

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.03.23	(73) Titular(es): CERENIS THERAPEUTICS HOLDING SA 265 RUE DE LA DÉCOUVERTEBÂT. A 31670 LABEGE FR
(30) Prioridade(s): 2005.03.24 US 665180 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.01.02	(72) Inventor(es): JEAN-LOUIS H. DASSEUX FR
(45) Data e BPI da concessão: 2012.02.29 106/2012	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPLEXOS DE LIPOPROTEÍNA COM CARGA E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

A PRESENTE DIVULGAÇÃO PROPORCIONA COMPLEXOS DE LIPOPROTEÍNA COM CARGA QUE INCLUEM, COMO UM COMPONENTE, UM FOSFOLÍPIDO CARREGADO NEGATIVAMENTE QUE SE ESPERA QUE CONFIRA AOS COMPLEXOS PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS MELHORADAS.

RESUMO

"Complexos de lipoproteína com carga e suas utilizações"

A presente divulgação proporciona complexos de lipoproteína com carga que incluem, como um componente, um fosfolípido carregado negativamente que se espera que confira aos complexos propriedades terapêuticas melhoradas.

DESCRIÇÃO

"Complexos de lipoproteína com carga e suas utilizações"

2. CAMPO TÉCNICO

A presente divulgação proporciona complexos de lipoproteína com carga, composições farmacêuticas compreendendo os complexos e métodos de utilização dos complexos para tratar ou prevenir uma variedade de condições e desordens, incluindo dislipidemia e/ou doenças, desordens e/ou condições a ela associadas.

3. ESTADO DA TÉCNICA

O colesterol em circulação é transportado por partículas de complexos de lipoproteínas plasmáticas de composição lipídica e proteínica que transportam lípidos no sangue. Quatro classes principais de partículas de lipoproteínas circulam no plasma e estão envolvidas no sistema de transporte de gorduras: quilomícrones, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Os quilomícrones constituem um produto de curta vida da absorção intestinal de gordura. A VLDL e particularmente, a LDL, são responsáveis pela entrega de colesterol proveniente do fígado (onde é sintetizado ou obtido de fontes da dieta) a tecidos extra-hepáticos, incluindo as paredes arteriais. A HDL, pelo contrário, medeia o transporte inverso do colesterol (RCT), a remoção de lípidos de colesterol, em particular dos tecidos extra-hepáticos para o fígado, onde é armazenado, catabolizado, eliminado ou reciclado. A HDL também desempenha um papel na inflamação, transportando lípidos oxidados e interleucina.

As partículas de lipoproteína possuem um núcleo hidrófobo constituído por colesterol (normalmente na forma de um éster de colesterilo) e triglicéridos. O núcleo é rodeado por um revestimento superficial compreendendo fosfolípidos, colesterol não esterificado e apolipoproteínas. As apolipoproteínas medeiam o transporte dos lípidos, e algumas podem interagir com enzimas envolvidas no metabolismo dos lípidos. Pelo menos dez apolipoproteínas foram identificadas,

incluindo: ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V, ApoB, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoE, ApoJ e ApoH. Outras proteínas como a LCAT (lecitina:colesterol-aciltransferase), a CETP (proteína de transferência de éster de colesterol), a PLTP (proteína de transferência de fosfolípidos) e a PON (paraoxonase) encontram-se também associadas a lipoproteínas.

Doenças cardiovasculares como doença cardíaca coronária, doença das artérias coronárias e aterosclerose, estão esmagadoramente ligadas a níveis elevados de colesterol no soro. Por exemplo, a aterosclerose é uma doença lentamente progressiva caracterizada pela acumulação de colesterol no interior da parede arterial. Evidências convincentes suportam a teoria de que os lípidos depositados em lesões ateroscleróticas são derivados principalmente das LDL plasmáticas; assim, as LDL tornaram-se popularmente conhecidas como o colesterol "mau". Pelo contrário, os níveis séricos de HDL correlacionam-se inversamente com a doença cardíaca coronária. De facto, níveis séricos elevados de HDL são considerados como um factor de risco negativo. Existe a hipótese de que níveis elevados de HDL no plasma são, não apenas protectores contra a doença das artérias coronárias, como podem até induzir a regressão da placa aterosclerótica (veja-se, e.g., Badimon et al., 1992, *Circulation* 86 (Suppl. III):86-94; Dansky e Fisher, 1999, *Circulation* 100:1762-63; Tangirala et al., 1999, *Circulation* 100(17):1816-22; Fan et al., 1999, *Atherosclerosis* 147(1):139-45; Deckert et al., 1999, *Circulation* 100(11):1230-35; 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):1882-88; 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 (também traduzido 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):1424-29; Kopfler et al., 1994, *Circulation*; 90(3):1319-27; 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). Em consequência, as HDL tornaram-se popularmente conhecidas como o colesterol "bom", (veja-se, e.g., Zhang, et al., 2003 *Circulation* 108:661-663).

O papel "protector" da HDL foi confirmado em vários estudos (e.g., Miller et al., 1977, *Lancet* 1(8019):965-68; Whayne et al., 1981, *Atherosclerosis* 39:411-19). Nesses estudos, os níveis elevados de LDL parecem estar associados a um risco cardiovascular acrescido, enquanto níveis elevados de HDL parecem conferir protecção cardiovascular. Estudos *in vivo* demonstraram adicionalmente o papel protector da HDL, mostrando que infusões de HDL em coelhos podem impedir o desenvolvimento de lesões arteriais induzidas pelo colesterol (Badimon et al., 1989, *Lab. Invest.* 60:455-61) e/ou induzir a sua regressão (Badimon et al., 1990, *J. Clin. Invest.* 85:1234-41).

3.1 Transporte inverso de colesterol, HDL e Apolipoproteína A-I

A via do transporte inverso de colesterol (RCT) funciona para eliminar colesterol da maioria dos tecidos extra-hepáticos e é crucial para a manutenção da estrutura e da função da maioria das células no corpo. O RCT consiste principalmente em três etapas: (a) efluxo de colesterol, *i.e.*, a remoção inicial de colesterol de vários conjuntos de células periféricas; (b) esterificação do colesterol pela acção de lecitina:colesterol-aciltransferase (LCAT), prevenindo uma reentrada do colesterol efluxado nas células; e (c) assimilação do colesterol HDL e ésteres de colesterilo pelas células do fígado para hidrólise, posterior reciclagem, armazenagem, excreção na biliar ou catabolismo em ácidos biliares

A LCAT, a enzima chave no RCT, é produzida pelo fígado e circula no plasma associada à fracção de HDL. A LCAT converte o colesterol derivado das células em ésteres de colesterilo, que são sequestrados em HDL destinada à remoção (veja-se Jonas

2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1529(1-3):245-56). A proteína de transferência de éster de colesterilo (CETP) e a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) contribuem para a remodelação adicional da população circulante de HDL. A CETP move os ésteres de colesterilo produzidos pela LCAT para outras lipoproteínas, particularmente lipoproteínas compreendendo ApoB, tais como VLDL e LDL. A PLTP fornece lecitina à HDL. Os triglicéridos da HDL são catabolizados pela triglicérido-lipase extracelular hepática, e o colesterol da lipoproteína é removido pelo fígado através de vários mecanismos.

As características funcionais das partículas de HDL são principalmente determinadas pelos seus componentes principais de apolipoproteína tais como ApoA-I e ApoA-II. Menores quantidades de ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoA-IV, ApoE, ApoJ foram também observadas associadas a HDL. A HDL existe numa ampla variedade de diferentes dimensões e diferentes misturas dos constituintes supramencionados, dependendo do estado de remodelação durante a via ou cascata metabólica do RCT.

Cada partícula de HDL compreende usualmente pelo menos 1 molécula, e usualmente duas a 4 moléculas, de ApoA-I. As partículas de HDL podem também compreender apenas ApoE (partículas de gama-LpE), que se sabe serem também responsáveis pelo efluxo de colesterol, como descrito pelo Prof. Gerd Assmann (veja-se, e.g., von Eckardstein et al., 1994, *Curr Opin Lipidol.* 5(6):404-16). A ApoA-I é sintetizada pelo fígado e intestino delgado na forma pré-pró-apolipoproteína A-I, que é segregada na forma de pró-apolipoproteína A-I (proApoA-I) e rapidamente clivada para gerar a forma plasmática de ApoA-I, uma única cadeia polipeptídica de 243 aminoácidos (Brewer et al., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:623-30). A preproApoA-I que é injectada experimentalmente directamente na corrente sanguínea é também clivada na forma plasmática da ApoA-I (Klon et al., 2000, *Biophys. J.* 79(3):1679-85; Segrest et al., 2000, *Curr. Opin. Lipidol.* 11(2):105-15; Segrest et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274 (45):31755-58).

A ApoA-I compreende 6 a 8 diferentes hélices alfa de 22 aminoácido ou repetições funcionais espaçadas por uma porção ligante que é frequentemente prolina. As unidades de repetição existem em conformação helicoidal anfipática (Segrest *et al.*, 1974, *FEBS Lett.* 38: 247-53) e conferem as principais actividades biológicas da ApoA-I, *i.e.*, ligação a lípidos e activação de lecitina:colesterol-aciltransferase (LCAT).

A ApoA-I forma três tipos de complexos estáveis com lípidos: complexos pequenos, com baixo teor lipídico, referidos como pré-beta-1 HDL; partículas achatadas discóides compreendendo lípidos polares (fosfolípido e colesterol) referidos como pré-beta-2 HDL; e partículas esféricas, compreendendo tanto lípidos polares como não polares, referidos como HDL esférica ou madura (HDL₃ e HDL₂). A maioria da HDL na população circulante compreende tanto ApoA-I como ApoA-II (a fracção "AI/AII-HDL"). Contudo, a fracção de HDL compreendendo apenas ApoA-I (a "fracção AI-HDL") parece ser mais eficaz no RCT. Certos estudos epidemiológicos suportam a hipótese de que a fracção Apo-AI-HDL é anti-aterogénica. (Parra *et al.*, 1992, *Arterioscler. Thromb.* 12:701-07; Decossin *et al.*, 1997, *Eur. J. Clin. Invest.* 27:299-307).

As HDL são constituídas por várias populações de partículas que possuem diferentes dimensões, composição lipídica e composição apolipoproteínica. Podem ser separadas de acordo com as suas propriedades, incluindo a sua densidade hidratada, composição apolipoproteínica e características de carga. Por exemplo, as pré-beta-HDL são caracterizadas por uma carga na superfície menor do que a das alfa-HDL maduras. Devido a esta diferença de cargas, as pré-beta-HDL e as alfa-HDL maduras possuem diferentes mobilidades electroforéticas em gel de agarose (David *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269(12):8959-8965).

O metabolismo das pré-beta-HDL e das alfa-HDL maduras também difere. As pré-beta-HDL possuem dois destinos metabólicos: ou remoção do plasma e catabolismo pelo rim ou remodelação em HDL de dimensão média que são preferencialmente degradadas pelo fígado (Lee *et al.*, 2004, *J. Lipid Res.* 45(4):716-728).

Embora o mecanismo para a transferência de colesterol a partir da superfície celular (*i.e.*, efluxo de colesterol) seja desconhecido, crê-se que o complexo de baixo teor lipídico, pré-beta-1 HDL, é o aceitador preferido para o colesterol transferido do tecido periférico envolvido no RCT (veja-se 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.* 33:1091-97; e Kawano *et al.*, 1993, *Biochemistry* 32:5025-28; Kawano *et al.*, 1997, *Biochemistry* 36:9816-25). Durante este processo de recrutamento de colesterol a partir da superfície celular, a pré-beta-1 HDL é rapidamente convertida em pré-beta-2 HDL. A PLTP pode aumentar a taxa de formação de discos de pré-beta-2 HDL, mas os dados indicam a ausência de um papel da PLTP no RCT. A LCAT reage preferencialmente com HDL discóide, pequena (pré-beta) e esférica (*i.e.*, madura), transferindo o grupo 2-acilo da lecitina ou de outros fosfolípidos para o resíduo hidroxilo livre do colesterol para gerar ésteres de colesterilo (retidos pela HDL) e lisolecitina. A reacção da LCAT requer ApoA-I como activador; *i.e.*, ApoA-I é o cofactor natural para a LCAT. A conversão de colesterol sequestrado na HDL, no seu éster, previne a reentrada de colesterol na célula, tendo como resultado final a remoção do colesterol da célula.

Os ésteres de colesterilo nas partículas de HDL maduras na fracção de ApoAI-HDL (*i.e.*, compreendendo ApoA-I e não ApoA-II) são removidos pelo fígado e processados em bÍlis mais eficazmente do que os derivados de HDL compreendendo tanto ApoA-I como ApoA-II (a fracção AI/AII-HDL). Isto pode dever-se, em parte, à mais eficaz ligação de ApoAI-HDL à membrana do hepatócito. Foi colocada a hipótese da existência de um receptor de HDL, e foi identificado um receptor sequestrante, de classe B, tipo I (SR--BI) como receptor de HDL (Acton *et al.*, 1996, *Science* 271:518-20; Xu *et al.*, 1997, *Lipid Res.* 38:1289-98). O SR-BI é expresso mais abundantemente em tecidos esteroideogénicos (*e.g.*, as supra-renais), e no fígado (Landschulz *et al.*, 1996, *J. Clin. Invest* 98:984-95; Rigotti *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271:33545-49). Para uma revisão dos receptores de HDL, veja-se Broutin *et al.*, 1988, *Anal. Biol. Chem.* 46:16-23.

A lipidação inicial pelo transportador de cassete de ligação ao ATP AI parece ser crítica para a formação de HDL plasmática e para a habilidade das partículas de pré-beta-HDL para o efluxo de colesterol (Lee e Parks, 2005, *Curr. Opin. Lipidol.* 16(1):19-25). De acordo com aqueles autores, esta lipidação inicial permite que a pré-beta-HDL funcione mais eficazmente como aceitador de colesterol e impede que a ApoA-I se associe rapidamente a partículas de HDL plasmáticas preexistentes, resultando numa maior disponibilidade de partículas de pré-beta-HDL para o efluxo de colesterol.

A CETP pode também desempenhar um papel no RCT. Alterações na actividade da CETP ou dos seus aceitadores, VLDL e LDL, têm um papel na "remodelação" da população de HDL. Por exemplo, na ausência de CETP, as HDL tornam-se partículas alargadas que não são depuradas. (Para revisões do RCT e das HDL, veja-se Fielding e 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):1053-59).

A HDL também desempenha um papel no transporte inverso de outros lípidos e moléculas apolares, e na destoxificação, *i.e.*, o transporte de lípidos a partir das células, órgãos e tecidos, para o fígado para catabolismo e excreção. Estes lípidos incluem esfingomiéline (SM), lípidos oxidados e lisofosfatidilcolina. Por exemplo, Robins e Fasulo (1997, *J. Clin. Invest.* 99:380-84) mostraram que as HDL estimulam o transporte de esterol vegetal pelo fígado para secreções biliares.

O principal componente da HDL, ApoA-I, pode associar-se a SM *in vitro*. Quando a ApoA-I é reconstituída *in vitro* com SM de cérebro bovino (BBSM), a taxa máxima de reconstituição ocorre a 28°C, a temperatura aproximada da temperatura de transição de fases para a BBSM (Swaney, 1983, *J. Biol. Chem.* 258(2), 1254-59). Com razões BBSM:ApoA-I de 7,5:1 ou inferiores (p/p), forma-se uma única partícula de HDL homogénea reconstituída que compreende três moléculas de ApoA-I por partícula e que possui uma razão molar BBSM:ApoA-I de 360:1. Surge no microscópio electrónico como um complexo discóide similar ao obtido por recombinação de ApoA-I com

fosfatidilcolina com razões fosfolípido/proteína elevadas. Com razões BBSM:ApoA-I de 15:1 (p/p), contudo, formam-se complexos discóides de maior diâmetro que possuem uma maior razão molar fosfolípido:proteína (535:1). Estes complexos são significativamente maiores, mais estáveis e mais resistentes à desnaturação do que complexos de ApoA-I formados com fosfatidilcolina.

A esfingomiélin (SM) está elevada em aceitadores precoces de colesterol (pré-beta-HDL e gama-lipoproteína compreendendo ApoE em migração), sugerindo que a SM pode melhorar a capacidade destas partículas para promover o efluxo de colesterol (Dass e Jessup, 2000, *J. Pharm. Pharmacol.* 52:731-61; Huang et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1834-38; Fielding e Fielding 1995, *J. Lipid Res.* 36:211-28).

3.2 Mecanismo Protector da HDL e da ApoA-I

Estudos recentes do(s) mecanismo(s) protector(es) da HDL focaram-se na apolipoproteína A-I (ApoA-I), o principal componente da HDL. Níveis plasmáticos elevados de ApoA-I estão associados à ausência ou redução de lesões coronárias (Maciejko et al., 1983, *N. Engl. J. Med.* 309:385-89; Sedlis et al., 1986, *Circulation* 73:978-84).

A infusão de ApoA-I ou de HDL em animais experimentais exerce significativas alterações bioquímicas, assim como reduz a extensão e gravidade de lesões ateroscleróticas. Após um relatório inicial de Maciejko e Mao (1982, *Arteriosclerosis* 2:407a), Badimon et al., (1989, *Lab. Invest.* 60:455-61; 1989, *J. Clin. Invest.* 85:1234-41) verificaram que podiam reduzir significativamente a extensão de lesões ateroscleróticas (redução de 45%) e o seu teor de éster de colesterol (redução de 58,5%) em coelhos alimentados com colesterol, por infusão de HDL, (d=1,063-1,325 g/ml). Verificaram também que as infusões de HDL conduzem a uma regressão próxima dos 50% de lesões estabelecidas. Esper et al. (1987, *Arteriosclerosis* 7:523a) mostraram que infusões de HDL podem alterar marcadamente a composição de lipoproteínas do plasma de coelhos Watanabe com hipercolesterolemia hereditária, que desenvolvem precocemente lesões arteriais. Nestes coelhos, as

infusões de HDL conseguem mais que duplicar a razão entre a HDL protectora e a LDL aterogénica.

O potencial da HDL para prevenir a doença arterial em modelos animais foi adicionalmente enfatizada pela observação de que a ApoA-I pode exercer uma actividade fibrinolítica *in vitro* (Saku *et al.*, 1985, *Thromb. Res.* 39:1-8). Ronneberger (1987, *Xth Int. Congr. Pharmacol.*, Sydney, 990) demonstrou que a ApoA-I pode aumentar a fibrinólise em cães *beagle* e em macacos *Cynomologous*. Uma actividade similar pode ser notada *in vitro* em plasma humano. Ronneberger foi capaz de confirmar uma redução da deposição de lípidos e da formação de placa arterial em animais tratados com ApoA-I.

Estudos *in vitro* indicam que complexos de ApoA-I e lecitina podem promover o efluxo de colesterol livre a partir de células de músculo liso arterial em cultura (Stein *et al.*, 1975, *Biochem. Biophys. Acta*, 380:106-18). Através deste mecanismo, a HDL também pode reduzir a proliferação destas células (Yoshida *et al.*, 1984, *Exp. Mol Pathol.* 41:258-66).

A terapia de infusão com HDL compreendendo ApoA-I ou péptidos miméticos de ApoA-I mostrou também regular os níveis plasmáticos de HDL pelo transportador ABC1, conduzindo a eficácia no tratamento da doença cardiovascular (veja-se, e.g., Brewer *et al.*, 2004, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1755-1760).

Foram isoladas duas mutações humanas de ocorrência natural da ApoA-I em que um resíduo de arginina é mutado para cisteína. Na apolipoproteína A-I_{Milano} (ApoA-I_M), esta substituição ocorre no resíduo 173, enquanto na apolipoproteína A-I_{Paris} (ApoA-I_P), esta substituição ocorre no resíduo 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, *Atherosclerosis* 128:121-28; Daum *et al.*, 1999, *J. Mol. Med.* 77:614-22; Klon *et al.*, 2000, *Biophys. J.* 79(3):1679-85). Partículas de HDL reconstituídas compreendendo homodímeros ligados por dissulfureto de ApoA-I_M ou ApoA-I_P são similares às partículas de HDL reconstituídas compreendendo ApoA-I de tipo selvagem na sua capacidade para depurar emulsões de dimiristoílfosfatidilcolina (DMPC) e na

sua capacidade para promover o efluxo de colesterol (Calabresi et al., 1997b, *Biochemistry* 36:12428-33; Franceschini et al., 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:1257-62; Daum et al., 1999, *J. Mol. Med.* 77:614-22). Em ambas as mutações, indivíduos heterozigotas possuem níveis diminuídos de HDL mas paradoxalmente, têm um risco reduzido de aterosclerose (Franceschini et al., 1980, *J. Clin. Invest.* 66:892-900; Weisgraber et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258:2508-13; Bruckert et al., 1997, *Atherosclerosis* 128:121-28). As partículas de HDL reconstituídas compreendendo cada uma das variantes são capazes de activação de LCAT, embora com eficiência diminuída quando comparadas com partículas de HDL reconstituídas compreendendo ApoA-I de tipo selvagem (Calabresi et al., 1997a, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232:345-49; Daum et al., 1999, *J. Mol. Med.* 77:614-22).

A mutação ApoA-I_M é transmitida na forma de um traço autossómico dominante; foram identificadas oito gerações de portadores numa família (Gualandri et al., 1984, *Am. J. Hum. Genet.* 37:1083-97). O estado de um indivíduo portador de ApoA-I_M é caracterizado por uma notável redução no nível de colesterol HDL. Apesar disto, indivíduos portadores aparentemente não apresentam qualquer risco acrescido de doença arterial. De facto, por exame dos registos genealógicos, parece que estes indivíduos podem estar "protegidos" da aterosclerose (Sirtori et al., 2001, *Circulation*, 103: 1949-1954; Roma et al., 1993, *J. Clin. Invest.* 91(4):1445-520).

O mecanismo do possível efeito protector da ApoA-I_M em portadores da mutação parece estar ligado a uma modificação na estrutura da ApoA-I_M mutante, com perda de uma hélice alfa e uma exposição aumentada de resíduos hidrófobos (Franceschini et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260:1632-35). A perda da estrutura firme das múltiplas hélices alfa conduz a uma flexibilidade aumentada da molécula, que se associa mais facilmente a lípidos, comparativamente com a ApoA-I normal. Adicionalmente, os complexos apolipoproteína-lípido são mais susceptíveis a desnaturação, sugerindo assim que a entrega de lípidos é também melhorada no caso do mutante.

Bielicki, et al. (1997, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (9):1637-43) demonstraram que a ApoA-I_M possui uma capacidade limitada para recrutar colesterol membranar comparativamente com a ApoA-I de tipo selvagem. Em adição, a HDL nascente formada pela associação de ApoA-I_M com lípidos da membrana era predominantemente de partículas de 7,4 nm e não de complexos maiores de 9 e 11 nm formados pela ApoA-I de tipo selvagem. Estas observações indicam que a substituição Arg₁₇₃→Cys₁₇₃ na sequência primária da ApoA-I interferiu com o processo normal de recrutamento de colesterol celular e montagem da HDL nascente. A mutação está aparentemente associada a uma eficiência diminuída para remoção de colesterol a partir das células. As suas propriedades antiaterogénicas podem portanto não estar relacionadas com o RCT.

A alteração estrutural mais surpreendente atribuída à substituição Arg₁₇₃→Cys₁₇₃ é a dimerização de ApoA-I_M (Bielicki et al., 1997, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (9):1637-43). A ApoA-I_M pode formar homodímeros consigo própria e heterodímeros com ApoA-II. Estudos de fracções sanguíneas compreendendo uma mistura de apolipoproteínas indicam que a presença de dímeros e complexos na circulação pode ser responsável por uma semivida de eliminação acrescida das apolipoproteínas. Uma tal semivida de eliminação acrescida foi observada em estudos clínicos de portadores da mutação (Gregg et al., 1988, *NATO ARW on Human Apolipoprotein Mutants: From Gene Structure to Phenotypic Expression*, Limone S G). Outros estudos indicam que os dímeros de ApoA-I_M (ApoA-I_M / ApoA-I_M) actuam como um factor de inibição na interconversão de partículas de HDL *in vitro* (Franceschini et al., 1990, *J. Biol. Chem.* 265:12224-31).

3.3 Tratamentos Actuais para Dislipidemia e Desordens Relacionadas

As desordens dislipidémicas são doenças associadas a níveis séricos elevados de colesterol e triglicéridos e razões séricas HDL:LDL diminuídas, e incluem hiperlipidemia, especialmente hipercolesterolemia, doença cardíaca coronária, doença das artérias coronárias, doenças vasculares e perivasculares e doenças cardiovasculares tais como aterosclerose. As síndromes associadas à aterosclerose tais

como claudicação intermitente, causadas por insuficiência arterial, estão também incluídas. Vários tratamentos estão actualmente disponíveis para diminuir o colesterol e os triglicéridos elevados no soro associados a desordens dislipidémicas. Contudo, cada um deles tem os seus próprios inconvenientes e limitações em termos de eficácia, efeitos secundários e qualificação da população de pacientes.

As resinas de ligação a ácidos biliares são uma classe de fármacos que interrompem a reciclagem de ácidos biliares do intestino para o fígado; e.g., colestiramina (Questran Light®, Bristol-Myers Squibb), e cloridrato de colestipol (Colestid®, The Upjohn Company). Quando tomadas oralmente, estas resinas carregadas positivamente ligam-se aos ácidos biliares carregados negativamente no intestino. Porque as resinas não podem ser absorvidas a partir do intestino, são excretadas transportando os ácidos biliares com elas. A utilização destas resinas, na melhor das hipóteses, contudo, apenas diminui os níveis séricos de colesterol em cerca de 20%, e está associada a efeitos secundários gastrointestinais, incluindo obstipação e determinadas deficiências vitamínicas. Além disso, como as resinas se ligam a outros fármacos, outras medicações orais têm que ser tomadas pelo menos uma hora antes ou quatro a seis horas depois da ingestão da resina; deste modo, complicando os regimes farmacológicos dos pacientes cardíacos.

As estatinas são agentes de diminuição do colesterol que bloqueiam a síntese de colesterol através da inibição da HMGCoA-redutase, a enzima chave envolvida na via biossintética do colesterol. As estatinas, e.g., lovastatina (Mevacor®), sinvastatina (Zocor®), pravastatina (Pravachol®), fluvastatina (Lescol®) e atorvastatina (Lipitor®), são por vezes utilizadas em combinação com resinas de ligação a ácidos biliares. As estatinas reduzem significativamente os níveis séricos de colesterol e de LDL, e retardam a progressão da aterosclerose coronária. Contudo, os níveis séricos de colesterol HDL são apenas moderadamente aumentados. O mecanismo do efeito de diminuição da LDL pode envolver tanto a redução da concentração de VLDL como a indução de expressão celular de receptor de LDL, levando a uma produção reduzida e/ou um catabolismo acrescido das LDL. Efeitos secundários, incluindo disfunção hepática e renal, estão associados à utilização

destes fármacos (The Physicians Desk Reference, 56th Ed., 2002) Medical Economics).

A niacina (ácido nicotínico) é um complexo de vitamina B solúvel em água utilizado como suplemento dietético e agente anti-hiperlipidémico. A niacina diminui a produção de VLDL e é eficaz a diminuir a LDL. Em alguns casos, é utilizada em combinação com resinas de ligação a ácidos biliares. A niacina pode aumentar a HDL quando utilizada em doses adequadas, contudo, a sua utilidade está limitada por graves efeitos secundários quando utilizada nestas doses elevadas. O Niaspan® é uma forma de niacina de libertação prolongada que produz menos efeitos secundários do que a niacina pura. A Niacina/Lovastatina (Nicostatin®) é uma formulação contendo tanto niacina como lovastatina e combina os benefícios de cada um dos fármacos.

Os fibratos são uma classe de fármacos de diminuição dos lípidos utilizados para tratar várias formas de hiperlipidemia (*i.e.*, triglicéridos séricos elevados) que podem também estar associadas a hipercolesterolemia. Os fibratos parecem reduzir a fracção de VLDL e aumentar modestamente a HDL; contudo, o efeito destes fármacos sobre o colesterol sérico é variável. Nos Estados Unidos, fibratos tais como clofibrato (Atromid-S®), fenofibrato (Tricor®) e bezafibrato (Bezalip®) foram aprovados para utilização como fármacos antilipidémicos, mas não receberam aprovação como agentes hipercolesterolemia. Por exemplo, o clofibrato é um agente antilipidémico que actua (por via de um mecanismo desconhecido) para diminuir os triglicéridos séricos através da redução da fracção de VLDL. Embora o colesterol sérico possa ser reduzido em determinadas subpopulações de pacientes, a resposta bioquímica ao fármaco é variável, e nem sempre é possível prever que pacientes obterão resultados favoráveis. O Atromid-S® não se mostrou eficaz para a prevenção de doença cardíaca coronária. O fármaco química e farmacologicamente relacionado, genfibrozil (Lopid®), é um agente regulador dos lípidos que diminuí moderadamente os triglicéridos séricos e o colesterol VLDL, e aumenta moderadamente o colesterol HDL - as subfracções HDL₂ e HDL₃ assim como ambos de ApoA-I e A-II (*i.e.*, a fracção AI/AMT-HDL). Contudo, a resposta dos lípidos é heterogénea, especialmente entre diferentes populações de pacientes. Além

disso, embora a prevenção de doença cardíaca coronária fosse observada em pacientes do sexo masculino entre 40-55 sem historial ou sintomas de existência de doença cardíaca coronária, não é claro em que extensão estas verificações podem ser extrapoladas para outras populações de pacientes (e.g., mulheres, homens mais idosos e mais jovens). De facto, não foi observada qualquer eficácia em pacientes com doença cardíaca coronária estabelecida. Graves efeitos secundários estão associados à utilização de fibratos incluindo toxicidade tal como malignidade, (especialmente cancro gastrointestinal), doença da vesícula biliar e uma incidência aumentada de mortalidade não coronária.

A terapia oral de substituição de estrogénio pode ser considerada para a hipercolesterolemia moderada em mulheres pós-menopausa. Contudo, os aumentos na HDL podem ser acompanhados por um aumento nos triglicéridos. O tratamento com estrogénio é, evidentemente, limitado a uma população específica de pacientes (mulheres pós-menopausa) e está associada a graves efeitos secundários incluindo indução de neoplasmas malignos, doença da vesícula biliar, doença tromboembólica, adenoma hepático, pressão sanguínea elevada, intolerância de glucose e hipercalcemia.

Outros agentes úteis para o tratamento de hiperlipidemia incluem ezetimiba (Zetia®; Merck), que bloqueia ou inibe a absorção de colesterol. Contudo, os inibidores de ezetimiba mostraram exhibir algumas toxicidades.

Existe portanto a necessidade de fármacos mais seguros que sejam mais eficazes na diminuição do colesterol sérico, aumento dos níveis séricos de HDL, prevenção e/ou tratamento de dislipidemia e/ou doenças, condições e/ou desordens associadas à dislipidemia.

Por exemplo, a HDL, assim como formas recombinantes de ApoA-I complexadas com fosfolípidos, podem servir como sorvedouros/sequestrantes de moléculas apolares ou anfipáticas, e.g., colesterol e derivados (oxiesteróis, esteróis oxidados, esteróis vegetais, etc.), ésteres de colesterol, fosfolípidos e derivados (fosfolípidos oxidados), triglicéridos, produtos de oxidação, e lipopolissacáridos

(LPS) (veja-se, e.g., Casas et al., 1995, *J. Surg. Res.* Nov 59(5):544-52). A HDL pode também servir como um sequestrante de TNF-alfa e outras linfóquinas. A HDL pode também servir como um transportador para paraoxonases séricas humanas, e.g., PON-1, -2, -3. A paraoxonase, uma esterase associada a HDL, é importante para a protecção de componentes celulares contra a oxidação. A oxidação de LDL, que ocorre durante o *stress* oxidativo, surge directamente ligada ao desenvolvimento de aterosclerose (Aviram, 2000, *Free Radic. Res.* 33 Suppl:S85-97). A paraoxonase parece desempenhar um papel na susceptibilidade à aterosclerose e à doença cardiovascular (Aviram, 1999, *Mol. Med. Today* 5(9):381-86). A paraoxonase sérica humana (PON-1) está ligada a lipoproteínas de alta densidade (HDL). A sua actividade está inversamente relacionada com a aterosclerose. A PON-1 hidrolisa organofosfatos e pode proteger contra a aterosclerose por inibição da oxidação de HDL e lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Aviram, 1999, *Mol. Med. Today* 5(9):381-86). Estudos experimentais sugerem que esta protecção está associada à capacidade da PON-1 hidrolisar peróxidos lipídicos específicos em lipoproteínas oxidadas. Intervenções que preservem ou melhorem a actividade da PON-1 podem auxiliar a retardar o início da aterosclerose e da doença cardíaca coronária.

A HDL tem adicionalmente um papel como agente antitrombótico e redutor de fibrinogénio, e como agente no choque hemorrágico (Cockerill et al., WO 01/13939, publicado em 1 de Março, 2001). Mostrou-se que a HDL, e a ApoA-I em particular, facilitam uma permuta de lipopolissacáridos produzidos pela sepsia para partículas lipídicas compreendendo ApoA-I, resultando a neutralização funcional do lipopolissacárido (Wright et al., WO9534289, publicado em 21 de Dezembro, 1995; Wright et al., Pat. U.S. 5,928,624 concedida em 27 de Julho, 1999; Wright et al., Pat. U.S. 5,932,536, concedida em 3 de Agosto, 1999).

A utilização terapêutica de ApoA-I, ApoA-I_M, ApoA-I_P e outras variantes, assim como de HDL reconstituída, está contudo presentemente limitada pela grande quantidade de apolipoproteína requerida para administração terapêutica e pelo custo de produção da proteína, considerando o baixo

rendimento global de produção. Foi sugerido por ensaios clínicos anteriores que a gama de doses está entre 1,5-4 g de proteína por infusão para o tratamento de doenças cardiovasculares. O número de infusões necessárias para um tratamento completo é desconhecido. (Veja-se, e.g., 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):1203-14). Assim, existe uma necessidade de desenvolvimento de novos métodos para o tratamento e/ou prevenção de doenças, condições e/ou desordens dislipidémicas.

A citação ou identificação de qualquer referência na Secção 2 ou em qualquer outra secção do presente pedido não deverá ser entendida como uma admissão de que essa referência está disponível como anterioridade da presente invenção

4. SUMÁRIO

A presente divulgação proporciona complexos de lipoproteína com carga, composições compreendendo os complexos e métodos de utilização dos complexos para tratar e/ou prevenir uma variedade de desordens e condições, incluindo dislipidemia e/ou as várias doenças, desordens e/ou condições a ela associadas como definido nas reivindicações. Os complexos são genericamente lipoproteínas que compreendem duas fracções, uma fracção de apolipoproteína e uma fracção lipídica, e que incluem como ingrediente chave uma quantidade especificada de um fosfolípido carregado negativamente (ou uma mistura de dois ou mais fosfolípidos diferentes, tipicamente similarmente carregados). O(s) fosfolípido(s) carregado(s) é(são) carregado(s) negativamente ao pH fisiológico. Em algumas concretizações, o fosfolípido carregado compreende um ou mais entre fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e/ou ácido fosfatídico.

A fracção de apolipoproteína compreende uma apolipoproteína ApoA-I que é capaz de mobilizar colesterol quando incluída no complexo.

A fracção lipídica genericamente compreende um ou mais fosfolípidos neutros que são esfingomielina e o fosfolípido carregado negativamente, e pode opcionalmente incluir lípidos adicionais, tais como, por exemplo, triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol, lisofosfolípidos, e os seus vários análogos e/ou derivados. Em algumas concretizações, os complexos de lipoproteína com carga não incluem estes lípidos opcionais.

Os complexos de lipoproteína com carga em que a fracção lipídica compreende SM, pelo menos um fosfolípido carregado, e opcionalmente outros lípidos, são denominados complexos "ternários", porque compreendem três componentes "principais": uma apolipoproteína, uma esfingomielina e um fosfolípido(s) carregado(s).

A quantidade total de fosfolípidos(s) carregado(s) que estão compreendidos na fracção lipídica dos complexos de lipoproteína com carga compreende cerca de 3,0% em peso de fosfolípido(s) carregado(s) totais.

A quantidade total de fosfolípido(s) neutro(s) que estão compreendidos na fracção lipídica depende da quantidade de fosfolípido(s) carregado(s) e quaisquer lípidos opcionais incluídos. Em concretizações que não incluem lípidos opcionais, a fracção lipídica compreenderá geralmente de cerca de 90 a 99,8% em peso de fosfolípido(s) neutro(s) totais, de acordo com a quantidade indicada de fosfolípido carregado.

Como mencionado acima, o fosfolípido neutro compreende uma SM.

A razão molar de lípido-para-apolipoproteína dos complexos de lipoproteína com carga pode variar. Os complexos de lipoproteína com carga compreendem uma razão molar lípido:apolipoproteína que varia de cerca de 2:1 a cerca de 200:1. Em algumas concretizações, a razão molar lípido:apolipoproteína é de cerca de 50:1.

Os complexos de lipoproteína com carga aqui descritos podem tomar uma variedade de formatos, dimensões e formas, variando desde estruturas micelares, a partículas discóides

pequenas que são semelhantes a partículas de pré-beta-HDL de ocorrência natural, a partículas discóides maiores, que são semelhantes a partículas de alfa-HDL de ocorrência natural, a partículas esféricas grandes que são semelhantes a HDL₂ ou HDL₃ de ocorrência natural. A dimensão e formato desejados dos complexos de lipoproteína com carga aqui descritos pode ser controlada por ajuste dos componentes e das razões em peso (ou molares) dos lípidos que constituem a fracção lipídica, assim como da razão molar lípido:apolipoproteína, como é conhecido na especialidade (veja-se, e.g., Barter et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271:4243-4250).

Os complexos de lipoproteína com carga estão na forma de partículas discóides, formadas quando a fracção lipídica consiste essencialmente em cerca de 90 a 99,8% em peso de fosfolípido(s) neutro(s) totais e de cerca de 0,2 a 10% em peso de fosfolípido(s) carregado(s) negativamente totais. As partículas discóides podem ser grandes (e.g., possuindo um diâmetro oblato de cerca de 10 a 14 nm) ou pequenas (e.g., possuindo um diâmetro oblato de cerca de 5 a 10 nm). A dimensão das partículas discóides pode ser controlada pelo ajuste da razão molar lípido:apolipoproteína, como é conhecido na especialidade (veja-se, e.g., Barter et al., 1996, *supra.*). As dimensões das partículas podem ser determinadas utilizando, por exemplo, cromatografia em coluna de exclusão por tamanhos.

As composições farmacêuticas genericamente compreendem complexos de lipoproteína com carga como aqui descrito, e podem opcionalmente incluir um ou mais transportadores, excipientes e/ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis. As composições farmacêuticas podem ser embaladas em quantidades de dosagem unitária adequadas para administração. Por exemplo, as composições compreendem quantidades de dosagem unitária de complexos de lipoproteína com carga secos (por exemplo liofilizados) embaladas em frascos selados. Estas composições são adequadas para reconstituição com água, solução fisiológica (tal como solução salina) ou tampão, e administração por via de injeção. Estas composições podem opcionalmente incluir um ou mais agentes anti-aglomeração e/ou anti-aglomerantes para facilitar a reconstituição dos complexos com carga, ou um ou mais agentes tamponantes, açúcares ou sais (e.g., cloreto de sódio) desenhados para

ajustar o pH, a osmolalidade e/ou a salinidade da suspensão reconstituída.

Espera-se que os complexos de lipoproteína com carga e composições aqui descritos efectuem e/ou facilitem o efluxo e/ou a eliminação de colesterol, e espera-se portanto que sejam úteis no tratamento e/ou profilaxia de uma variedade de condições e desordens, incluindo, por exemplo, dislipidemia e/ou doenças, condições e/ou desordens associadas a dislipidemia ou ao consumo, acumulação ou eliminação de lípidos (e.g., depósitos de gordura, degradação celular) e/ou moléculas apolares tais como toxinas, xenobióticos, etc. Os exemplos não limitantes destas doenças, desordens e/ou condições associadas que podem ser tratadas ou prevenidas com os complexos de lipoproteína com carga e composições aqui descritos incluem, doença vascular periférica, hipertensão, inflamação, doença de Alzheimer, restenose, aterosclerose e a miríade de manifestações clínicas da aterosclerose, tais como, por exemplo, ictos, ictos isquémicos, ataques isquémicos transientes, enfarte do miocárdio, síndrome coronária aguda, angina de peito, hipertensão renovascular, insuficiência renovascular, claudicação intermitente, isquemia crítica dos membros, dor em repouso e gangrena.

Os métodos geralmente envolvem a administração a um indivíduo de uma quantidade de um complexo de lipoproteína com carga ou um complexo farmacêutico aqui descritos, eficaz para tratar ou prevenir a indicação particular. Os complexos e/ou composições podem ser administrados individualmente (como monoterapia) ou, alternativamente, podem ser administrados simultaneamente com outros agentes terapêuticos úteis para tratar e/ou prevenir a dislipidemia e/ou condições, doenças e/ou desordens suas associadas. Os exemplos não limitantes de agentes terapêuticos com que os complexos de lipoproteína com carga e as composições aqui descritos podem ser simultaneamente administrados incluem resinas de ligação a ácidos biliares, inibidores de HMG CoA-redutase (estatinas), niacina, resinas, inibidores da absorção de colesterol e fibratos.

Embora não pretendendo uma ligação a qualquer teoria de operação, crê-se que os fosfolípidos carregados compreendidos

na fracção lipídica irão conferir aos complexos de lipoproteína com carga e às composições, aqui descritos, propriedades terapêuticas melhoradas relativamente aos complexos de lipoproteína convencionais. Uma das diferenças chave entre as pré-beta-HDL discóides pequenas, que são degradadas no rim, e as HDL discóides e/ou esféricas grandes, que são reconhecidas pelo fígado onde o seu colesterol é armazenado, reciclado, metabolizado (como ácidos biliares) ou eliminado (na bília), é a carga das partículas. As pré-beta-HDL discóides pequenas possuem uma carga negativa na superfície inferior à das HDL discóides e/ou esféricas, grandes, que são carregadas negativamente. Embora não pretendendo uma ligação a qualquer teoria de operação, crê-se que a maior carga negativa é um dos factores que desencadeia o reconhecimento das partículas pelo fígado, e que portanto evita o catabolismo das partículas pelo rim. Devido em parte à presença do(s) fosfolípido(s) carregados(s), crê-se que os complexos de lipoproteína com carga e as composições aqui descritos irão permanecer na circulação mais tempo do que os complexos de lipoproteína convencionais, ou que a carga irá afectar a semivida da lipoproteína de uma maneira dependente da carga. Espera-se que o seu mais longo tempo de circulação (residência) vá facilitar a mobilização do colesterol (dando aos complexos mais tempo para acumular colesterol) e a esterificação (proporcionando mais tempo para a LCAT catalisar a reacção de esterificação). A carga pode também aumentar a taxa de captura e/ou remoção do colesterol, desse modo facilitando a remoção do colesterol em maiores quantidades. Em consequência, espera-se que os complexos de lipoproteína com carga e as composições aqui descritos vão proporcionar um benefício terapêutico sobre as terapias com lipoproteína convencionais, pois será necessário administrar menos complexo e/ou composição, e menos frequentemente.

5. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIG. 1 proporciona um cromatograma de um complexo de lipoproteína sem carga consistindo em proApo-AI (33% em peso) e esfingomielina (67% em peso);

A FIG. 2 proporciona um cromatograma de uma concretização de um complexo de lipoproteína com carga consistindo em

proApo-AI (33% em peso), esfingomielina (65% em peso) e fosfatidilglicerol (2% em peso);

A FIG. 3 proporciona gráficos que ilustram a quantidade total de colesterol livre em HDL medida em função do tempo em coelhos após a administração de um controlo, complexo de lipoproteína sem carga (curvas indicadas por IIA) ou uma concretização de um complexo de lipoproteína com carga como aqui descrito (curvas indicadas por IIB); e

A FIG. 4 proporciona um gráfico que ilustra a média da quantidade de colesterol livre em HDL medida em função do tempo em coelhos a que foi administrado um controlo, complexo de lipoproteína sem carga (grupo IIA; dois animais) ou uma concretização de um complexo de lipoproteína com carga como aqui descrito (grupo IIB; dois animais).

6. DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente divulgação descreve complexos de lipoproteína com carga e composições que são úteis para, entre outras coisas, o tratamento e/ou a profilaxia de dislipidemia e/ou doenças, desordens e/ou condições associadas a dislipidemia. Como discutido na secção "Sumário", os complexos de lipoproteína com carga compreendem duas fracções principais, uma fracção de apolipoproteína e uma fracção lipídica, e incluem como ingrediente chave uma quantidade especificada de um ou mais fosfolípidos carregados.

Os complexos de lipoproteína com carga podem ser isolados de fontes naturais, tal como de soro humano (referidos aqui como "complexos de lipoproteína com carga isolados"), ou podem ser preparados ou reconstituídos a partir dos seus componentes individuais (aqui referidos como "complexos de lipoproteína com carga reconstituídos"). Como será reconhecido pelos peritos, os complexos de lipoproteína com carga reconstituídos podem ser vantajosos em muitas aplicações, pois as identidades e quantidades dos seus vários componentes podem ser selectivamente controladas.

6.1 Apolipoproteínas e Péptidos de Apolipoproteína

A natureza das apolipoproteínas que constituem a fracção de apolipoproteína dos complexos de lipoproteína com carga não

é crítica para o sucesso. Virtualmente qualquer apolipoproteína e/ou seu derivado ou análogo que proporcione benefício terapêutico e/ou profilático como aqui descrito pode ser incluída nos complexos com carga. Além disso, qualquer péptido alfa-helicoidal ou análogo peptídico, ou qualquer outro tipo de molécula que "imite" a actividade de uma apolipoproteína (tal como, por exemplo, ApoA-I) na medida em que possa activar LCAT ou formar partículas discóides quando associada a lípidos, pode constituir os complexos com carga, e está portanto incluída dentro da definição de "apolipoproteína." Os exemplos de apolipoproteínas adequadas incluem, mas não se lhes limitando, formas de pré-pró-apolipoproteína de ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V e ApoE; formas pró- e maduras de ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV e ApoE humanas; e formas polimórficas activas, isoformas, variantes e mutantes assim como formas truncadas, das quais as mais comuns são ApoA-I_M (ApoA-I_M) e ApoA-I_P (ApoA-I_P). Apolipoproteínas mutantes contendo resíduos de cisteína são também conhecidas, e podem também ser utilizadas (veja-se, e.g., U.S. 2003/0181372). As apolipoproteínas podem estar na forma de monómeros ou de dímeros, que podem ser homodímeros ou heterodímeros. Por exemplo, podem ser utilizados homo- e heterodímeros (quando executável) de formas pró- e madura de ApoA-I (Duverger et al., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12):1424-29), ApoA-I_M (Franceschini et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260:1632-35), ApoA-I_P (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 e ApoH. As apolipoproteínas podem incluir resíduos correspondentes a elementos que facilitam o seu isolamento, tais como marcas His, ou outros elementos desenhados para outros fins, desde que a apolipoproteína retenha alguma actividade biológica quando incluída num complexo.

Estas apolipoproteínas podem ser purificadas a partir de fontes animais (e em particular de fontes humanas) ou produzidas recombinantemente como é bem conhecido na especialidade, veja-se, e.g., Chung et al., 1980, *J. Lipid Res.* 21(3):284-91; Cheung et al., 1987, *J. Lipid Res.*

28(8):913-29. Vejam-se também as Patentes U.S. 5,059,528, 5,128,318, 6,617,134 e as Publicações U.S. 2002/0156007, 2004/0067873, 2004/0077541, e 2004/0266660.

Exemplos não limitantes de péptidos e análogos peptídicos que correspondem a apolipoproteínas, assim como agonistas que imitam a actividade de ApoA-I, ApoA-I_M, ApoA-II, ApoA-IV, e ApoE, que são adequados para utilização como apolipoproteínas nos complexos com carga e nas composições aqui descritos estão divulgados nas Pat. U.S. 6,004,925, 6,037,323 e 6,046,166 (concedidas a Dasseux et al.), Pat. U.S. 5,840,688 (concedida a Tso), publicações U.S. 2004/0266671, 2004/0254120, 2003/0171277 e 2003/0045460 (de Fogelinan), e publicação U.S. 2003/0087819 (de Bielicki). Estes péptidos e análogos peptídicos podem ser compostos por L-aminoácidos ou D-aminoácidos ou misturas de L- e D-aminoácidos. Podem também incluir uma ou mais ligações não peptídicas ou amida, tais como um ou mais isósteros de péptido/amida bem conhecidos. Estas apolipoproteínas "péptido e/ou mimético de péptido" podem ser sintetizadas ou fabricadas utilizando qualquer técnica para síntese peptídica conhecida na especialidade, incluindo, e.g., as técnicas descritas nas Pat. U.S. 6,004,925, 6,037,323 e 6,046,166.

Os complexos com carga podem incluir um único tipo de apolipoproteína, ou misturas de duas ou mais apolipoproteínas diferentes, que podem ser derivadas da mesma espécie ou de espécies diferentes. Embora não necessário, os complexos de lipoproteína com carga irão preferivelmente compreender apolipoproteínas que são derivadas de, ou correspondem em sequência de aminoácidos a, as espécies animais que estão a ser tratadas, de modo a evitar a indução de uma resposta imunitária à terapia. A utilização de péptidos miméticos de apolipoproteínas pode também reduzir ou evitar uma resposta imunitária.

6.2 Fosfolípidos

A fracção lipídica dos complexos com carga e composições inclui dois tipos de fosfolípidos: um fosfolípido neutro e um fosfolípido com carga. Como aqui se utiliza, "fosfolípidos neutros" são fosfolípidos que possuem uma carga global de cerca de zero ao pH fisiológico. Em muitos exemplos aqui

descritos, os fosfolípidos neutros são zwitteriões, embora sejam conhecidos, e possam ser utilizados, outros tipos de fosfolípidos globalmente neutros. O fosfolípido neutro compreende uma ou ambas entre lecitina e/ou SM, e pode opcionalmente incluir outros fosfolípidos neutros. Em alguns exemplos, o fosfolípido neutro compreende lecitina, mas não SM. Em outros exemplos, o fosfolípido neutro compreende SM, mas não lecitina. Em ainda outros exemplos, o fosfolípido neutro compreende tanto lecitina como SM. Todos estes exemplos específicos podem incluir fosfolípidos neutros em adição à lecitina e/ou à SM, mas em muitos exemplos não incluem estes fosfolípidos neutros adicionais.

A identidade da SM utilizada não é crítica para o sucesso. Assim, como aqui se utiliza, a expressão "SM" inclui não apenas esfingomielinas derivadas de fontes naturais, mas também análogos e derivados das SM de ocorrência natural que são inacessíveis à hidrólise por LCAT, como é a SM de ocorrência natural. A SM é um fosfolípido muito similar em estrutura à lecitina, mas, contrariamente à lecitina, não possui um esqueleto de glicerol, e portanto não possui ligações éster a ligar as cadeias acilo. Em vez disso, a SM possui um esqueleto de ceramida, com ligações amida a ligar as cadeias acilo. A SM não é um substrato para a LCAT, e geralmente não pode ser por ela hidrolisada. Pode actuar, contudo, como inibidor de LCAT ou pode diminuir a actividade da LCAT por diluição da concentração do fosfolípido substrato. Porque a SM não é hidrolisada, permanece na circulação mais tempo. Espera-se que esta característica vá permitir que complexos de lipoproteína com carga que incluem SM tenham uma maior duração do efeito farmacológico (mobilização de colesterol) e captem mais lípidos, em particular colesterol, do que os complexos de apolipoproteínas que não incluem SM (veja-se, e.g., os complexos de apolipoproteínas descritos na Publicação US 2004/0067873). Este efeito pode resultar na necessidade de doses menos frequentes ou menores para o tratamento do que as necessárias para os complexos de lipoproteína que não incluem SM.

A SM pode ser derivada de virtualmente qualquer fonte. Por exemplo, a SM pode ser obtida de leite, do ovo ou de cérebro. Podem também ser utilizados análogos ou derivados de

SM. Os exemplos não limitantes de análogos e derivados de SM úteis incluem, mas não se lhes limitando, palmitoílesfingomielina, estearoílesfingomielina, D-eritro-N-16:0-esfingomielina e seu isómero di-hidro, D-eritro-N-16:0-di-hidro-esfingomielina.

As esfingomielinas isoladas de fontes naturais podem ser artificialmente enriquecidas numa cadeia acilo particular, saturada ou insaturada. Por exemplo, a esfingomielina do leite (Avanti Phospholipid, Alabaster, Ala.) é caracterizada por longas cadeias acilo saturadas (*i.e.*, cadeias acilo possuindo 20 ou mais átomos de carbono). Em contraste, a esfingomielina do ovo é caracterizada por cadeias acilo saturadas curtas (*i.e.*, cadeias acilo possuindo menos de 20 átomos de carbono). Por exemplo, enquanto apenas cerca de 20% da esfingomielina do leite compreende cadeias acilo C16:0 (16 carbonos, saturada), cerca de 80% da esfingomielina do ovo compreende cadeias acilo C16:0. Utilizando extracção com solventes, a composição da esfingomielina do leite pode ser enriquecida para possuir uma composição de cadeias acilo comparável com a da esfingomielina do ovo, ou *vice-versa*.

A SM pode ser semi-sintética de modo a que possua cadeias acilo particulares. Por exemplo, a esfingomielina do leite pode ser primeiro purificada a partir do leite, depois, uma cadeia acilo particular, *e.g.*, a cadeia acilo C16:0, pode ser clivada e substituída por outra cadeia acilo. A SM pode também ser inteiramente sintetizada, por *e.g.*, síntese em larga escala. Veja-se, *e.g.*, Dong et al, Pat. U.S. 5,220,043, intitulada Synthesis of D-erythro-sphingomyelins, concedida em 15 de Junho, 1993; Weis, 1999, *Chem. Phys. Lipids* 102(1-2):3-12.

Os comprimentos e os níveis de saturação das cadeias acilo que constituem uma SM semi-sintética ou uma SM sintética podem ser selectivamente variados. As cadeias acilo podem ser saturadas ou insaturadas, e podem conter de cerca de 6 a cerca de 24 átomos de carbono. Cada cadeia pode conter o mesmo número de átomos de carbono ou, alternativamente cada cadeia pode conter diferentes números de átomos de carbono. Em alguns exemplos, aqui descritos, a SM semi-sintética ou sintética compreende cadeias acilo mistas de modo que uma cadeia é

saturada e uma cadeia é insaturada. Nestas SM de cadeias acilo mistas, os comprimentos das cadeias podem ser iguais ou diferentes. Em outros exemplos, as cadeias acilo da SM semi-sintética ou sintética são, ou ambas saturadas, ou ambas insaturadas. Novamente, as cadeias podem conter o mesmo número ou números diferentes de átomos de carbono. Em alguns exemplos, ambas as cadeias acilo que constituem a SM semi-sintética ou sintética são idênticas. Num exemplo específico, as cadeias correspondem às cadeias acilo de um ácido gordo de ocorrência natural, tal como por exemplo ácido oleico, palmítico ou esteárico. Em outro exemplo específico, ambas as cadeias acilo são saturadas e contêm de 6 a 24 átomos de carbono. Os exemplos não limitantes de cadeias acilo presentes em ácidos gordos de ocorrência comum que podem ser incluídas em SM semi-sintéticas e sintéticas são proporcionados na Tabela 1, adiante:

Tabela 1	
Comprimento: Número de Insaturações	Nome Comum
14:0	ácido mirístico
16:0	ácido palmítico
18:0	ácido esteárico
18:1 cis Δ^9	ácido oleico
18:2 cis $\Delta^{9,12}$	ácido linoleico
18:3 cis $\Delta^{9,12,15}$	ácido linonénico
20:4 cis $\Delta^{5,8,11,14}$	ácido araquidónico
20:5 cis $\Delta^{5,8,11,14,17}$	ácido eicosapentaenóico (um ácido gordo omega-3)

Como a SM, a identidade da lecitina utilizada não é crítica para o sucesso. Também, como a SM, a lecitina pode ser derivada ou isolada de fontes naturais, ou pode ser obtida sinteticamente. Os exemplos de lecitinas adequadas isoladas de fontes naturais incluem, mas não se lhes limitando, fosfatidilcolina de ovo e fosfatidilcolina de soja. Exemplos adicionais, não limitantes, de lecitinas adequadas incluem, dipalmitoílfosfatidilcolina, dimiristoílfosfatidilcolina, diestearoílfosfatidilcolina 1-miristoíl-2-palmitoílfosfatidil-

colina, 1-palmitoíl-2-miristoílfosfatidilcolina, 1-palmitoíl-2-estearoílfosfatidilcolina, 1-estearoíl-2-palmitoílfosfatidilcolina, 1-palmitoíl-2-oleoílfosfatidilcolina, 1-oleoíl-2-palmitilfosfatidilcolina, dioleoílfosfatidilcolina e os derivados éter ou seus análogos.

Como a SM, as lecitinas derivadas ou isoladas de fontes naturais podem ser enriquecidas para incluir cadeias acilo especificadas. Quando são empregues lecitinas semi-sintéticas ou sintéticas, a(s) identidade(es) das cadeias acilo podem ser selectivamente variadas, como discutido acima em relação à SM. Em alguns exemplos dos complexos com carga aqui descritos, ambas as cadeias acilo na lecitina são idênticas. Em alguns exemplos de complexos de lipoproteína com carga que incluem tanto SM como lecitina, as cadeias acilo da SM e da lecitina são todas idênticas. Num exemplo específico, as cadeias acilo correspondem às cadeias acilo de ácido miristítico, palmítico, oleico ou esteárico.

A fracção lipídica também inclui um fosfolípido com carga. Como aqui se utiliza, "fosfolípidos carregados" ou "fosfolípidos com carga" são fosfolípidos que possuem uma carga global ao pH fisiológico. O fosfolípido com carga pode compreender um único tipo de fosfolípido carregado, ou uma mistura de dois ou mais fosfolípidos diferentes, tipicamente similarmente carregados. Em alguns exemplos, os fosfolípidos carregados são glicerofosfolípidos negativamente carregados. A(s) identidade(es) do(s) fosfolípido(s) carregado(s) não são críticas para o sucesso. Os exemplos específicos de fosfolípidos carregados negativamente adequados incluem, mas não se lhes limitando, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e ácido fosfatídico. Em alguns exemplos, o fosfolípido carregado negativamente compreende um ou mais entre fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e/ou ácido fosfatídico.

Como a SM e a lecitina, os fosfolípidos carregados negativamente podem ser derivados de fontes naturais ou preparados por síntese química. Quando são empregues fosfolípidos carregados negativamente sintéticos, as identidades das cadeias acilo podem ser selectivamente variadas, como discutido acima em relação à SM. Em alguns

exemplos dos complexos de lipoproteína com carga aqui descritos, ambas as cadeias acilo nos fosfolípidos carregados negativamente são idênticas. Em alguns exemplos dos complexos de lipoproteína com carga ternários e quaternários aqui descritos, as cadeias acilo na SM, na lecitina e nos fosfolípidos carregados negativamente são todas idênticas. Num exemplo específico, o(s) fosfolípido(s) carregado(s), e/ou a SM possuem todas as cadeias acilo C16:0 ou C16:1. Em outro exemplo específico, as cadeias acilo do(s) fosfolípido(s) carregado(s), da lecitina e/ou da SM, correspondem à cadeia acilo do ácido palmítico. Em ainda outro exemplo específico, as cadeias acilo do(s) fosfolípido(s) carregado(s), da lecitina e/ou da SM correspondem à cadeia acilo de ácido oleico.

A quantidade total de fosfolípido(s) carregado(s) negativamente que está compreendida nos complexos com carga pode variar. Tipicamente, a fracção lipídica compreenderá de cerca de 0,2 a 10% em peso de fosfolípido(s) carregado(s) negativamente. Em alguns exemplos aqui descritos, a fracção lipídica compreende de cerca de 0,2 a 1% em peso, 0,2 a 2% em peso, 0,2 a 3% em peso, 0,2 a 4% em peso, 0,2 a 5% em peso, 0,2 a 6% em peso, 0,2 a 7% em peso, 0,2 a 8% em peso ou 0,2 a 9% em peso de fosfolípido(s) carregado(s) negativamente totais. Em alguns exemplos, a fracção lipídica compreende cerca de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 ou 3,0% em peso de fosfolípido(s) carregado(s) negativamente totais, e/ou uma gama incluindo quaisquer destes valores como pontos finais. Em alguns exemplos, a fracção lipídica compreende de cerca de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 ou 3,0% em peso de fosfolípido(s) carregado(s) negativamente totais até cerca de 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10% em peso de fosfolípido(s) carregado(s) negativamente totais.

Espera-se que a inclusão de fosfolípidos carregados negativamente nos complexos de lipoproteína com carga aqui descritos vá proporcionar aos complexos maior estabilidade (em solução) e mais longa vida do produto em armazém comparativamente com complexos convencionais. Em adição,

espera-se que a utilização de fosfolípidos carregados negativamente minimize a agregação de partículas (e.g., por repulsão de cargas), desse modo aumentando eficazmente o número de complexos disponíveis presentes num determinado regime de dosagem, e auxilie no direccionamento do complexo para reconhecimento pelo fígado e não pelo rim.

Algumas apolipoproteínas permutam *in vivo* de um complexo de lipoproteína para outro (isto verifica-se para apolipoproteína ApoA-I). Durante o decorrer desta permuta, a apolipoproteína tipicamente transporta consigo uma ou mais moléculas de fosfolípido. Devido a esta propriedade, espera-se que os complexos de lipoproteína com carga aqui descritos vão "semear" fosfolípidos carregados negativamente na HDL endógena, desse modo transformando-as em partículas alfa que são mais resistentes à eliminação pelos rins. Assim, espera-se que a administração dos complexos de lipoproteína com carga e composições aqui descritos vá aumentar os níveis séricos de HDL, e/ou alterar a semivida da HDL endógena, assim como o metabolismo da HDL endógena. Espera-se que isto vá resultar numa alteração do metabolismo do colesterol e do transporte inverso dos lípidos.

Em adição aos fosfolípidos neutros e carregados, a fracção lipídica pode opcionalmente incluir lípidos adicionais. Virtualmente qualquer tipo de lípidos pode ser utilizado, incluindo, mas não se lhes limitando, lisofosfolípidos, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, glicéridos, triglicéridos e colesterol e seus derivados.

Quando incluídos, estes lípidos opcionais constituirão tipicamente menos de cerca de 50% em peso da fracção lipídica, embora em alguns casos possam ser incluídos mais lípidos opcionais. Em alguns casos, a fracção lipídica dos complexos de lipoproteína com carga não inclui lípidos opcionais.

Como indicado na secção "Sumário", a quantidade total de fosfolípido(s) neutro(s) que estão compreendidos na fracção lipídica dos complexos de lipoproteína com carga pode variar, e variará tipicamente de cerca de 50 a 99,8% em peso, dependendo da quantidade total de fosfolípido(s) carregado(s)

incluída, e de se estão incluídos quaisquer lípidos opcionais. Os exemplos específicos aqui descritos em que lípidos opcionais não estão incluídos compreenderão tipicamente de cerca de 90 a 99,8% em peso de fosfolípido(s) neutro(s) totais. As razões molares lecitina:SM adequadas para fracções lipídicas incluindo tanto lecitina como SM estão descritas na secção "Sumário".

Num exemplo específico, o complexo de lipoproteína com carga é um complexo ternário em que a fracção lipídica consiste essencialmente em cerca de 90 a 99,8% em peso de SM e cerca de 0,2 a 10% em peso de fosfolípido carregado negativamente, por exemplo, cerca de 0,2-1% em peso, 0,2-2% em peso, 0,2-3% em peso, 0,2-4% em peso, 0,2-5% em peso, 0,2-6% em peso, 0,2-7% em peso, 0,2-8% em peso, 0,2-9% em peso, ou 0,2-10% em peso de fosfolípido(s) carregado(s) negativamente totais. Em outro exemplo específico, o complexo de lipoproteína com carga é um complexo ternário em que a fracção lipídica consiste essencialmente em cerca de 90 a 99,8% em peso de lecitina e cerca de 0,2 a 10% em peso de fosfolípido carregado negativamente, por exemplo, cerca de 0,2-1% em peso, 0,2-2% em peso, 0,2-3% em peso, 0,2-4% em peso, 0,2-5% em peso, 0,2-6% em peso, 0,2-7% em peso, 0,2-8% em peso, 0,2-9% em peso ou 0,2-10% em peso de fosfolípido(s) carregado(s) negativamente totais.

Em ainda outro exemplo específico, o complexo de lipoproteína com carga é um complexo quaternário em que a fracção lipídica consiste essencialmente em cerca de 9,8 a 90% em peso de SM, cerca de 9,8 a 90% em peso de lecitina e cerca de 0,2-10% em peso de fosfolípido carregado negativamente, por exemplo, de cerca de 0,2-1% em peso, 0,2-2% em peso, 0,2-3% em peso, 0,2-4% em peso, 0,2-5% em peso, 0,2-6% em peso, 0,2-7% em peso, 0,2-8% em peso, 0,2-9% em peso, to 0,2-10% em peso de fosfolípido(s) carregado(s) negativamente totais.

Os complexos podem também opcionalmente incluir outras proteínas, tais como, por exemplo, paraoxonase (PON) ou LCAT, antioxidantes, ciclodextrinas e/ou outros materiais que ajudam a aprisionar o colesterol no núcleo ou na superfície do complexo. O complexo pode opcionalmente ser PEGuilado (e.g.,

coberto com polietilenoglicol ou outro polímero) para aumentar a semivida em circulação.

Como será reconhecido pelos peritos, a razão molar da fracção lipídica relativamente à fracção de apolipoproteína dos complexos de lipoproteína com carga aqui descritos pode variar, e dependerá, entre outros factores, da(s) identidade(es) da apolipoproteína que constitui a fracção de apolipoproteína, das identidades e quantidades dos fosfolípidos carregados que constituem a fracção lipídica, e da dimensão pretendida do complexo de lipoproteína com carga. Porque se pensa que a actividade biológica de apolipoproteínas tais como a ApoA-I é mediada pelas hélices anfipáticas que constituem a apolipoproteína, é conveniente expressar a fracção de apolipoproteína da razão molar lípido:apolipoproteína utilizando equivalentes de proteína ApoA-I. É geralmente aceite que a ApoA-I contém 6-10 hélices anfipáticas, dependendo do método utilizado para calcular as hélices. Outras apolipoproteínas podem ser expressas em termos de equivalentes de ApoA-I com base no número de hélices anfipáticas que contêm. Por exemplo, a ApoA-I_M, que tipicamente existe na forma de um dímero ligado por pontes dissulfureto, pode ser expressa como 2 equivalentes de ApoA-I, pois cada molécula de ApoA-I_M contém duas vezes o número de hélices anfipáticas de uma molécula de ApoA-I. Inversamente, um péptido de apolipoproteína que contém uma única hélice anfipática pode ser expresso como 1/10-1/6 equivalente de ApoA-I, pois cada molécula contém 1/10-1/6 vezes o número de hélices anfipáticas de uma molécula de ApoA-I. Em geral, a razão de equivalentes molares lípido:ApoA-I dos complexos de lipoproteína com carga (aqui definida como " R_i ") variará de cerca de 2:1 a 100:1. Em algumas concretizações, a R_i é de cerca de 50:1. As razões em peso podem ser obtidas utilizando um PM de aproximadamente 650-800 para os fosfolípidos.

A dimensão do complexo de lipoproteína com carga pode ser controlada fazendo variar a R_i . Ou seja, quanto menor a R_i , menor o disco. Por exemplo, grandes discos discóides terão tipicamente uma R_i na gama de cerca de 200:1 a 100:1, enquanto discos discóides pequenos terão tipicamente uma R_i na gama de cerca de 100:1 a 30:1.

Em alguns exemplos específicos aqui descritos, os complexos de lipoproteína com carga são discos discóides grandes que contêm 2-4 equivalentes de ApoA-I (e.g., 2-4 moléculas de ApoA-I, 1-2 moléculas de dímero ApoA-I_M ou 6-10 moléculas peptídicas de hélice única), 1 molécula de fosfolípido carregado e 400 moléculas de fosfolípido neutro total. Em outros exemplos específicos, os complexos de lipoproteína com carga são discos discóides pequenos que contêm 2-4 equivalentes de ApoA-I, 1 molécula de fosfolípido carregado e 200 moléculas de fosfolípidos neutros totais.

As várias moléculas de apolipoproteínas e/ou fosfolípidos que constituem os complexos de lipoproteína com carga podem ser marcadas com qualquer marcador detectável conhecido na especialidade, incluindo isótopos estáveis (e.g., ¹³C, ¹⁵N, ²H, etc.); isótopos radioativos (e.g., ¹⁴C, ³H, ¹²⁵I, etc.); fluoróforos; quimioluminescentes; ou marcadores enzimáticos.

6.3 Métodos de Preparação de Complexos de Lipoproteína com Carga

Os complexos de lipoproteína com carga aqui descritos podem ser preparados numa variedade de formas, incluindo, mas não se lhes limitando, vesículas, lipossomas, proteolipossomas, micelas e partículas discóides. Podem ser utilizados uma variedade de métodos bem conhecido dos peritos na especialidade para preparar os complexos de lipoproteína com carga. Podem ser utilizadas várias técnicas disponíveis para a preparação de lipossomas ou proteolipossomas. Por exemplo, a apolipoproteína pode ser tratada com ultra-sons (utilizando um aparelho ultra-sons com banho ou de sonda) juntamente com os fosfolípidos apropriados para formar complexos. Alternativamente, a apolipoproteína pode ser combinada com vesículas lipídicas pré-formadas resultando a formação espontânea de complexos de lipoproteína com carga. Os complexos de lipoproteína com carga podem também ser formados através de um método de diálise com detergentes; e.g., uma mistura de apolipoproteína, fosfolípido(s) carregado(s), SM e/ou lecitina, e um detergente tal como colato, é dialisada para remover o detergente e reconstituída para formar complexos de lipoproteína com carga (veja-se, e.g., Jonas *et al.*, 1986, *Methods in Enzymol.* 128:553-82), ou utilizando um dispositivo extrusor ou por homogeneização.

Os complexos de lipoproteína com carga podem ser preparados pelo método de dispersão com colato descrito no Exemplo 1 da publicação U.S. 2004/0067873. Resumidamente, lípido seco é hidratado em tampão de NaHCO_3 , depois é submetido a vórtex e tratado com ultra-sons até todo o lípido estar disperso. Adiciona-se a solução de colato, incuba-se a mistura durante 30 minutos, com submissão a vórtex e tratamento com ultra-sons periódicos, até ficar límpida, indicando que as micelas de lípido e colato estão formadas. Adiciona-se proApoA-I em tampão de NaHCO_3 , e incuba-se a solução durante 1 hora a aproximadamente 37°C - 50°C . A razão lípido:proApoA-I na solução pode ser de 1:1 a 200:1 (mole/mole), mas em algumas concretizações, a razão é de cerca de 2:1 de peso de lípido para peso de proteína (p/p).

O colato pode ser removido por métodos bem conhecidos na especialidade. Por exemplo, o colato pode ser removido por diálise, ultrafiltração ou por remoção de moléculas de colato por adsorção absorção num leito ou resina de afinidade. Num exemplo, as contas de afinidade, e.g., BIO-BEADS® (Bio-Rad Laboratories) são adicionadas à preparação de complexos de lipoproteína com carga e colato para adsorver o colato. Em outro exemplo, a preparação, e.g., uma preparação micelar dos complexos de lipoproteína com carga e colato, é passada através de uma coluna empacotada com contras de afinidade.

Num exemplo específico, o colato é removido de uma preparação de complexos de lipoproteína com carga por carregamento da preparação sobre BIO-BEADS® dentro de uma seringa. A seringa é então selada com película e é incubada com revolução a 4°C durante a noite. Antes da utilização, o colato é removido por injeção da solução através de BIO-BEADS®, onde é adsorvido pelas contas.

Espera-se que os complexos de lipoproteína com carga tenham uma semivida acrescida na circulação quando os complexos possuem uma dimensão e densidade similares à HDL, especialmente às HDL nas populações de HDL pré-beta-1 ou pré-beta-2. Preparações estáveis possuindo uma longa vida em armazém podem ser preparadas por liofilização. Por exemplo, o procedimento de co-liofilização descrito adiante proporciona

uma formulação estável e um fácil processo de formulação/preparação de partículas. Métodos de co-liofilização estão também descritos em Pat. U.S. 6,287,590 (intitulada Peptide/lipid complex formation by co-lyophilization, de Dasseux, concedida em 11 Set., 2001). Os complexos de lipoproteína com carga liofilizados podem ser utilizados para preparar fornecimentos a granel para reformulação farmacêutica, ou para preparar alíquotas individuais ou unidades de dosagem que podem ser reconstituídas por reidratação com água estéril ou uma solução tamponada apropriada antes da administração a um indivíduo.

As Pat. U.S. 6,004,925, 6,037,323, 6,046,166 e 6,287,590 divulgam um método simples para a preparação de complexos de lipoproteína com carga que possuem características similares à HDL. Este método, que envolve a co-liofilização de apolipoproteína e soluções de lípido em solvente orgânico (ou misturas de solventes) e formação de complexos de lipoproteína com carga durante a hidratação do pó liofilizado, tem as seguintes vantagens: (1) o método requer muito poucas etapas; (2) o método utiliza solvente(s) barato(s); (3) a maioria ou a totalidade dos ingredientes incluídos são utilizados para formar os complexos projectados, desse modo evitando desperdício de material de partida que é comum em outros métodos; (4) são formados complexos liofilizados que são muito estáveis durante a armazenagem de modo que os complexos resultantes podem ser reconstituídos imediatamente antes da utilização; (5) os complexos resultantes usualmente não necessitam de ser adicionalmente purificados após a formação e antes da utilização; (6) são evitados compostos tóxicos, incluindo detergentes como o colato; e (7) o método de produção pode ser facilmente aumentado de escala e é adequado para fabrico segundo as BPF (*i.e.*, num ambiente isento de endotoxinas).

Em alguns casos, são utilizados métodos de co-liofilização vulgarmente conhecidos na especialidade para preparar complexos de lipoproteína com carga. Resumidamente, as etapas de co-liofilização incluem a solubilização da apolipoproteína ("Apo") e dos fosfolípidos conjuntamente num solvente orgânico ou numa mistura de solventes, ou a solubilização da Apo e dos fosfolípidos separadamente e

mistura posterior. As características desejáveis do solvente ou da mistura de solventes são: (i) uma polaridade relativa média para serem capazes de dissolver lípidos hidrófobos e a proteína anfipática, (ii) os solventes deverão ser solventes de classe 2 ou 3 de acordo com as orientações da FDA para solventes (*Federal Register*, volume 62, No. 247) para evitar a potencial toxicidade associada ao solvente orgânico residual, (iii) baixo ponto de ebulição para assegurar a fácil remoção do solvente durante a liofilização, (iv) elevado ponto de fusão para proporcionar mais rápida congelação, superiores temperaturas de condensador e, portanto menos equipamento de criodessecação. Preferivelmente, utilize-se ácido acético glacial. Podem também ser utilizadas combinações de e.g., metanol, ácido acético glacial, xileno ou ciclo-hexano.

A solução de Apo/lípido é então liofilizada para obter um pó homogéneo de Apo/lípido. As condições de liofilização podem ser optimizadas para obter uma rápida evaporação do solvente com uma quantidade mínima de solvente residual no pó liofilizado de Apo/lípido. A selecção das condições de criodessecação pode ser determinada pelo perito, e depende da natureza ou do solvente, tipo e dimensões do receptáculo, e.g., frasco, que encerra a solução, volume de enchimento, e das características de criodessecador utilizado. A concentração de solução de lípido/Apo antes da liofilização, para remoção do solvente orgânico e formação bem-sucedida de complexos, pode variar de concentrações de 10 a 50 mg/ml de equivalentes de ApoA-I e concentrações de 20 a 100 mg/ml de lípido.

Os complexos de Apo-lípido formam-se espontaneamente após hidratação do pó liofilizado de Apo-lípido com um meio aquoso de pH e osmolalidade apropriados. Em alguns exemplos, os meios podem também conter estabilizantes tais como sacarose, trealose, glicerina e outros. Em alguns exemplos, a solução tem que ser aquecida várias vezes acima da temperatura de transição para lípidos, para se formarem os complexos. A razão molar de lípido para proteína para uma formação bem-sucedida de complexos de lipoproteína com carga pode ser de 2:1 a 200:1 (expressa em equivalentes de ApoA-I) e é preferivelmente de cerca de 2:1 de peso de lípido para peso de proteína (p/p). O pó é hidratado para obter uma concentração final de complexo

de cerca de 5-30 mg/ml expressa em equivalentes de proteína ApoA-I.

Em alguns casos, o pó de Apo é obtido por criodessecação da solução de Apo em solução aquosa de NH_4CO_3 . Uma solução homogênea de Apo e lípidos é formada dissolvendo os seus pós e Apo em ácido acético glacial. A solução é então liofilizada, e formam-se complexos de lipoproteína com carga semelhantes a HDL por hidratação do pó liofilizado com meios aquosos.

Em alguns casos, utiliza-se a homogeneização para preparar complexos de Apo-lípido. Este método pode ser utilizado para preparar complexos de Apo-PC de soja e é utilizado como rotina para a formulação de complexos ApoA-I_M-POPC. A homogeneização pode ser facilmente adaptada para formação de complexos de lipoproteína com carga. Resumidamente, este método compreende a formação de uma suspensão de lípidos em solução aquosa de Apo por Ultraturex™, e homogeneização da suspensão formada de lípido-proteína utilizando um homogeneizador de alta pressão até a suspensão se tornar numa solução límpida-opalescente e se formarem os complexos. São utilizadas temperaturas elevadas acima da transição lipídica durante a homogeneização. A solução é homogeneizada durante um período prolongado de tempo de 1-14 horas e pressão elevada.

Em alguns casos, os complexos de lipoproteína com carga podem ser formados por co-liofilização de fosfolípido com soluções ou suspensões de péptido ou proteína. A solução homogênea de péptido/proteína, fosfolípidos carregados, SM e/ou lecitina (mais qualquer outro fosfolípido de eleição) num solvente orgânico ou mistura de solventes orgânicos, pode ser liofilizada e os complexos de lipoproteína com carga podem ser formados espontaneamente por hidratação do pó liofilizado com um tampão aquoso. Exemplos de solventes orgânicos ou suas misturas incluem, mas não se lhes limitando, ácido acético, ácido acético e xileno, ácido acético e ciclo-hexano, e metanol e xileno.

Uma proporção adequada de proteína (péptido) para lípido pode ser determinada empiricamente de modo a que os complexos resultantes possuam as propriedades físicas e químicas

apropriadas; *i.e.*, usualmente (mas não necessariamente) similares em dimensão à HDL. A mistura resultante de Apo e lípido no solvente é congelada e liofilizada até à secura. Por vezes tem que ser adicionado solvente adicional à mistura para facilitar a liofilização. Espera-se que este produto liofilizado seja susceptível de ser armazenado durante longos períodos e permaneça estável.

O produto liofilizado pode ser reconstituído de modo a obter uma solução ou suspensão do complexo de lipoproteína com carga. Para este fim, o pó liofilizado é reidratado com uma solução aquosa para obter um volume adequado (tipicamente 5-20 mg de complexo de lipoproteína com carga/ml) que seja conveniente para *e.g.*, injeção intravenosa. Numa concretização preferida, o pó liofilizado é reidratado com solução salina tamponada com fosfato, bicarbonato em solução salina ou uma solução salina fisiológica. A mistura pode ser agitada ou submetida a vórtex para facilitar a reidratação. Em geral, a etapa de reconstituição deverá ser conduzida a uma temperatura igual ou superior à temperatura de transição de fase do componente lipídico dos complexos. Minutos após a reconstituição, deverá resultar uma preparação límpida dos complexos de lipoproteína com carga reconstituídos.

Outros métodos incluem secagem por pulverização ("*spray-drying*"), onde as soluções são pulverizadas e o solvente é evaporado (quer a temperaturas elevadas quer a pressão reduzida). Os lípidos e as apolipoproteínas podem estar solubilizados no mesmo solvente ou em solventes diferentes. Um enchimento com pós pode então ser utilizado para encher frascos.

O pó liofilizado a partir de apolipoproteínas e lípidos pode também ser misturado mecanicamente. O pó homogéneo contendo a apolipoproteína e os lípidos pode então ser hidratado para formar espontaneamente complexos com a dimensão apropriada e a razão molar lípido:apolipoproteína apropriada.

Uma alíquota da preparação reconstituída resultante pode ser caracterizada para confirmar que os complexos na preparação possuem a distribuição de tamanhos pretendida; *e.g.*, a distribuição de tamanhos da HDL. A caracterização da

preparação reconstituída pode ser realizada utilizando qualquer método conhecido na especialidade, incluindo, mas não se lhes limitando, filtração de exclusão por tamanhos, filtração em gel, filtração em coluna, cromatografia de permeação em gel e electroforese em gel não desnaturante.

Por exemplo, após hidratação do pó de lipoproteína com carga liofilizado ou no final da homogeneização ou da diálise com colato, as partículas formadas de Apo-lípido semelhantes a HDL são caracterizadas em relação à sua dimensão, concentração, pH final e osmolalidade da solução resultante, em alguns casos, são caracterizadas a integridade do lípido e/ou da apolipoproteína. A dimensão das partículas de lipoproteína com carga resultantes é determinante da sua eficácia, portanto esta medição é tipicamente incluída para a caracterização das partículas.

Em alguns casos, pode-se utilizar cromatografia de permeação em gel (GPC), e.g., um sistema de cromatografia líquida de alta pressão equipado com uma coluna de Superdex[™] de 1 x 30 cm (Pharmacia Biotech) e um detector de UV. Os complexos são eluídos com solução salina tamponada com bicarbonato constituída por NaCl 140 mM e bicarbonato de sódio 20 mM entregues a um caudal de 0,5 ml/min. Uma quantidade típica de complexo injectado é de 0,1 a 1 mg com base no peso de proteína. Os complexos podem ser monitorados por absorvância a 280 nm.

A concentração de proteína e de lípido da solução de partículas de lipoproteína com carga pode ser medida através de qualquer método conhecido na especialidade, incluindo, mas não se lhes limitando, ensaios à proteína e fosfolípidos assim como por métodos cromatográficos tais como HPLC, cromatografia de filtração em gel, GC acoplada a vários detectores incluindo espectrometria de massa, UV ou ensaio com díodos, fluorescente, dispersão de luz elástica e outros. A integridade dos lípidos e das proteínas pode também ser determinada através das mesmas técnicas cromatográficas assim como por mapeamento de péptidos, gel de SDS-PAGE, sequenciação N- e C-terminal para as proteínas e ensaios padrão para determinar oxidação lipídica para os lípidos.

A homogeneidade e/ou a estabilidade dos complexos de lipoproteína com carga ou da composição aqui descritos podem ser medidas por qualquer método conhecido na especialidade, incluindo, mas não se lhes limitando, métodos cromatográficos tais como cromatografia de filtração em gel. Por exemplo, em alguns exemplos um único pico ou um número limitado de picos podem ser associados a um complexo estável. A estabilidade dos complexos pode ser determinada por monitoração do surgimento de novos picos ao longo do tempo. O surgimento de novos picos é um sinal de reorganização entre os complexos devido à instabilidade das partículas.

A razão óptima de fosfolípidos para apolipoproteína(s) nos complexos com carga pode ser determinada utilizando qualquer número de ensaios funcionais conhecidos na especialidade, incluindo, mas não se lhes limitando, ensaio de mobilidade em electroforese em gel, cromatografia de exclusão por tamanhos, interacção com receptores de HDL, reconhecimento por transportador de cassette de ligação a ATP (ABCA1), assimilação pelo fígado e farmacocinética/farmacodinâmica. Por exemplo, podem ser utilizados ensaios de mobilidade em electroforese em gel para determinar a razão óptima de fosfolípidos para apolipoproteínas nos complexos com carga. Os complexos com carga aqui descritos deverão exibir uma mobilidade electroforética que seja similar à de partículas naturais de pré-beta-HDL ou alfa-HDL. Assim, em alguns exemplos, as partículas naturais de pré-beta-HDL ou alfa-HDL podem ser utilizadas como padrão para a determinação da mobilidade dos complexos com carga.

Como outro exemplo, pode ser utilizada cromatografia de exclusão por tamanhos para determinar a dimensão dos complexos com carga aqui descritos em comparação com partículas naturais de pré-beta-HDL. As partículas naturais de pré-beta-HDL geralmente não são superiores a 10-12 nm, e as partículas discóides têm usualmente cerca de 7-10 nm.

Como outro exemplo, podem ser utilizados receptores de HDL num ensaio funcional para identificar que complexo está mais próximo das partículas naturais de pré-beta-HDL, ou para identificar que complexo é o mais eficaz na remoção e/ou mobilização de colesterol ou lípidos a partir de uma célula.

Num ensaio, os complexos podem ser testados quanto à sua capacidade para se ligarem a receptores ABCA-1. Este ensaio pode diferenciar a remoção de colesterol dependente ou independente de ABCA-1. Mesmo sendo a ApoA-I considerada o melhor ligando para este ensaio, complexos tais como partículas micelares pequenas ou discóides pequenas são também ligandos potentes de ABCA-1. Ensaio de ligação a ABCA-1 que podem ser utilizados estão descritos em Brewer *et al.*, 2004, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1755-1760).

Como outro exemplo, sabe-se que células que expressam ABCA1 reconhecem ApoA-1 livre e, em menor extensão, partículas naturais de pré-beta-HDL (Brewer *et al.*, 2004, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1755-1760. Nestes exemplos, o reconhecimento por células com ABCA1 de partículas naturais de pré-beta-HDL pode ser comparado com qualquer dos complexos com carga aqui descritos para identificar o complexo que mais proximamente se assemelha a partículas naturais de pré-beta-HDL.

Uma abordagem relativamente simples para a identificação de complexos com carga que mais proximamente se assemelham a partículas naturais de pré-beta-HDL consiste em perfundir fígados com uma solução contendo os complexos com carga reconstituídos e medir a quantidade que é assimilada pelo fígado.

Em alguns casos, a farmacocinética/farmacodinâmica (FC/FD) dos complexos com carga pode ser medida após uma única injeção em coelhos. Nestes exemplos, a concentração de ApoA-1 é utilizada como marcador da cinética. A farmacodinâmica pode ser medida como a quantidade de colesterol mobilizado acima da linha de base após uma única injeção, assim como a quantidade de colesterol na fracção de HDL. A FC e a FD dependem da natureza dos fosfolípidos, da composição dos fosfolípidos, da razão molar lípido:apolipoproteína e da concentração de fosfolípidos do complexo. Por exemplo, complexos de dipalmitoílfosfatidilcolina (DPPC)/ApoA-1 possuem uma semivida mais longa que complexos de fosfatidilcolina de ovo (BPC)/ApoA-I. Complexos de esfingomielina/ApoA-1 possuem uma semivida mais longa que complexos de EPC/ApoA-1. A semivida de

ApoA-1 humana em seres humanos é de aproximadamente 5 a 6 dias.

Em outro exemplo, a farmacodinâmica do complexo carregado pode ser medida seguindo a taxa de esterificação do colesterol na fracção de HDL ao longo do tempo. A LCAT é a única enzima responsável pela esterificação do colesterol no sangue. A taxa de esterificação do colesterol é um bom parâmetro para avaliar a qualidade de uma partícula. Sendo que a LCAT actua como uma sonda molecular, a taxa de esterificação será superior se o complexo quaternário for reconhecido pela LCAT. Isto significa que a superfície é ideal, a carga é ideal, a morfologia é ideal e os dois substratos (a LCAT hidrolisa primeiro uma cadeia acilo de um fosfolípido (actividade de esterase) e depois esterifica o OH livre do colesterol (actividade de esterase) para formar um éster de colesterilo) estão acessíveis e nas concentrações certas. Também, significa que a partícula está bem dimensionada e composta para solubilizar e aprisionar os produtos da reacção: o lisofosfolípido e o éster de colesterilo; de outro modo a reacção pararia.

6.4 Composições farmacêuticas

As composições farmacêuticas contempladas pela divulgação compreendem complexos de lipoproteína com carga como ingrediente activo num transportador farmaceuticamente aceitável adequado para administração e entrega *in vivo*. Como os péptidos podem compreender terminais e/ou cadeias laterais ácidos e/ou básicos, apolipoproteínas miméticas de péptidos podem ser incluídas nas composições quer na forma de ácidos ou bases livres, quer na forma de sais farmaceuticamente aceitáveis. Proteínas modificadas, tais como proteínas amidadas, aciladas, acetiladas ou PEGuiladas, podem também ser utilizadas.

As composições injectáveis incluem suspensões, soluções ou emulsões estéreis do ingrediente activo em veículos aquosos ou oleosos. As composições podem também compreender agentes de formulação, tais como agentes de suspensão, estabilizantes e/ou dispersantes. As composições para injeção podem ser apresentadas numa forma de dosagem unitária, *e.g.*, em ampolas ou em recipientes de múltiplas doses, e podem compreender conservantes adicionados. Para infusão, uma composição pode

ser fornecida num saco de infusão feito de um material compatível com os complexos de lipoproteína com carga, tal como etileno-acetato de vinilo ou qualquer outro material compatível conhecido na especialidade.

Alternativamente, as composições injectáveis podem ser proporcionadas na forma de pó para reconstituição com um veículo adequado, incluindo, mas não se lhes limitando, água estéril isenta de pirogénios, tampão, solução de dextrose, etc., antes da utilização. Para este fim, podem ser preparados complexos de lipoproteína com carga liofilizados, ou coliofilizados com Apo. As composições armazenadas podem ser fornecidas em formas de dosagem unitárias e reconstituídas antes da utilização *in vivo*.

Para entrega prolongada, o ingrediente activo pode ser formulado na forma de uma composição de depósito, para administração por implantação; e.g., injeção subcutânea, intradérmica ou intramuscular. Assim, por exemplo, o complexo Apo-lípido ou a Apolipoproteína individualmente, podem ser formulados com materiais poliméricos ou hidrófobos adequados (e.g., na forma de uma emulsão num óleo aceitável) ou em espuma de fosfolípido ou resinas de permuta iónica.

Alternativamente, podem ser utilizados sistemas de entrega transdérmica fabricados na forma de um disco ou pacho adesivo que libertam lentamente o ingrediente activo para absorção percutânea. Para este fim, podem ser utilizados potenciadores da permeação para facilitar a penetração transdérmica do ingrediente activo. Pode ser conseguido um benefício particular por incorporação dos complexos com carga aqui descritos num pacho de nitroglicerina para utilização em pacientes com doença cardíaca isquémica e hipercolesterolemia.

Alternativamente, a entrega pode ser realizada localmente ou intramuralmente (no interior da parede do vaso) utilizando um cateter ou um perfusor (veja-se, e.g., a publicação U.S. 2003/0109442).

As composições podem, se desejado, ser apresentadas numa embalagem ou dispositivo dispensador que pode compreender uma ou mais formas de dosagem unitárias compreendendo o

ingrediente activo. A embalagem pode por exemplo compreender metal ou folha de plástico, tal como uma embalagem de *blister*. A embalagem ou dispositivo dispensador podem ser acompanhados por instruções para administração.

6.5 Métodos de Tratamento

Os complexos de lipoproteína com carga e as composições aqui descritos podem ser utilizados para virtualmente qualquer finalidade onde os complexos de lipoproteína se mostraram úteis. Numa concretização específica, os complexos e as composições podem ser utilizados para tratar ou prevenir dislipidemia e/ou virtualmente qualquer doença, condição e/ou desordem associadas a dislipidemia. Como aqui se utilizam, os termos "dislipidemia" ou "dislipidémico" referem-se a um nível anormalmente elevado ou diminuído de lípidos no plasma sanguíneo, incluindo, mas não se lhes limitando, o nível alterado de lípidos associado às seguintes condições: doença cardíaca coronária; doença das artérias coronárias; doença cardiovascular, hipertensão, restenose, doenças vasculares ou perivasculares; desordens dislipidémicas; dislipoproteínemia; níveis elevados de colesterol de lipoproteína de baixa densidade; níveis elevados de colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade; baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade; níveis elevados de colesterol de lipoproteína Lp(a); níveis elevados de apolipoproteína B; aterosclerose (incluindo tratamento e prevenção de aterosclerose); hiperlipidemia; hipercolesterolemia; hipercolesterolemia familiar (HF); hiperlipidemia familiar combinada (HFC); deficiências em lipoproteína-lipases, tais como hipertriglicéridomia, hipoalfalipoproteínemia e hipercolesterolemialipoproteína.

As doenças associadas a dislipidemia incluem, mas não se lhes limitando, doença cardíaca coronária, doença das artérias coronárias, síndrome coronária aguda, doença cardiovascular, hipertensão, restenose, doenças vasculares ou perivasculares; desordens dislipidémicas; dislipoproteínemia; níveis elevados de colesterol de lipoproteína de baixa densidade; níveis elevados de colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade; baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade; níveis elevados de colesterol de lipoproteína Lp(a); níveis elevados de apolipoproteína B; aterosclerose (incluindo

tratamento e prevenção de aterosclerose); hiperlipidemia; hipercolesterolemia; hipercolesterolemia familiar (HF); hiperlipidemia familiar combinada (HFC); deficiências em lipoproteína-lipase, tais como hipertriglicéridomia, hipoalfalipoproteínemia e hipercolesterolemialipoproteína.

Utilizando os complexos de lipoproteína com carga e as composições aqui descritos, espera-se que uma dosagem de fosfolípidos que varia de cerca de 2 a 25 vezes inferior (em equivalentes de ApoA-I) à dosagem eficaz presentemente conhecida na especialidade, seja eficaz no tratamento ou prevenção da doença ou para proporcionar um efeito de melhoria.

Os métodos podem abranger um método de tratamento ou prevenção de uma doença associada a dislipidemia, compreendendo a administração a um indivíduo de um complexo de lipoproteína com carga ou de uma composição aqui descritos numa quantidade eficaz para se conseguir um nível sérico de apolipoproteína livre ou complexada, durante pelo menos um dia após a administração, que esteja na gama de cerca de 10 mg/dL a 300 mg/dL superior ao nível da linha de base (inicial) anterior à administração.

Os métodos podem abranger um método de tratamento ou prevenção de uma doença associada a dislipidemia, compreendendo a administração a um indivíduo de um complexo de lipoproteína com carga ou de uma composição aqui descritos numa quantidade eficaz para se conseguir uma concentração plasmática em circulação de uma fracção de colesterol HDL, durante pelo menos um dia após a administração, que seja pelo menos cerca de 10% superior à fracção inicial de colesterol HDL anterior à administração.

Os métodos podem abranger um método de tratamento ou prevenção de uma doença associada a dislipidemia, compreendendo a administração a um indivíduo de um complexo de lipoproteína com carga ou de uma composição aqui descritos numa quantidade eficaz para se conseguir uma concentração plasmática em circulação de uma fracção de colesterol HDL que esteja entre 30 e 300 mg/dL entre 5 minutos e 1 dia após a administração.

Os métodos podem abranger um método de tratamento ou prevenção de uma doença associada a dislipidemia, compreendendo a administração a um indivíduo de um complexo de lipoproteína com carga ou de uma composição aqui descritos numa quantidade eficaz para se conseguir uma concentração plasmática em circulação de ésteres de colesterilo que esteja entre 30 e 300 mg/dL entre 5 minutos e 1 dia após a administração.

Os métodos podem abranger um método de tratamento de, ou protecção contra, uma doença associada a dislipidemia, compreendendo a administração a um indivíduo de um complexo de lipoproteína com carga ou de uma composição aqui descritos numa quantidade eficaz para se conseguir um aumento na excreção fecal de colesterol, durante pelo menos um dia após a administração, que seja pelo menos cerca de 10% superior ao nível na linha de base (inicial) anterior à administração.

Os complexos de lipoproteína com carga ou composições aqui descritos podem ser utilizados individualmente ou em terapia de combinação com outros fármacos utilizados para tratar ou prevenir as condições anteriores. Estas terapias incluem, mas não se lhes limitando, a administração simultânea ou sequencial dos fármacos envolvidos. Por exemplo, no tratamento de hipercolesterolemia ou de aterosclerose, as formulações de lipoproteína com carga podem ser administradas com qualquer uma ou mais das terapias para diminuição do colesterol presentemente utilizadas; *e.g.*, resinas de ácidos biliares, niacina, estatinas, inibidores da absorção do colesterol e/ou fibratos. Estes regimes combinados podem produzir efeitos terapêuticos particularmente benéficos pois cada fármaco actua sobre um alvo diferente na síntese e no transporte do colesterol; *i.e.*, as resinas de ácidos biliares afectam a reciclagem do colesterol, o quilomícron e a população de LDL; a niacina afecta principalmente a população de VLDL e LDL; as estatinas inibem a síntese do colesterol, diminuindo a população de LDL (e talvez aumentando a expressão de receptores de LDL); enquanto os complexos de lipoproteína com carga aqui descritos afectam o RCT, aumentam a HDL e promovem o efluxo de colesterol.

Os complexos de lipoproteína com carga ou as composições aqui descritos podem ser utilizados em conjunto com fibratos para tratar ou prevenir doença cardíaca coronária; doença das artérias coronárias; doença cardiovascular, hipertensão, restenose, doenças vasculares ou perivasculares; desordens dislipidémicas; dislipoproteínemia; níveis elevados de colesterol de lipoproteína de baixa densidade; níveis elevados de colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade; baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade; níveis elevados de colesterol de lipoproteína Lp(a); níveis elevados de apolipoproteína B; aterosclerose (incluindo tratamento e prevenção de aterosclerose); hiperlipidemia; hipercolesterolemia; hipercolesterolemia familiar (HF); hiperlipidemia familiar combinada (HFC); deficiências em lipoproteína-lipases, tais como hipertriglicéridomia, hipoalfalipoproteínemia e hipercolesterolemialipoproteína. Descrevem-se adiante formulações e regimes de tratamento exemplificativos.

Os complexos de lipoproteína com carga ou composições aqui descritos podem ser administrados por qualquer via adequada que assegure a biodisponibilidade na circulação. Uma importante característica das concretizações que incluem SM é de que os complexos de lipoproteína com carga podem ser administrados em doses 1-10% inferiores à dose eficaz que se espera eficaz, para apolipoproteína (Apo) ou péptido de Apo administrado isoladamente, e em doses 2-25 vezes inferiores à dose eficaz necessária para administração de Apo-PC de soja (ou Apo-PC de ovo ou Apo-POPC). É necessária administração em doses (para injeção intravenosa) tão baixas quanto de cerca de 40 mg a 2 g/pessoa de apolipoproteína a cada 2 a 10 dias, em vez das grandes quantidades de apolipoproteína (20 mg/kg a 100 mg/kg por administração a cada 2 a 5 dias, 1,4 g a 8 g por ser humano de estatura média) necessárias para os regimes de tratamento presentemente disponíveis.

Os complexos de lipoproteína com carga ou as composições aqui descritos podem ser administrados em dosagens que aumentam a pequena fracção de HDL, por exemplo, a fracção de HDL pré-beta, pré-gama e semelhante a pré-beta, a fracção de HDL alfa, a fracção de HDL3 e/ou de HDL2. Em alguns casos, as dosagens são eficazes para se conseguir uma redução da placa

aterosclerótica como medida por, por exemplo, técnicas de imagiologia tais como imagiologia por ressonância magnética (MRI) ou ultra-sonografia intravascular (IVUS). Os parâmetros a seguir por IVUS incluem, mas não se lhes limitando, alteração na percentagem de volume de ateroma a partir da linha de base e alteração no volume total de ateroma. Os parâmetros a seguir por MRI incluem, mas não se lhes limitando, os mesmos que para IVUS e a composição lipídica e a calcificação da placa.

A regressão da placa pode ser medida utilizando o paciente como seu próprio controlo (tempo zero *versus* tempo t no final da última infusão, ou em semanas após a última infusão, ou em 3 meses, 6 meses ou 1 ano após o início da terapia.

A administração pode ser mais bem conseguida por vias de administração parentéricas, incluindo injeções intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutânea (SC) e intraperitoneal (IP). Em certos exemplos, a administração é através de um perfusor, um infiltrador ou um cateter. Em alguns exemplos, os complexos de lipoproteína com carga são administrados por injeção, através de uma bomba implantável subcutaneamente ou através de uma preparação de depósito, em quantidades que atingem uma concentração sérica em circulação igual à obtida através de administração parentérica. Os complexos podem também ser absorvidos em, por exemplo, uma endoprótese ("stent") ou outro dispositivo.

A administração pode ser realizada através de uma variedade de diferentes regimes de tratamento. Por exemplo, podem ser administradas várias injeções intravenosas periodicamente durante um único dia, em que o volume total cumulativo das injeções não atinja a dose tóxica diária. Alternativamente, pode ser administrada uma injeção intravenosa aproximadamente a cada 3 a 15 dias, preferivelmente aproximadamente a cada 5 a 10 dias, e o mais preferivelmente aproximadamente a cada 10 dias. Em ainda outra alternativa, pode ser administrada uma dose crescente, partindo de cerca de 1 a 5 doses de uma dose entre (50-200 mg) por administração, depois seguida por doses repetidas entre 200 mg e 1 g por administração. Dependendo das necessidades do

paciente, a administração pode ser por infusão lenta com uma duração de mais de uma hora, por infusão rápida de uma hora ou menos, ou por uma única injeção de *bolus*.

A administração pode ser realizada na forma de uma série de injeções e depois parada durante 6 meses a 1 ano, e depois pode ser iniciada uma outra série. Podem então ser administradas séries de injeções de manutenção a cada ano ou a cada 3 a 5 anos. As séries de injeções podem ser realizadas ao longo de um dia (perfusão para manter um nível plasmático especificado de complexos), vários dias (e.g., quatro injeções ao longo de um período de oito dias) ou várias semanas (e.g., quatro injeções ao longo de um período de quatro semanas), e depois reiniciadas após seis meses a um ano.

Podem ser utilizadas outras vias de administração. Por exemplo, a absorção através do tracto gastrointestinal pode ser realizada pelas vias orais de administração (incluindo, mas não se lhes limitando, as vias de ingestão, bucal e sublingual) desde que sejam utilizadas as formulações apropriadas (e.g., revestimentos entéricos) para evitar ou minimizar a degradação do ingrediente activo, e.g., nos ambientes agrestes da mucosa oral, do estômago e/ou do intestino delgado. Alternativamente, a administração por via de tecido mucoso tais como os modos de administração vaginal e rectal, pode ser utilizada para evitar ou minimizar a degradação no tracto gastrointestinal. Em outras concretizações, as formulações da invenção podem ser administradas transcutaneamente (e.g., transdermicamente), ou por inalação. Notar-se-á que a via preferida pode variar com a condição, a idade e a aceitação do beneficiário.

A dose real de um complexo de lipoproteína com carga ou de uma composição aqui descritos pode variar com a via de administração.

Os dados obtidos em sistemas de modelos animais descritos nas Pat. U.S. 6,004,925, 6,037,323 e 6,046,166 (concedidas a Dasseux *et al.*) mostram que os péptidos de ApoA-I se associam à componente HDL, e têm uma semivida projectada em seres humanos de cerca de cinco dias. Assim, os complexos de

lipoproteína com carga podem ser administrados por injeção intravenosa numa dose entre cerca de 0,1 g-1 g de complexo de lipoproteína com carga por administração a cada 2 a 10 dias por ser humano de estatura média.

A toxicidade e a eficácia terapêutica dos vários complexos de lipoproteína com carga podem ser determinadas utilizando procedimentos farmacêuticos padrão em cultura celular ou animais experimentais para determinação da LD50 (a dose letal para 50% da população) e a BD50 (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão de doses entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expressa como a razão LD50/ED50. Os complexos de lipoproteína com carga que exibem grandes índices terapêuticos são preferidos. Os exemplos não limitantes de parâmetros que podem ser seguidos incluem transaminases da função do fígado (não mais de 2X os níveis normais da linha de base). Esta é uma indicação de que demasiado colesterol é levado ao fígado e que não consegue assimilar essa quantidade. O efeito sobre os glóbulos vermelhos do sangue pode também ser monitorado, uma vez que a mobilização do colesterol a partir dos glóbulos vermelhos do sangue faz com que estes fiquem frágeis, ou afecta o seu formato.

Os pacientes podem ser tratados desde alguns dias até várias semanas antes de um acto médico (e.g., tratamento preventivo), ou durante ou após um acto médico. A administração pode ser concomitante ou contemporânea com outra terapia invasiva, tal como, angioplastia, ablação das carótidas, aterectomia rotativa ("*rotoblader*") ou transplante de órgãos (e.g., coração, rim, fígado, etc.).

Os complexos de lipoproteína com carga podem ser administrados a um paciente cuja síntese de colesterol está controlada por uma estatina ou por um inibidor da síntese de colesterol. Em outros casos, os complexos de lipoproteína com carga são administrados a um paciente em tratamento com uma resina de ligação, e.g., uma resina semi-sintética tal como colestiramina, ou com uma fibra, e.g., fibra vegetal, para aprisionar sais biliares e colesterol, para aumentar a excreção de ácido biliar e diminuir as concentrações de colesterol no sangue.

6.6 Outras Utilizações

Os complexos de lipoproteína com carga e composições aqui descritos podem ser utilizados em ensaios *in vitro* para medir a HDL sérica, e.g., para fins de diagnóstico. Porque a ApoA-I, a ApoA-II e os péptidos de Apo se associam à componente HDL do soro, os complexos de lipoproteína com carga podem ser utilizados como "marcadores" para a população de HDL, e as populações de HDL pré-beta1 e pré-beta2. Além disso, os complexos de lipoproteína com carga podem ser utilizados como marcadores para a subpopulação de HDL que são eficazes no RCT. Para este fim, os complexos de lipoproteína com carga podem ser adicionados a, ou misturados com, uma amostra de soro de um paciente; após um tempo de incubação apropriado, a componente HDL pode ser ensaiada por detecção dos complexos de lipoproteína com carga incorporados. Isto pode ser realizado utilizando complexos de lipoproteína com carga marcados (e.g., marcadores radioactivos, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, corantes, etc.), ou por imunoensaios utilizando anticorpos (ou fragmentos de anticorpos) específicos para complexos de lipoproteína com carga.

Alternativamente, os complexos de lipoproteína com carga marcados podem ser utilizados em procedimentos de imagiologia (e.g., varrimentos de CAT, varrimentos de MRI) para visualizar o sistema circulatório, ou para monitorar o RCT, ou para visualizar a acumulação de HDL em estrias de gordura, lesões ateroscleróticas, e similares, onde a HDL deverá ser activa no efluxo de colesterol

Exemplos e dados associados à preparação e à caracterização de certos complexos lipídicos de proApoA-1 estão descritos na Publicação de Patente U.S. 2004/0067873.

Os dados obtidos num sistema modelo animal utilizando certos complexos lipídicos de proApoA-1 estão descritos na Publicação de Patente U.S. 2004/0067873.

7. EXEMPLOS

Exemplo 1: Preparação de proApoA-I, Esfingomielina e Fosfatidilglicerol

A proteína proApoA-I foi fornecida por Unité de Biotechnologie, Institut Meurice, Hte Ecole Lucia De Brouckère, 1 Avenue Emile Gryzon, B-1070 Anderlecht, Bélgica em balões liofilizados individuais de 100 mL contendo aproximadamente 90 mg de proteína. O número do lote era 20060202. A proteína foi mantida a aproximadamente 4°C até à utilização. Antes da liofilização, o teor de proApoA-I era de 3,225 mg/mL com um teor de ureia de cerca de 0,011 mg/mL. Foi preparada uma solução de proApoA-I dissolvendo aproximadamente 630 mg de proApoA-I em 25,6 mL de ácido acético/água a 5%. A concentração final da solução era de 25 mg/mL.

A esfingomielina de ovo (Coatsome® NM-10) foi fornecida por NOF Corporation, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-Shi, 660-0095, Japão. O número do lote era 0502ES1. Manteve-se a esfingomielina a aproximadamente -20°C até à utilização. A pureza da esfingomielina era de 99,1%. Preparou-se uma solução de esfingomielina dissolvendo 799,4 mg de esfingomielina purificada em 16 mL de ácido acético/água a 5% para obter uma concentração final de 50 mg/mL.

O 1,2-dipalmitoil-SN-glicero-3-fosfatidilglicerol, na forma de sal de sódio (DPPG-Na, Coatsome® MG-6060LS), foi fornecido por NOF Corporation, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-Shi, 660-0095, Japão. O número do lote era 0309651L. Manteve-se o DPPG-Na a aproximadamente -20°C até à utilização. A pureza do DPPG-Na era de 99,2%. Preparou-se uma solução de DPPG-Na dissolvendo 49,1 mg de DPPG-Na em 1 mL de ácido acético/água a 5% para obter uma concentração final de 50 mg/mL.

Exemplo 2: Preparação de Complexos de Lipoproteína Sem Carga de Controlo

Prepararam-se complexos de lipoproteína sem carga de controlo consistindo em proApo-AI (33% em peso) e esfingomielina (67% em peso) como se descreve adiante.

Prepararam-se formulações de complexos de lipoproteína sem carga de controlo misturando 5,6 mL de proApoA-I a 25 mg/mL com aproximadamente 5,6 mL de esfingomielina a 50 mg/mL em balões de vidro de 100 mL. Filtrou-se a mistura resultante através de um filtro de *nylon* de 0,22 µm. Aqueceu-se a mistura a aproximadamente 50°C e depois congelou-se em azoto líquido sob agitação manual. Imediatamente após a congelação, colocaram-se os balões num liofilizador durante 15 horas. Após a liofilização, colocaram-se os balões sob vácuo a aproximadamente 40°C durante 4 horas. Armazenaram-se as formulações resultantes a aproximadamente 4°C até à utilização.

Adicionaram-se 14 mL de uma solução contendo NaCl 140 mM e NaHCO₃ 20 mM a um balão de vidro contendo uma formulação liofilizada de um complexo de lipoproteína sem carga de controlo. Ajustou-se o pH da solução resultante a um pH básico por adição de 0,75 mL de NaOH 1M em 20 mL de solução. Agitou-se a solução manualmente, aqueceu-se a aproximadamente 50°C, e depois colocou-se num banho ultra-sónico durante pelo menos uma hora. A concentração de proApoA-I na formulação resultante era de 10 mg/mL. Injectaram-se as formulações num sistema de HPLC para verificar a presença de complexos de lipoproteína sem carga. A FIG. 1 proporciona um exemplo de um cromatograma de HPLC para um complexo de lipoproteína sem carga preparado como aqui descrito.

Exemplo 3: Preparação de Complexos de Lipoproteína Com Carga de Teste

Prepararam-se complexos de lipoproteína com carga consistindo em proApoAI (33% em peso), esfingomielina (65% em peso) e fosfatidilglicerol (2% em peso) como se descreve adiante.

Prepararam-se formulações de complexos de lipoproteína com carga misturando 5,6 mL de proApoA-I a 25 mg/mL com aproximadamente 5,6 mL de esfingomielina a 50 mg/mL e aproximadamente 0,15 mL de DPPG-NA a 50 mg/mL num balão de vidro de 100 mL e depois filtrando a mistura resultante através de um filtro de *nylon* de 0,22 µm. Aqueceu-se a mistura a aproximadamente 50°C e congelou-se em azoto líquido sob agitação manual. Imediatamente após a congelação, colocaram-se

os balões num liofilizador durante 15 horas. Após a liofilização, colocaram-se os balões sob vácuo a aproximadamente 40°C durante 4 horas. Armazenou-se a formulação resultante a aproximadamente 4°C até à utilização.

Adicionaram-se 14 mL de NaCl 140 mM e NaHCO₃ 20 mM a um balão de vidro contendo a formulação liofilizada descrita acima. Ajustou-se o pH da solução resultante a um pH básico por adição de 0,75 mL de NaOH 1M em 20 mL de solução. Agitou-se a solução manualmente, aqueceu-se a aproximadamente 50°C, e depois colocou-se num banho ultra-sónico durante pelo menos uma hora. A concentração de proApoA-I na formulação resultante era de 10 mg/mL. Injectaram-se as formulações num sistema de HPLC para verificar a presença de complexos de lipoproteína sem carga. A FIG. 2 proporciona um exemplo de um cromatograma de HPLC para um complexo de lipoproteína com carga preparado como aqui descrito.

Exemplo 4: Sistema Modelo Animal

Utilizaram-se coelhos New Zealand machos pesando entre 3 a 4 kg para testar a mobilização do colesterol pelos complexos sem carga e com carga descritos acima. Os animais foram fornecidos por CEGAV, França, e foram individualmente identificados com uma tatuagem distinta na orelha. Alojaram-se os coelhos nas instalações para animais Avogadro (França) em gaiolas individuais. O alojamento e o tratamento dos animais foi conforme com as recomendações da Directiva 86/609/EEC. As instalações para animais de Avogadro têm o número de licença B 31 188 01 obtida junto das autoridades veterinárias francesas. Todos os animais foram manipulados de modo semelhante e com devido respeito pelo seu bem-estar de acordo com a prática dominante e os actuais procedimentos operativos padrão (SOP) na Avogadro. O equipamento e os alojamentos dos animais foram limpos a intervalos apropriados.

As condições na sala dos animais foram as seguintes: temperatura: 22 ± 2°C, humidade relativa: 55 ± 15%, e um ciclo de 12 horas de luz/12 horas de escuro. A temperatura e a humidade relativa foram registadas diariamente e guardadas com os dados brutos do estudo. Cada coelho foi observado uma vez por dia, sendo registadas quaisquer verificações anormais observadas, e reportadas ao Director do Estudo.

Os animais foram aclimatados durante pelo menos 7 dias antes do início do estudo. Os animais receberam *ad libitum* uma dieta granulada controlada numa base diária. A água estava disponível *ad libitum* ao longo de todo o estudo.

Antes da administração dos complexos, os animais foram deixados em jejum durante a noite. Pesaram-se os animais imediatamente antes da administração dos complexos. Os complexos foram administrados intravenosamente a uma taxa de dosagem de 15 mg/kg, que corresponde a 1,5 mL/kg. O volume administrado foi baseado no peso. A alimentação foi retomada aproximadamente 6 horas após a administração dos complexos. Os detalhes do tratamento registados incluíram os cálculos da dosagem, a dose administrada, a data e o tempo da administração.

Antes da colheita de amostras de sangue, os animais foram deixados em jejum durante a noite. Colheram-se amostras de sangue da veia jugular ou da veia marginal da orelha. O sangue foi colhido da veia jugular utilizando uma seringa montada com uma agulha com EDTA (aproximadamente 1 mL de sangue por tempo de amostragem). Imediatamente após a colheita, as amostras de sangue foram mantidas a aproximadamente 4°C para evitar alteração da amostra de sangue. Os espécimes de sangue foram centrifugados (a 3500 g durante 10 minutos a aproximadamente 5°C). Os espécimes de plasma foram separados e divididos em alíquotas (3 alíquotas de pelo menos 200 µL (alíquotas A, B, C)) e armazenados a aproximadamente -80°C. O coágulo de sangue restante foi descartado.

Exemplo 5: Complexos de Lipoproteína Com Carga Mobilizam o Colesterol

Os complexos de lipoproteína de controlo (formulação IIA) ou os complexos de lipoproteína com carga (formulação IIB) foram preparados como descrito acima e administrados a coelhos (15 mg de complexo/kg de peso corporal), dois coelhos por grupo.

Colheram-se amostras de sangue (1 ml) pré-dose, e 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h e 6 h após a administração. As amostras de plasma foram analisadas quanto ao colesterol

total, ao colesterol livre e triglicéridos de acordo com métodos publicados (veja-se, e.g., Usui, S., et al., 2002, *J. Lipid Res.*, 43:805-14). A concentração de colesterol esterificado foi calculada subtraindo o teor de colesterol livre ao teor de colesterol total. Os resultados de colesterol livre na HDL para cada animal estão ilustrados na FIG. 3. Os valores médios para os dois animais que constituem o grupo de controlo (grupo IIA) e o grupo de teste (grupo IIB) estão ilustrados na FIG. 4.

Conforme esperado, ambos os complexos de lipoproteína, de controlo e de teste, mobilizaram o colesterol, com a média do grupo de teste apresentando uma mobilização acrescida comparativamente com a média do grupo de controlo.

As concretizações específicas descritas são oferecidas meramente a título de exemplo, e a invenção pretende-se limitada apenas pelos termos das reivindicações anexas.

Lisboa, 2012-05-28

REIVINDICAÇÕES

1. Complexo de lipoproteína compreendendo uma fracção de apolipoproteína ApoA-1 e uma fracção lipídica, em que a referida fracção lipídica consiste essencialmente em esfingomiéline e cerca de 3% em peso de um fosfolípido carregado negativamente, e a razão molar da fracção lipídica relativamente à fracção de apolipoproteína ApoA-1 está na gama de cerca de 200:1 a 2:1.

2. Complexo de lipoproteína da reivindicação 1 em que o fosfolípido carregado negativamente é seleccionado entre um fosfatidilinositol, uma fosfatidilserina, um fosfatidilglicerol, um ácido fosfatídico e suas misturas.

3. Complexo de lipoproteína da reivindicação 1 em que o fosfolípido carregado negativamente é fosfatidilglicerol.

4. Complexo de lipoproteína da reivindicação 1 em que a esfingomiéline compreende D-eritro-N-16:0-esfingomiéline e/ou D-eritro-N-16:0-di-hidroesfingomiéline.

5. Complexo de lipoproteína de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 em que as cadeias acilo da esfingomiéline e/ou do fosfolípido carregado negativamente são, cada uma, independentemente das outras, seleccionadas entre um hidrocarboneto saturado, mono-insaturado e poli-insaturado contendo de 6 a 24 átomos de carbono.

6. Complexo de lipoproteína da reivindicação 5 em que todas as cadeias acilo da esfingomiéline e/ou do fosfolípido carregado negativamente são iguais.

7. Complexo de lipoproteína da reivindicação 5 em que as cadeias acilo da esfingomiéline e do fosfolípido carregado negativamente contêm o mesmo número de átomos de carbono.

8. Complexo de lipoproteína da reivindicação 5 em que as cadeias acilo da esfingomiéline e do fosfolípido carregado negativamente possuem diferentes graus de saturação.

9. Complexo de lipoproteína da reivindicação 1 em que a apolipoproteína ApoA-1 é seleccionada entre ApoA-I humana madura, ApoA-I_{Milano} madura, ApoA-I_{Paris} madura e suas misturas.

10. Complexo de lipoproteína da reivindicação 1 ou 9 em que a apolipoproteína ApoA-1 está na forma de um monómero.

11. Complexo de lipoproteína da reivindicação 1 em que a apolipoproteína ApoA-1 é uma apolipoproteína ApoA-1 humana madura e o fosfolípido carregado negativamente é fosfatidilglicerol.

12. Complexo de lipoproteína da reivindicação 1 em que a razão molar da fracção lipídica relativamente à fracção de apolipoproteína ApoA-I está na gama de cerca de 200:1 a 100:1.

13. Complexo de lipoproteína da reivindicação 1 em que a razão molar da fracção lipídica relativamente à fracção de apolipoproteína ApoA-1 está na gama de cerca de 100:1 a 30:1.

14. Complexo de lipoproteína da reivindicação 1 em que a apolipoproteína ApoA-I é uma apolipoproteína ApoA-I humana madura, a esfingomielina é esfingomielina do ovo, o fosfolípido carregado negativamente é fosfatidilglicerol, e a razão molar da fracção lipídica relativamente à fracção de apolipoproteína ApoA-I está na gama de cerca de 200:1 a 100:1.

15. Complexo de lipoproteína da reivindicação 1 em que a apolipoproteína ApoA-1 é uma apolipoproteína ApoA-1 humana madura, a esfingomielina é esfingomielina do ovo, o fosfolípido carregado negativamente é fosfatidilglicerol, e a razão molar da fracção lipídica relativamente à fracção de apolipoproteína ApoA-I está na gama de cerca de 100:1 a 30:1.

16. Composição farmacêutica compreendendo um complexo de lipoproteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 e um transportador, diluente e/ou excipiente farmacêuticamente aceitáveis.

17. Complexo de lipoproteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 para utilização num método de tratamento de um indivíduo com dislipidemia, o método

compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz do referido complexo de lipoproteína.

18. Complexo de lipoproteína para utilização de acordo com a reivindicação 17 em que a quantidade de complexo de lipoproteína administrado é eficaz para aumentar o nível sérico do indivíduo de apolipoproteína ApoA-1 livre ou complexada em cerca de 10-300 mg/dL comparativamente com o nível da linha de base.

19. Complexo de lipoproteína para utilização de acordo com a reivindicação 17 ou 18 em que a quantidade do complexo de lipoproteína administrado é suficiente para entregar cerca de 1 a 100 mg/kg de apolipoproteína ApoA-I.

20. Complexo de lipoproteína para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19 em que o complexo de lipoproteína é administrado intravenosamente.

21. Complexo de lipoproteína para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20 em que o complexo de lipoproteína é simultaneamente administrado com uma resina de ácido biliar, niacina, uma estatina, um fibrato e/ou um inibidor da absorção de colesterol.

22. Complexo de lipoproteína para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 21 em que o complexo de lipoproteína é administrado na forma de uma composição farmacêutica compreendendo o complexo e um transportador, diluente e/ou excipiente farmacêuticamente aceitáveis.

23. Complexo de lipoproteína para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 22, em que o indivíduo possui uma ou mais condições associadas a dislipidemia seleccionadas entre inflamação, doença de Alzheimer, ictó, ictó isquémico, ataque isquémico transiente, enfarte do miocárdio, angina de peito, hipertensão renovascular, insuficiência renovascular, claudicação intermitente, isquemia crítica dos membros, dor em repouso, gangrena, doença cardíaca coronária, doença das artérias coronárias, síndrome coronária aguda, doença cardiovascular, hipertensão, restenose, doença vascular, doença perivascular,

dislipoproteínemia, níveis elevados de colesterol de lipoproteína de baixa densidade, níveis elevados de colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade, baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade, níveis elevados de colesterol de lipoproteína Lp(a), níveis elevados de apolipoproteína B, aterosclerose, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada, e uma deficiência em lipoproteína-lipase.

24. Complexo de lipoproteína para utilização de acordo com a reivindicação 23, em que a deficiência em lipoproteína-lipase é hipertriglicéridomia, hipoalfalipoproteínemia ou hipercolesterolemialipoproteína.

25. Complexo de lipoproteína para utilização de acordo com a reivindicação 23, em que a condição associada a dislipidemia é aterosclerose, síndrome coronária aguda, enfarte do miocárdio, angina ou icto.

26. Utilização de um complexo de lipoproteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 na preparação de um medicamento para o tratamento de um indivíduo com dislipidemia.

27. Utilização da reivindicação 26 em que a quantidade de complexo de lipoproteína para administração é eficaz para aumentar o nível sérico do indivíduo de apolipoproteína ApoA-1 livre ou complexada em cerca de 10-300 mg/dL comparativamente com o nível da linha de base.

28. Utilização da reivindicação 26 ou da reivindicação 27 em que a quantidade do complexo de lipoproteína para administração é suficiente para entregar cerca de 1 a 100 mg/kg de apolipoproteína ApoA-I.

29. Utilização de qualquer uma das reivindicações 26 a 28 em que o complexo de lipoproteína é para administração intravenosa.

30. Utilização de qualquer uma das reivindicações 26 a 29 em que o complexo de lipoproteína é para administração simultânea com uma resina de ácido biliar, niacina, uma

estatina, um fibrato e/ou um inibidor da absorção de colesterol.

31. Utilização de qualquer uma das reivindicações 26 a 30 em que o complexo de lipoproteína é para administração na forma de uma composição farmacêutica compreendendo o complexo e um transportador, diluente e/ou excipiente farmaceuticamente aceitáveis.

32. Utilização de qualquer uma das reivindicações 26 a 31 em que o indivíduo possui uma ou mais condições associadas a dislipidemia seleccionadas entre inflamação, doença de Alzheimer, ictó, ictó isquémico, ataque isquémico transiente, enfarte do miocárdio, angina de peito, hipertensão renovascular, insuficiência renovascular, claudicação intermitente, isquemia crítica dos membros, dor em repouso, gangrena, doença cardíaca coronária, doença das artérias coronárias, síndrome coronária aguda, doença cardiovascular, hipertensão, restenose, doença vascular, doença perivascular, dislipoproteínemia, níveis elevados de colesterol de lipoproteína de baixa densidade, níveis elevados de colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade, baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade, níveis elevados de colesterol de lipoproteína Lp(a), níveis elevados de apolipoproteína B, aterosclerose, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada, e uma deficiência em lipoproteína-lipase.

33. Utilização da reivindicação 32, em que a deficiência em lipoproteína-lipase é hipertriglicéridomia, hipoalfalipoproteínemia ou hipercolesterolemialipoproteína.

34. Utilização da reivindicação 32, em que a condição associada a dislipidemia é aterosclerose, síndrome coronária aguda, enfarte do miocárdio, angina ou ictó.

Lisboa, 2012-05-28

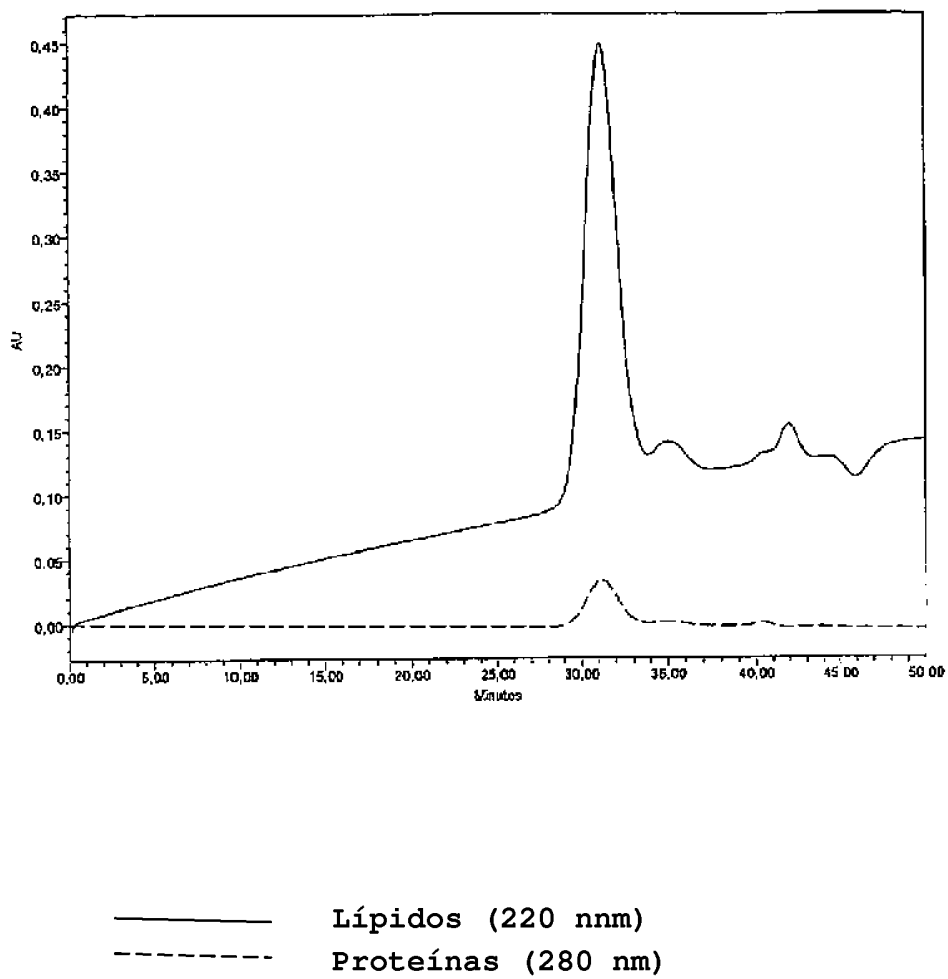


FIG. 1

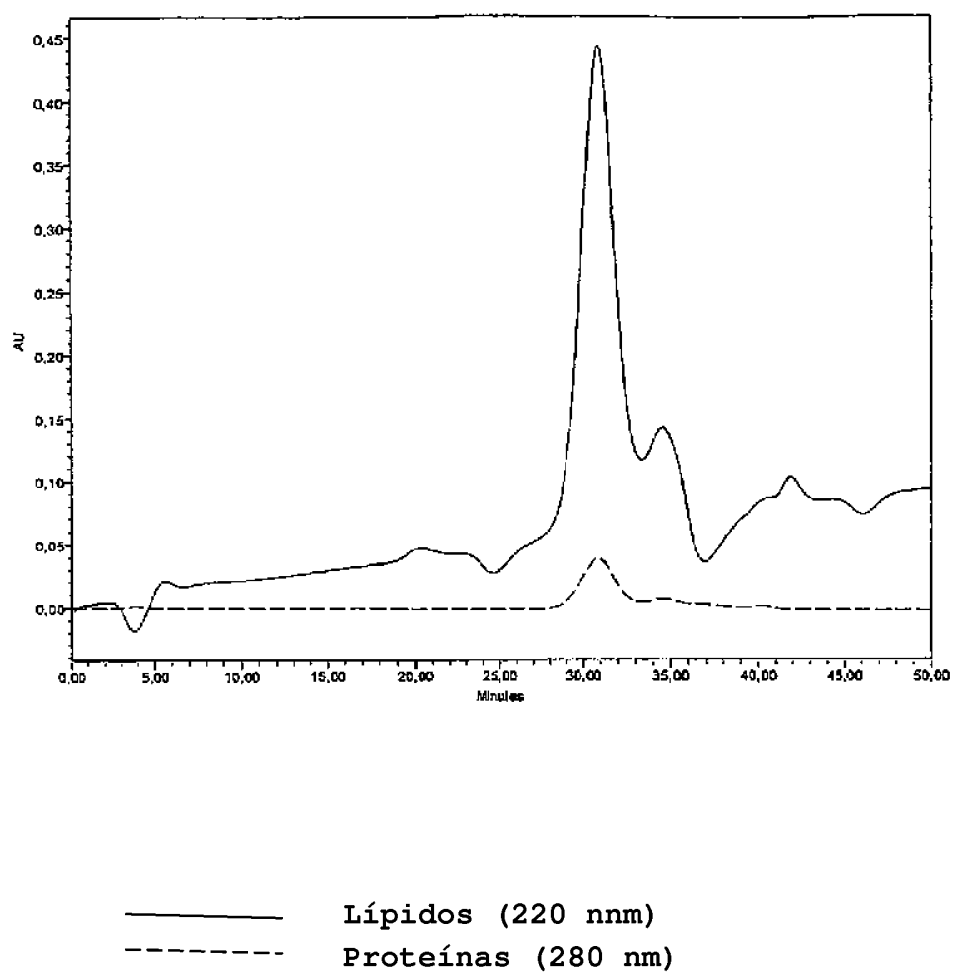


FIG. 2

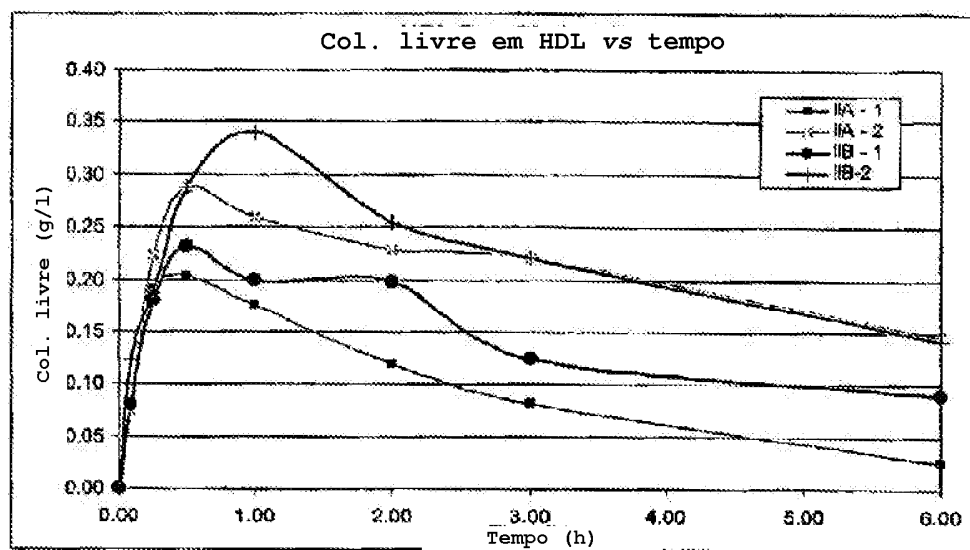


FIG. 3

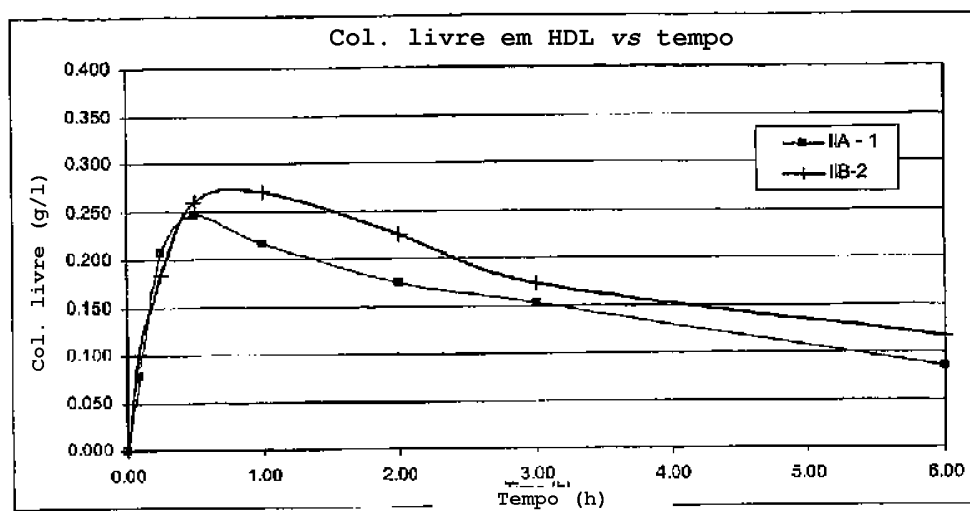


FIG. 4



European Patent Office
80293 MUNICH
GERMANY
Tel. +49 (0)89 2399 - 0
Fax +49 (0)89 2399 - 4465



Woolley, Lindsey Claire
Mewburn Ellis LLP
33 Gutter Lane
London
EC2V 8AS
ROYAUME UNI

For any questions about
this communication:
Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date
28.02.12

Reference LCW/FP6496 103	Application No./Patent No. 06727346.6 - 2405 / 1871341
Applicant/Proprietor Cerenis Therapeutics Holding SA	

Communication

concerning the registration of amendments relating to

- ☐ a transfer (R. 22 and 85 EPC)
☒ entries pertaining to the applicant / the proprietor (R. 143(1)(f) EPC)

As requested, the entries pertaining to the applicant of the above-mentioned European patent application / to the proprietor of the above-mentioned European patent have been amended to the following:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC
NL PL PT RO SE SI SK TR
Cerenis Therapeutics Holding SA
265 rue de la Découverte
Bât. A
31670 Labège/FR

The registration of the changes has taken effect on 21.02.12.

In the case of a published application / a patent, the change will be recorded in the Register of European Patents and published in the European Patent Bulletin (Section I.12 / II.12).

Your attention is drawn to the fact that, in the case of the registration of a transfer, any automatic debit order only ceases to be effective from the date of its express revocation (cf. point 14(c) of the Arrangements for the automatic debiting procedure, Supplement to OJ EPO 3/2009).

For the Examining Division



Client Data Registration
Tel.: +49 (0)89 2399 2780