 3C

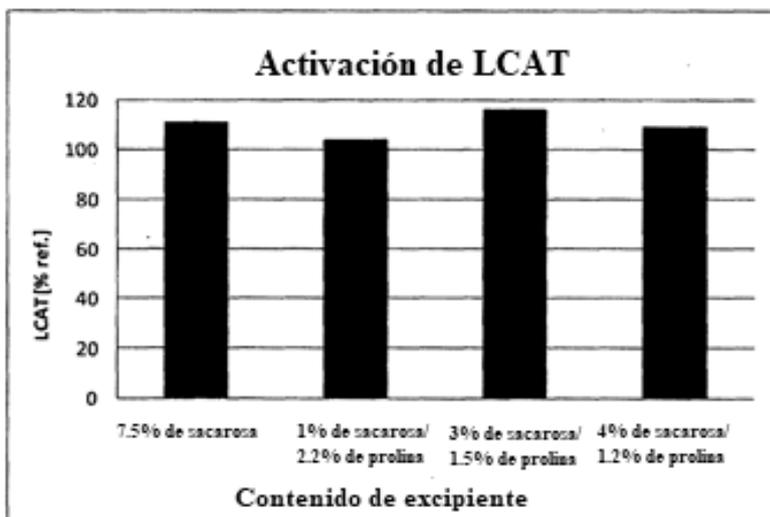


Figura 3D

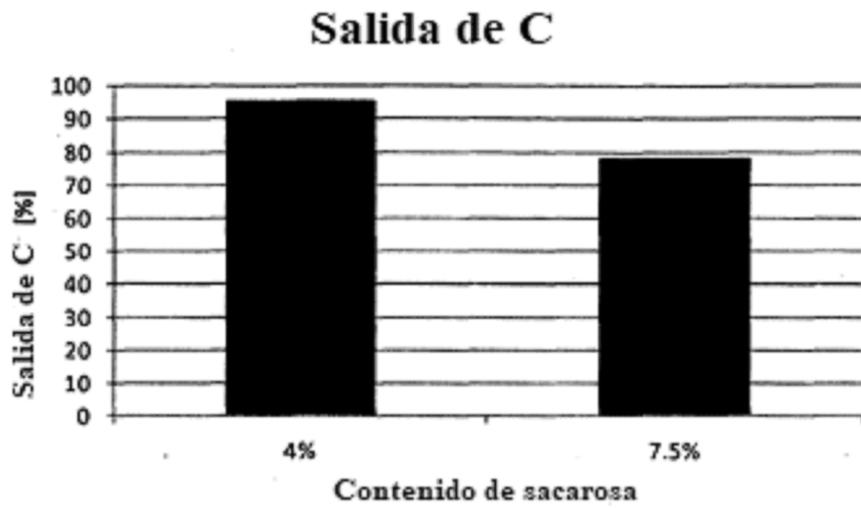


Figura 4A

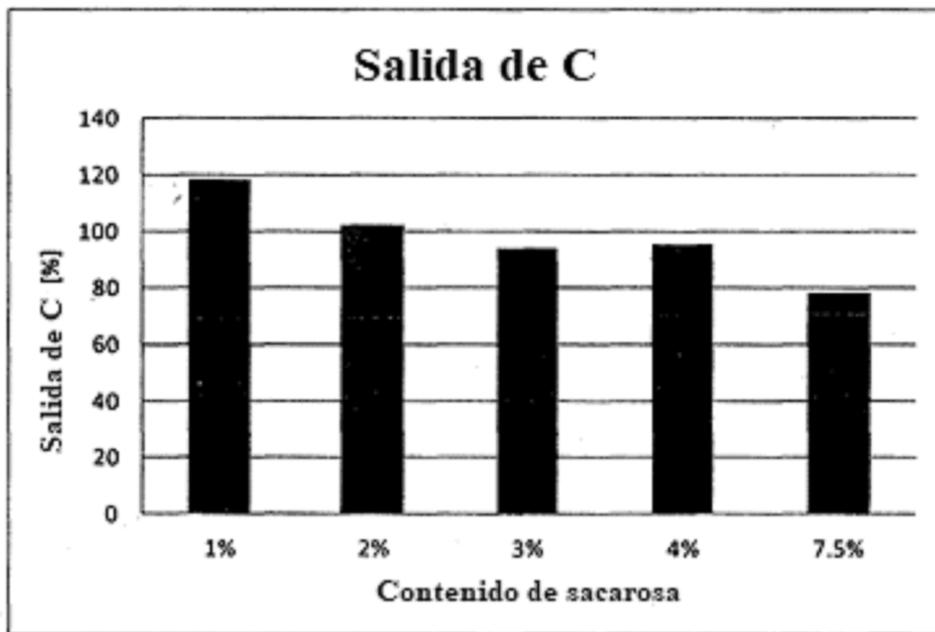


Figura 4B

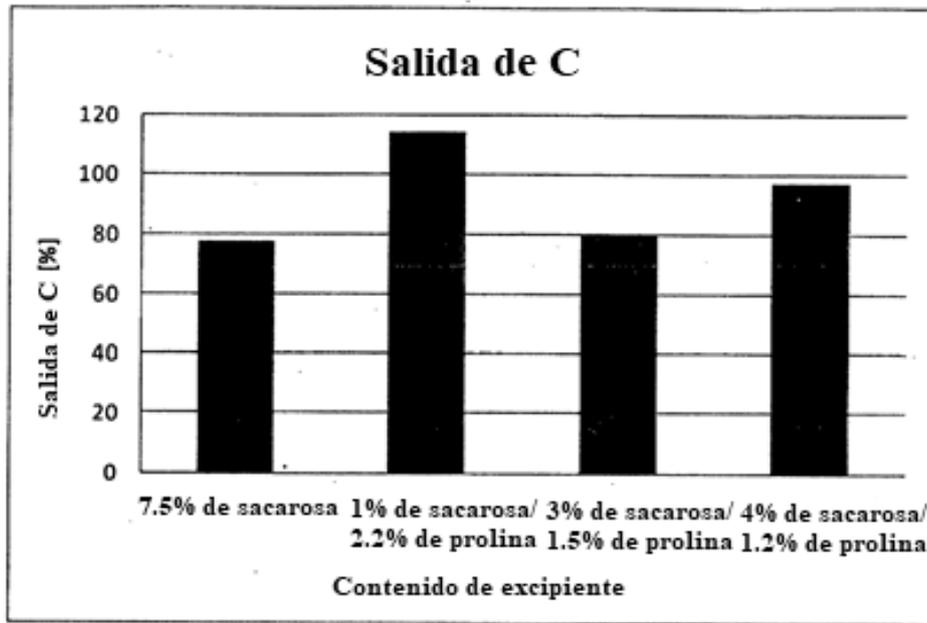


Figura 4C

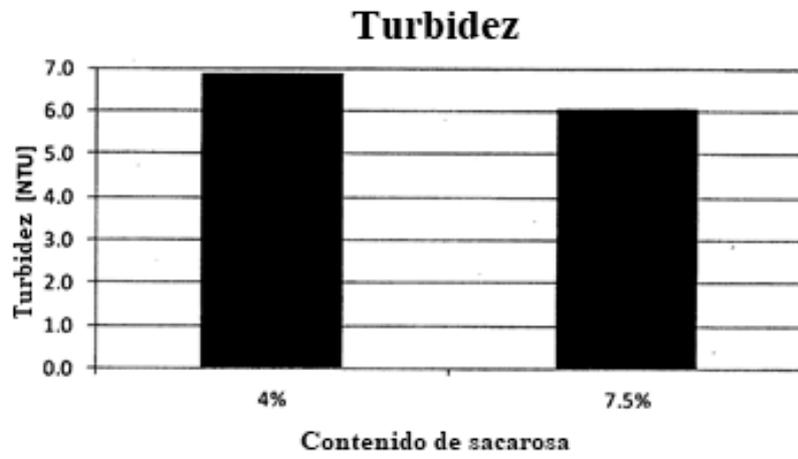


Figura 5A

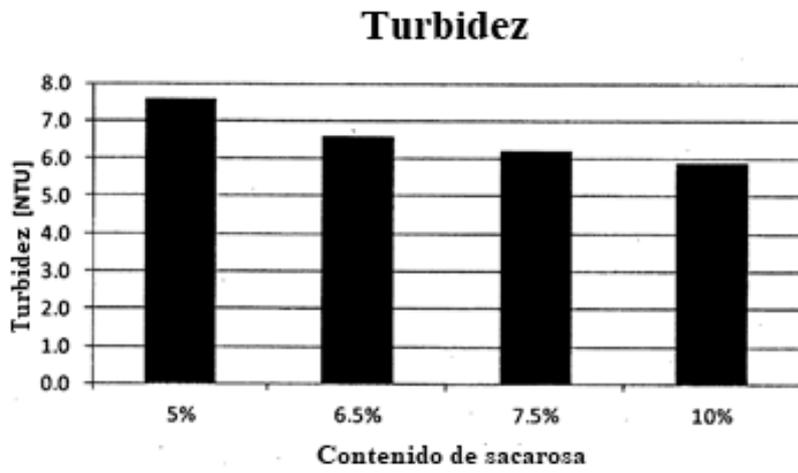


Figura 5B

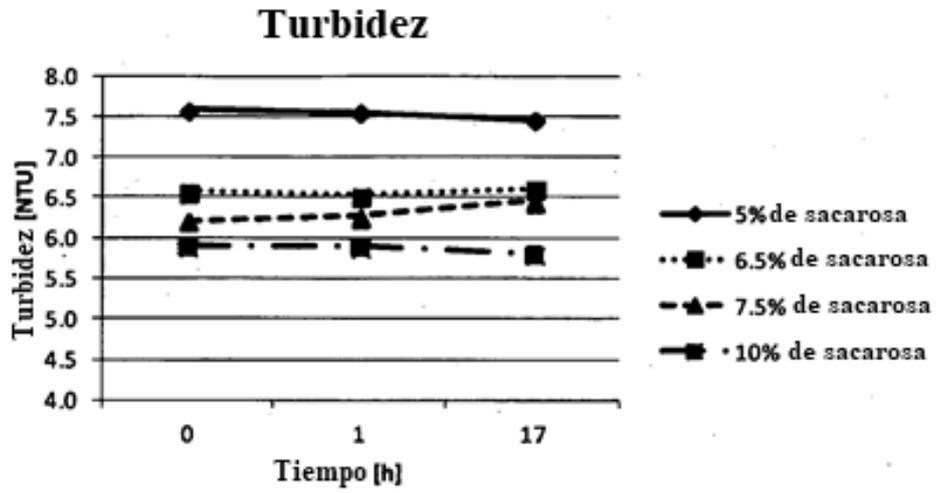


Figura 5C

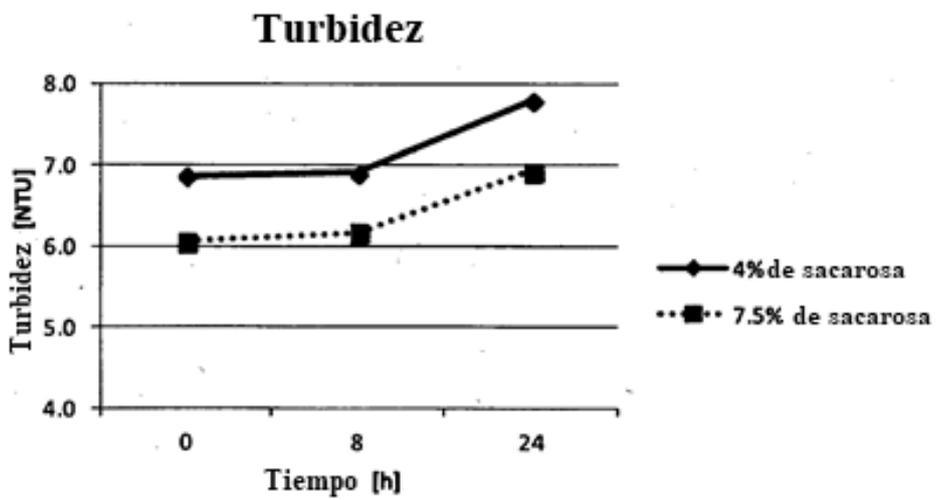


Figura 5D

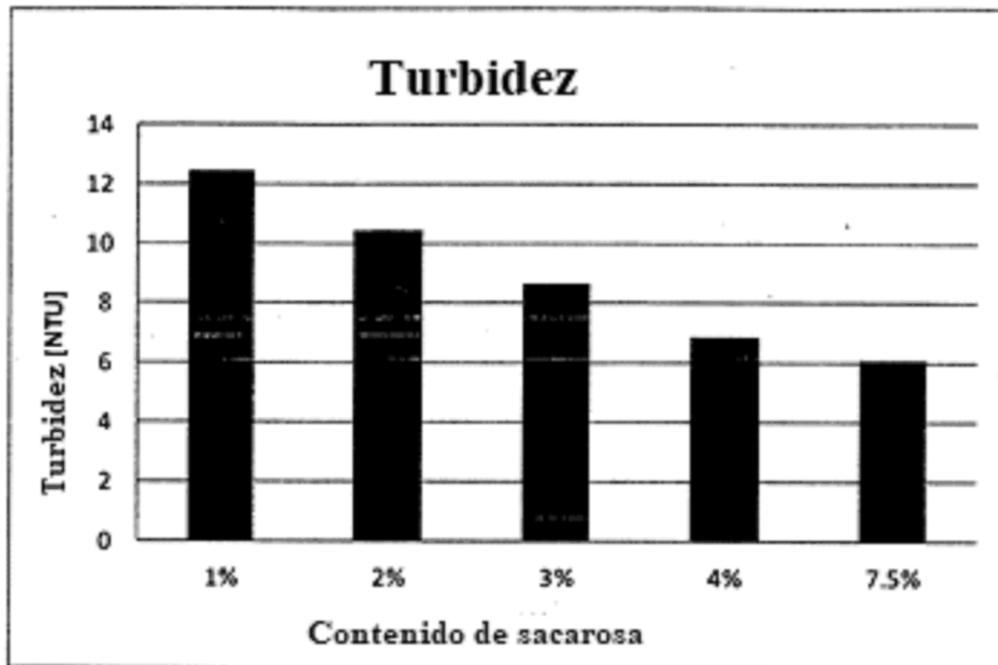


Figura 5E

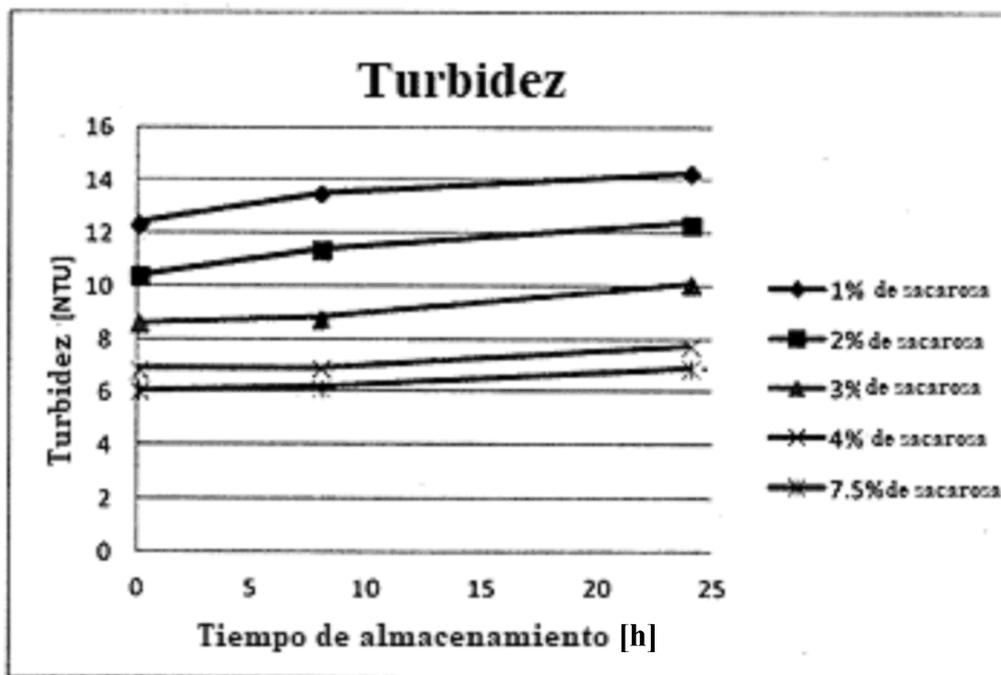


Figura 5F

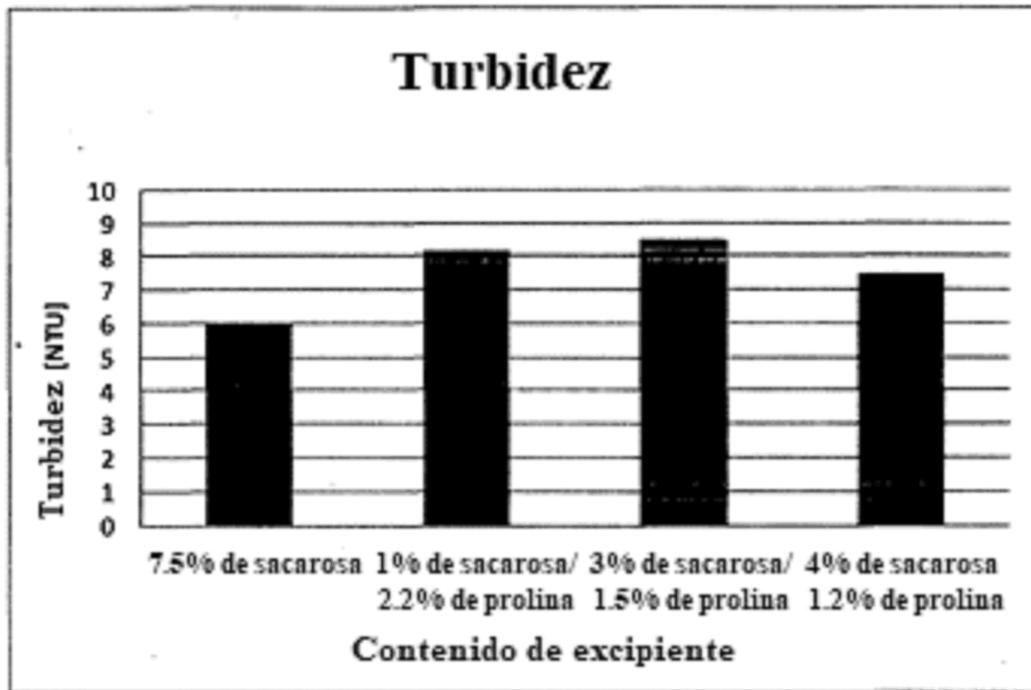


Figura 5G

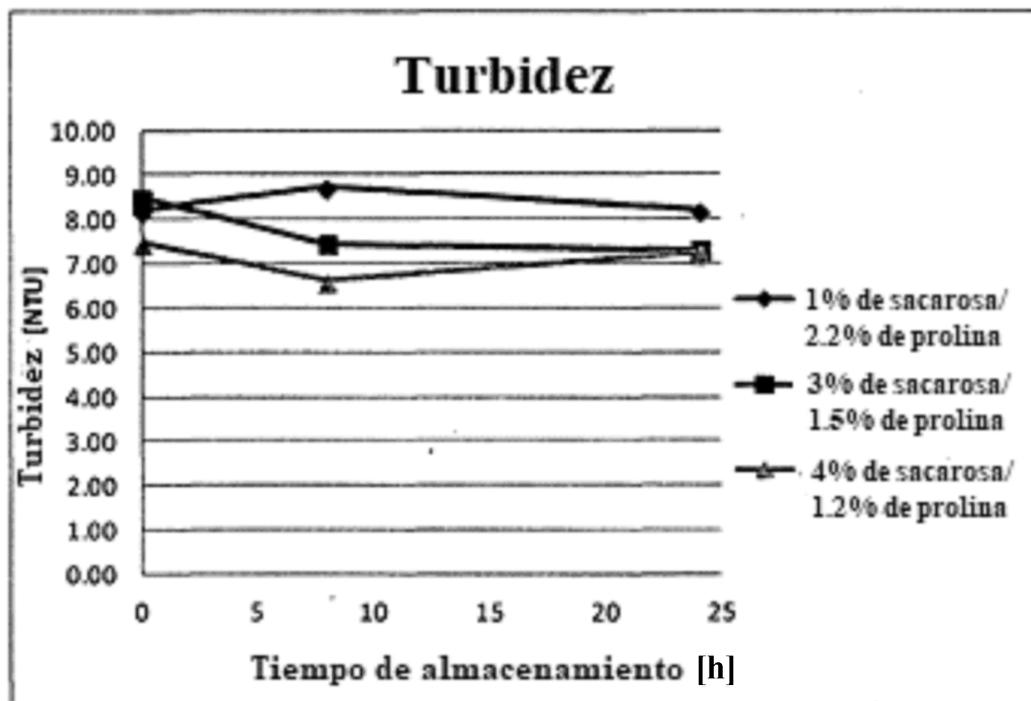


Figura 5H

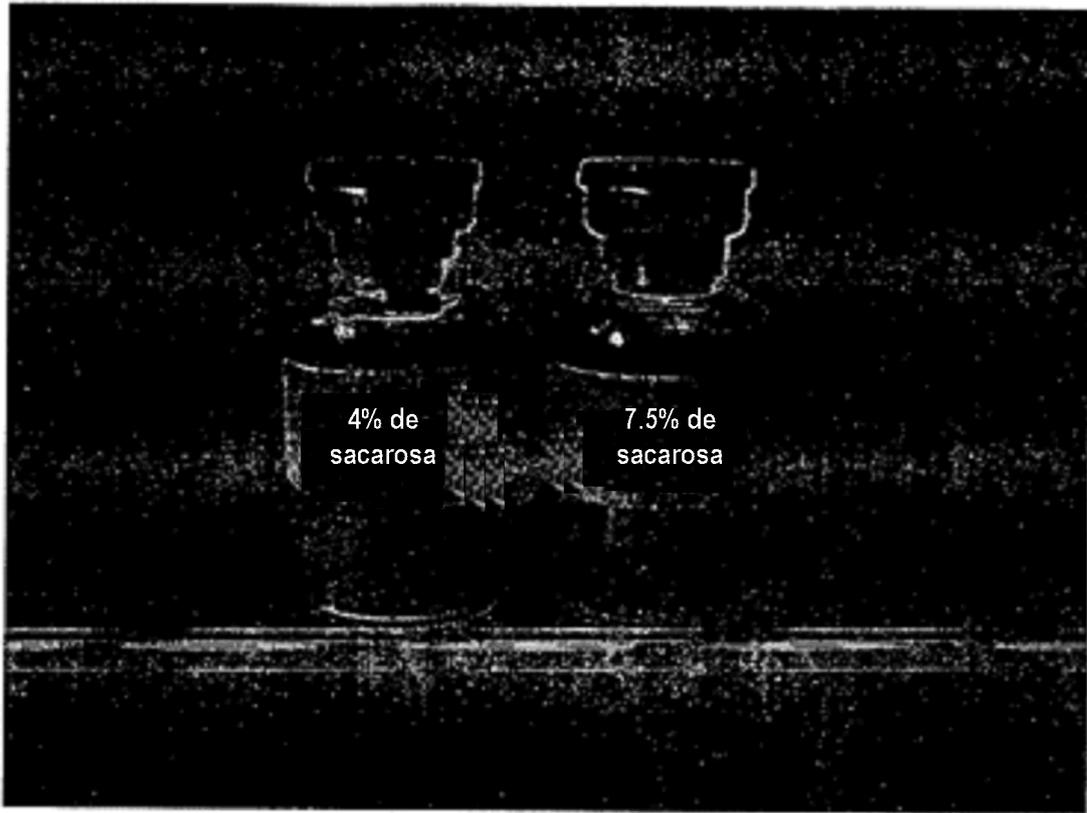


Figura 6



Figura 7