



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201240671 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：101103979

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 07 日

(51)Int. Cl.：

A61K38/00 (2006.01)

C07K14/00 (2006.01)

A61P3/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/02/07 美國

61/440,371

2011/03/14 美國

61/452,630

2011/05/17 美國

61/487,263

(71)申請人：塞勒尼斯醫療控股公司 (法國) CERENIS THERAPEUTICS HOLDING S.A. (FR)
法國

(72)發明人：達索克斯 尚 路易斯 DASSEUX, JEAN-LOUIS (FR)；歐尼修 丹妮拉 卡門
ONICIU, DANIELA CARMEN (US)；艾克曼 羅絲 ACKERMANN, ROSE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：36 項 圖式數：27 共 237 頁

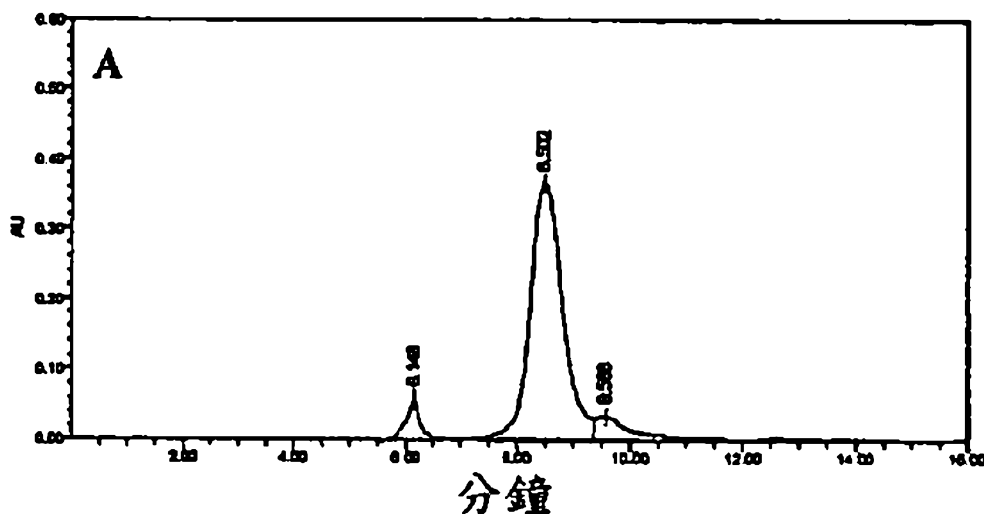
(54)名稱

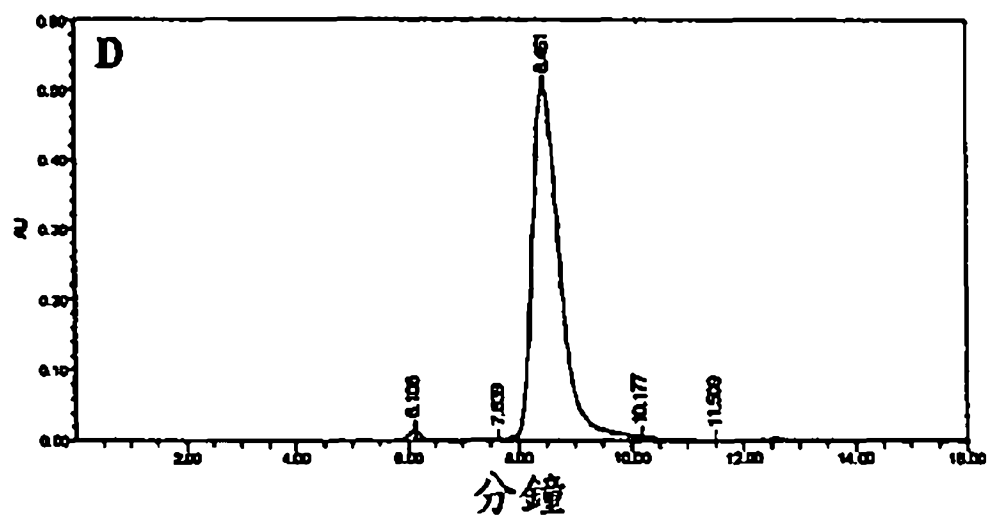
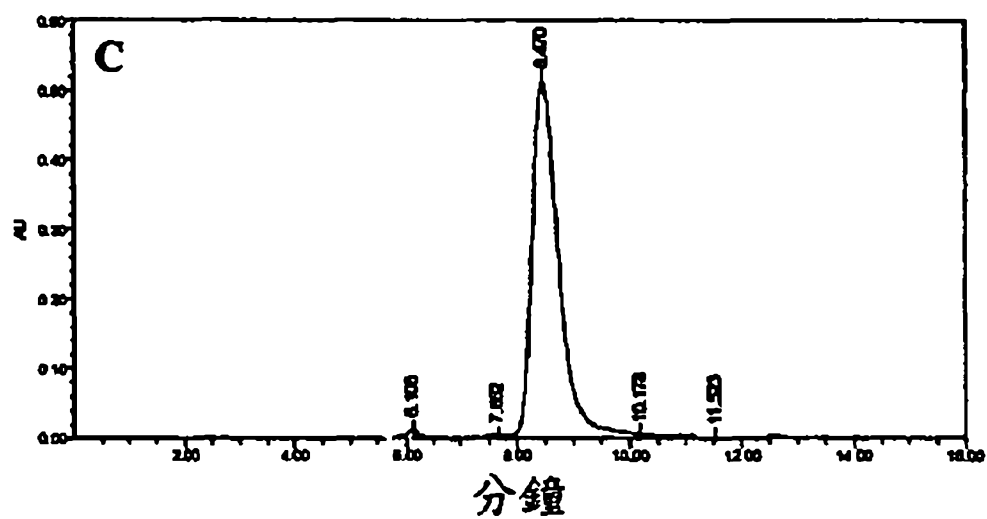
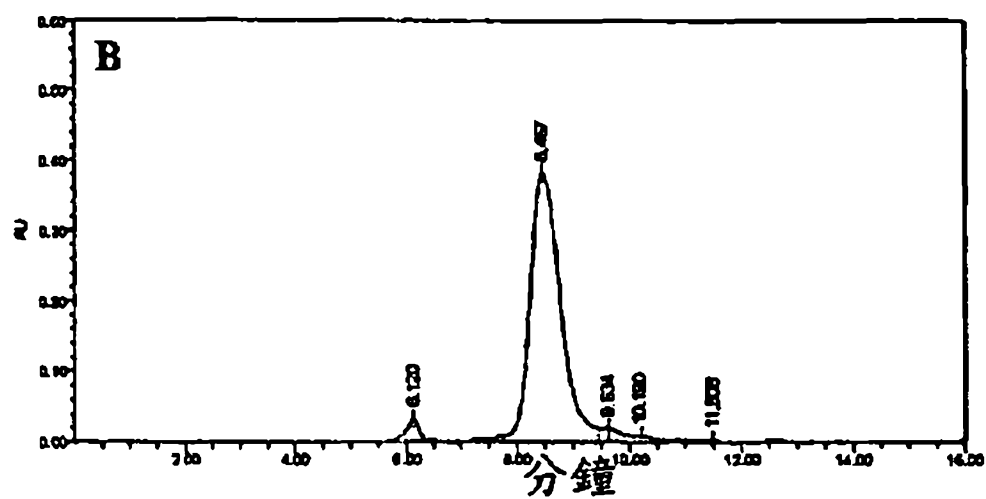
脂蛋白複合物及其製備及用途

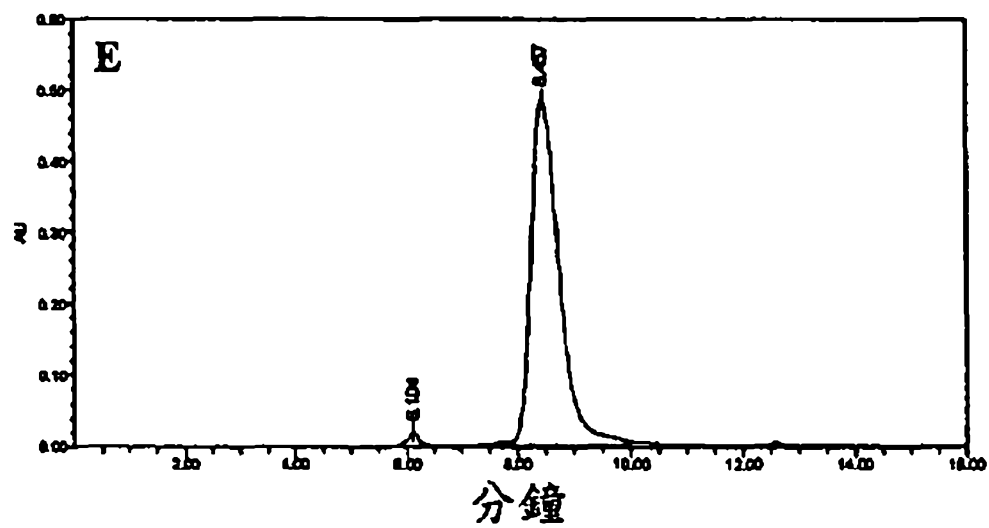
LIPOPROTEIN COMPLEXES AND MANUFACTURING AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於脂蛋白複合物及脂蛋白群體，及其於治療及/或預防脂質異常性疾病、病症及/或病狀中之用途。本發明另外係關於脂蛋白元之重組表現、脂蛋白元之純化及使用基於熱循環之方法產生脂蛋白複合物。









(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201240671 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：101103979

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 07 日

(51)Int. Cl.：

A61K38/00 (2006.01)

C07K14/00 (2006.01)

A61P3/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/02/07 美國

61/440,371

2011/03/14 美國

61/452,630

2011/05/17 美國

61/487,263

(71)申請人：塞勒尼斯醫療控股公司 (法國) CERENIS THERAPEUTICS HOLDING S.A. (FR)
法國

(72)發明人：達索克斯 尚 路易斯 DASSEUX, JEAN-LOUIS (FR)；歐尼修 丹妮拉 卡門
ONICIU, DANIELA CARMEN (US)；艾克曼 羅絲 ACKERMANN, ROSE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：36 項 圖式數：27 共 237 頁

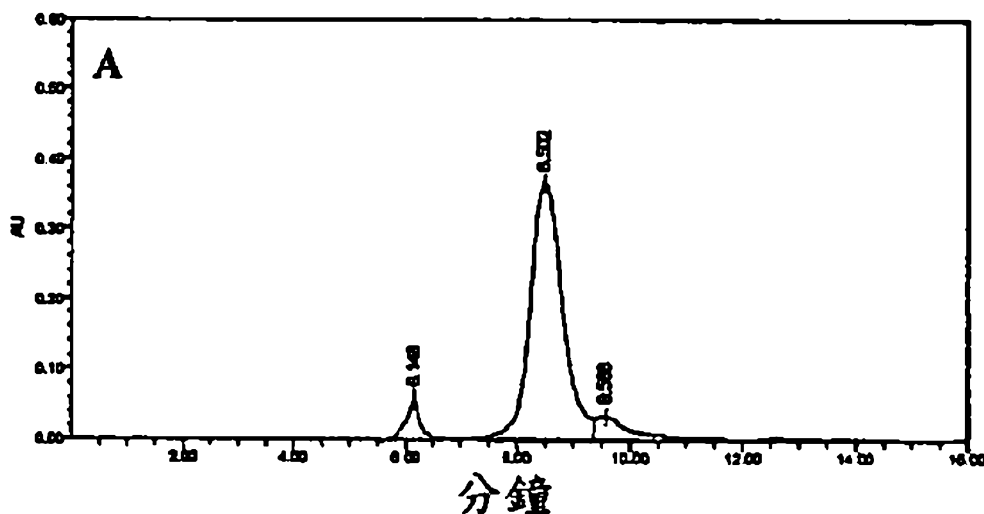
(54)名稱

脂蛋白複合物及其製備及用途

LIPOPROTEIN COMPLEXES AND MANUFACTURING AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於脂蛋白複合物及脂蛋白群體，及其於治療及/或預防脂質異常性疾病、病症及/或病狀中之用途。本發明另外係關於脂蛋白元之重組表現、脂蛋白元之純化及使用基於熱循環之方法產生脂蛋白複合物。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明提供脂蛋白複合物，包含該等複合物之醫藥組合物，產生及純化用於該等複合物之脂蛋白元之方法，製備該等複合物之方法及使用該等複合物治療或預防心血管疾病、病症及/或其相關病狀之方法。

本申請案依據35 U.S.C. § 119(e)主張2011年2月7日申請之臨時申請案第61/440,371號、2011年3月14日申請之臨時申請案第61/452,630號及2011年5月17日申請之臨時申請案第61/487,263號之權利，所有該等申請案之內容均以全文引用的方式併入本文中。

【先前技術】

3.1 概述

循環膽固醇由血漿脂蛋白載運，血漿脂蛋白為脂質與蛋白質組合物之複合粒子，其轉運血液中之脂質。以下四種主要類別之脂蛋白粒子於血漿中循環且與脂肪轉運系統有關：乳糜微粒、極低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)及高密度脂蛋白(HDL)。乳糜微粒構成腸脂肪吸收之短壽命產物。VLDL且尤其LDL負責將膽固醇自肝臟(膽固醇係於肝臟處合成或自飲食來源獲得)傳遞至肝外組織，包括動脈壁。相對比而言，HDL介導膽固醇逆轉運(RCT)，膽固醇脂質之移除，尤其自肝外組織至肝臟，膽固醇於肝臟中儲存、分解代謝、清除或再循環。HDL亦在炎症中起有益作用，其轉運氧化脂質及介白素，而氧化脂

質及介白素又可減輕血管壁中之炎症。

脂蛋白粒子具有疏水性核心，其包含膽固醇(通常呈膽固醇酯形式)及三酸甘油酯。核心由包含磷脂、未酯化膽固醇及脂蛋白元之表面包覆層圍繞。脂蛋白元介導脂質轉運且一些脂蛋白元可與脂類代謝所涉及之酶相互作用。已鑑別至少 10 種脂蛋白元，包括：ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoA-V、ApoB、ApoC-I、ApoC-II、ApoC-III、ApoD、ApoE、ApoJ及ApoH。亦發現諸如以下其他蛋白質與脂蛋白締合：LCAT(卵磷脂:膽固醇鹼基轉移酶)、CETP(膽固醇酯轉移蛋白質)、PLTP(磷脂轉移蛋白質)及PON(巴拉松酶(paraoxonase))。

心血管疾病(諸如冠心病、冠狀動脈病及動脈粥樣硬化)主要與血清膽固醇含量升高有關。舉例而言，動脈粥樣硬化為緩慢進行性疾病，其特徵在於膽固醇積聚在動脈壁內。有可靠證據表明動脈粥樣硬化病灶中沈積之脂質主要來源於血漿 LDL；因此，LDL 通常被視為「不良」膽固醇。相對比而言，HDL 血清含量與冠心病逆相關。實情為，高 HDL 血清含量被視為負風險因素。假設高血漿 HDL 含量不僅具有針對冠狀動脈病之保護性作用，且亦實際誘導動脈粥樣硬化斑消退(參見例如 Badimon 等人，1992, Circulation 86 (增刊 III):86-94；Dansky 及 Fisher, 1999, Circulation 100:1762-63；Tangirala 等人，1999, Circulation 100(17):1816-22；Fan 等人，1999, Atherosclerosis 147(1):139-45；Deckert 等人，1999, Circulation 100(11):1230-

35 ; Boisvert 等人 , 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(3):525-30 ; Benoit 等人 , 1999, *Circulation* 99(1): 105-10 ; Holvoet 等人 , 1998, *J. Clin. Invest.* 102(2):379-85 ; Duverger 等人 , 1996, *Circulation* 94(4):713-17 ; Miyazaki 等人 , 1995, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15(11):1882-88 ; Mezdoor 等人 , 1995, *Atherosclerosis* 113(2):237-46 ; Liu 等人 , 1994, *J. Lipid Res.* 35(12):2263-67 ; Plump 等人 , 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91(20): 9607-11 ; Paszty 等人 , 1994, *J. Clin. Invest.* 94(2):899-903 ; She 等人 , 1992, *Chin. Med. J. (Engl.)* 105(5):369-73 ; Rubin 等人 , 1991, *Nature* 353(6341):265-67 ; She 等人 , 1990, *Ann. NY Acad. Sci.* 598:339-51 ; Ran, 1989, *Chung Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih* (亦譯為：中華病理學雜誌) 18(4):257-61 ; Quezado 等人 , 1995, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272(2):604-11 ; Duverger 等人 , 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12):1424-29 ; Kopfler 等人 , 1994, *Circulation*; 90(3):1319-27 ; Miller 等人 , 1985, *Nature* 314(6006):109-11 ; Ha 等人 , 1992, *Biochim. Biophys. Acta* 1125(2):223-29 ; Beitz 等人 , 1992, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 47(2):149-52)。因此，HDL 通常被視為「良好」膽固醇(參見例如 Zhang, 等人 , 2003 *Circulation* 108:661-663)。

已在諸多研究中證實 HDL 之「保護性」作用(例如 Miller 等人 , 1977, *Lancet* 1(8019):965-68 ; Whayne 等人 , 1981,

Atherosclerosis 39:411-19)。在該等研究中，LDL含量升高似乎與心血管風險增加相關，而高HDL含量似乎可賦予心血管保護。活體內研究進一步證明HDL之保護性作用，表明將HDL輸注至兔體內可阻礙膽固醇誘導之動脈病變之發展(Badimon等人，1989, Lab. Invest. 60:455-61)及/或誘導其消退(Badimon等人，1990, J. Clin. Invest. 85:1234-41)。

3.2 膽固醇逆轉運、HDL及脂蛋白元A-I

膽固醇逆轉運(RCT)路徑起自大部分肝外組織清除膽固醇之作用且對保持體內大部分細胞之結構及功能起關鍵作用。RCT主要由三個步驟構成：(a)膽固醇流出，亦即最初自多種周邊細胞池移除膽固醇；(b)藉由卵磷脂:膽固醇酯基轉移酶(LCAT)作用使膽固醇酯化，防止流出之膽固醇再進入細胞中；及(c)吸收HDL-膽固醇及膽固醇酯至肝臟細胞中進行水解，接著再循環、儲存、於膽汁中排出或分解代謝為膽汁酸。

RCT中之關鍵酶LCAT係由肝臟產生且與HDL部分締合在血漿中循環。LCAT將細胞衍生之膽固醇轉化為膽固醇酯，其於指定用於移除之HDL中整合(參見Jonas 2000, Biochim. Biophys. Acta 1529(1-3):245-56)。膽固醇酯轉移蛋白質(CETP)及磷脂轉移蛋白質(PLTP)促進循環HDL群體之進一步再成型。CETP將由LCAT產生之膽固醇酯移至其他脂蛋白，尤其包含ApoB之脂蛋白，諸如VLDL及LDL。PLTP向HDL供應卵磷脂。HDL三酸甘油酯由細胞外肝甘油三酸酯脂酶分解代謝，且脂蛋白膽固醇由肝臟經若干種機

制移除。

HDL粒子之功能特徵主要由其主要脂蛋白元組分(諸如ApoA-I及ApoA-II)決定。亦觀測到少量ApoC-I、ApoC-II、ApoC-III、ApoD、ApoA-IV、ApoE及ApoJ與HDL締合。視代謝性RCT級聯或路徑期間再成型狀態而定，HDL以多種不同尺寸及上述組分之不同混合物形式存在。

每個HDL粒子通常包含至少1個ApoA-I分子且通常2至4個ApoA-I分子。HDL粒子亦可僅包含ApoE(γ -LpE粒子)，已知其亦負責膽固醇流出，如由Gerd Assmann教授描述(參見例如 von Eckardstein等人，1994, *Curr Opin Lipidol.* 5(6):404-16)。ApoA-I由肝臟及小腸合成為前原脂蛋白元A-I，其作為原脂蛋白元A-I(proApoA-I)分泌且快速裂解產生ApoA-I之血漿形式，即含有243個胺基酸之單一多肽鏈(Brewer等人，1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:623-30)。經實驗直接注射至血流中之PreproApoA-I亦裂解為ApoA-I之血漿形式(Klon等人，2000, *Biophys. J.* 79(3):1679-85；Segrest等人，2000, *Curr. Opin. Lipidol.* 11(2):105-15；Segrest等人，1999, *J. Biol. Chem.* 274 (45): 31755-58)。

ApoA-I包含6至8個由連接子部分(其通常為脯胺酸)間隔的不同的含有22個胺基酸之 α -螺旋或功能性重複單元。重複單元以兩性螺旋狀構形存在(Segrest等人，1974, *FEBS Lett.* 38: 247-53)且賦予ApoA-I之主要生物學活性，亦即脂質結合及卵磷脂膽固醇酯基轉移酶(LCAT)活化。

ApoA-I與脂質形成三種穩定複合物：小型弱脂質複合物，稱為前- β -1 HDL；包含極性脂質(磷脂及膽固醇)之扁平盤狀粒子，稱為前- β -2 HDL；及包含極性及非極性兩種脂質之球形粒子，稱為球形或成熟HDL(HDL₃及HDL₂)。循環群體中之大部分HDL包含ApoA-I及ApoA-II兩者(「AI/AII-HDL部分」)。然而，僅包含ApoA-I之HDL部分(「AI-HDL部分」)似乎在RCT中更有效。某些流行病學研究支持ApoA-I-HDL部分具有抗致動脈粥樣化作用之假設(Parra等人，1992, *Arterioscler. Thromb.* 12:701-07；Decossin等人，1997, *Eur. J. Clin. Invest.* 27:299-307)。

HDL粒子由若干粒子群體構成，其具有不同尺寸、脂質組成及脂蛋白元組成。其可根據其性質分類，包括其水合密度、脂蛋白元組成及電荷特徵。舉例而言，前- β -HDL部分之特徵在於表面電荷低於成熟 α -HDL。由於此電荷差異，前- β -HDL及成熟 α -HDL在瓊脂糖凝膠中具有不同電泳移動性(David等人，1994, *J. Biol. Chem.* 269(12):8959-8965)。

前- β -HDL及成熟 α -HDL之代謝亦不同。前- β -HDL具有兩種代謝歸宿：自血漿移除且由腎臟分解代謝，或再成型為中等尺寸HDL，其優先由肝臟降解(Lee等人，2004, *J. Lipid Res.* 45(4):716-728)。

儘管膽固醇自細胞表面轉移(亦即膽固醇流出)之機制尚未知，但咸信弱脂質複合物前- β -1 HDL為自與RCT有關之周邊組織轉移之膽固醇之較佳受體(參見Davidson等人，

1994, J. Biol. Chem. 269:22975-82 ; Bielicki 等人 , 1992, J. Lipid Res. 33:1699-1709 ; Rothblat 等人 , 1992, J. Lipid Res. 33:1091-97 ; 及 Kawano 等人 , 1993, Biochemistry 32: 5025-28 ; Kawano 等人 , 1997, Biochemistry 36:9816-25) 。
在此自細胞表面募集膽固醇之過程中 , 前- β -1 HDL 快速轉化為前- β -2 HDL 。 PLTP 可提高前- β -2 HDL 盤之形成速率 , 但缺乏指示 PLTP 於 RCT 中之作用之資料 。 LCAT 優先與盤狀、小型(前- β)及球形(亦即成熟)HDL 反應 , 將卵磷脂或其他磷脂之 2- 醯基轉移至膽固醇之游離羥基殘基以產生膽固醇酯(保留於 HDL 中)及溶血卵磷脂 。 LCAT 反應需要 ApoA-I 作為活化子 ; 亦即 ApoA-I 為 LCAT 之天然輔因子 。 HDL 中螯合之膽固醇轉化為其酯可防止膽固醇再進入細胞中 , 最終結果為自細胞移除膽固醇 。

ApoAI-HDL 部分(亦即包含 ApoA-I 但無 ApoA-II)中成熟 HDL 粒子中之膽固醇酯由肝臟移除且與來源於包含 ApoA-I 及 ApoA-II 兩者之 HDL(AI/AII-HDL 部分)的膽固醇酯相比更有效地加工至膽汁中 。 此可部分歸因於 ApoAI-HDL 與肝細胞膜更有效的結合 。 已假設存在 HDL 受體 , 且已鑑別 B 類 I 型清道夫受體 (scavenger receptor)(SR-BI) 為 HDL 受體 (Acton 等人 , 1996, Science 271:518-20 ; Xu 等人 , 1997, Lipid Res. 38:1289-98) 。 SR-BI 最主要於生成類固醇之組織(例如腎上腺)及肝臟(Landschulz 等人 , 1996, J. Clin. Invest. 98:984-95 ; Rigotti 等人 , 1996, J. Biol. Chem. 271: 33545-49)中表現 。 關於 HDL 受體之評述 , 參見 Broutin 等

人，1988, Anal. Biol. Chem. 46:16-23。

ATP結合卡匣轉運體AI進行之初始脂質化似乎對血漿HDL形成及前- β -HDL粒子實現膽固醇流出之能力具有關鍵作用(Lee及Parks, 2005, Curr. Opin. Lipidol. 16(1):19-25)。根據該等作者，此初始脂質化使前- β -HDL能夠更有效地起膽固醇受體作用且防止ApoA-I與預先存在之血漿HDL粒子快速締合，使得前- β -HDL粒子更多地用於膽固醇流出。

CETP亦在RCT中起作用。CETP活性或其受體(VLDL及LDL)之變化在HDL群體「再成型」中起作用。舉例而言，當不存在CETP時，HDL變為放大粒子，其不清除(關於RCT及HDL之評述，參見Fielding及Fielding, 1995, J. Lipid Res. 36:211-28；Barrans等人，1996, Biochem. Biophys. Acta 1300:73-85；Hirano等人，1997, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17(6):1053-59)。

HDL亦在其他脂質及非極性分子之逆轉運及去毒作用(亦即脂質自細胞、器官及組織轉運至肝臟進行分解代謝及排出)中起作用。該等脂質包括鞘磷脂(SM)、氧化脂質及溶血磷脂醯膽鹼。舉例而言，Robins及Fasulo(1997, J. Clin. Invest. 99:380-84)已證實HDL刺激肝臟將植物固醇轉運至膽汁分泌物中。

HDL之主要組分ApoA-I在活體外可與SM締合。當ApoA-I在活體外與牛腦SM(BBSM)重組時，在28°C下出現最大重組速率，該溫度與BBSM之相轉移溫度類似(Swaney, 1983,

J. Biol. Chem. 258(2), 1254-59)。當 BBSM:ApoA-I 比為 7.5:1 或 7.5:1 以下(重量/重量)時，形成單一重組均質 HDL 粒子，每個粒子包含三個 ApoA-I 分子且 BBSM:ApoA-I 莫耳比為 360:1。其在電子顯微鏡中呈現為盤狀複合物，其與由 ApoA-I 與磷脂醯膽鹼在更高的磷脂/蛋白質比下重組所獲得之複合物類似。然而，當 BBSM:ApoA-I 比為 15:1(重量/重量)時，形成直徑較大的盤狀複合物，其具有較高的磷脂:蛋白質莫耳比(535:1)。該等複合物與用磷脂醯膽鹼形成之 ApoA-I 複合物相比明顯更大、更穩定且更能抵抗變性。

早期膽固醇受體(前- β -HDL 及包含 ApoE 之 γ -遷移脂蛋白)中鞘磷脂(SM)含量升高，表明 SM 可增強該等粒子促進膽固醇流出之能力(Dass 及 Jessup, 2000, J. Pharm. Pharmacol. 52:731-61；Huang 等人，1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1834-38；Fielding 及 Fielding 1995, J. Lipid Res. 36:211-28)。

3.3 HDL 及 ApoA-I 之保護機制

HDL 之保護機制之研究集中於 HDL 之主要組分脂蛋白元 A-I(ApoA-I)。高 ApoA-I 血漿含量與不存在冠狀動脈病變或冠狀動脈病變減輕相關(Maciejko 等人，1983, N. Engl. J. Med. 309:385-89；Sedlis 等人，1986, Circulation 73:978-84)。

實驗動物中輸注 ApoA-I 或 HDL 引起顯著生物化學變化且降低動脈粥樣硬化病變之程度及嚴重性。在 Maciejko 及

Mao(1982, Arteriosclerosis 2:407a)之最初報導後，Badimon等人(1989, Lab. Invest. 60:455-61; 1989, J. Clin. Invest. 85:1234-41)發現藉由輸注HDL($d=1.063-1.325$ g/ml)，可顯著降低膽固醇餵養之兔中之動脈粥樣硬化病變程度(降低45%)及其膽固醇酯含量(降低58.5%)。其亦發現輸注HDL可引起既定病變消退達約50%。Esper等人(1987, Arteriosclerosis 7:523a)已證實輸注HDL可顯著改變患有遺傳性高膽固醇血症(其會發展成早期動脈病變)之渡邊氏兔(Watanabe rabbit)中之血漿脂蛋白組成。在該等兔中，HDL輸注可使保護性HDL與致動脈粥樣化性LDL之間的比率達加倍以上之程度。

動物模型中HDL預防動脈疾病之可能性已由ApoA-I可在活體外發揮纖維蛋白溶解活性之觀測結果進一步加強(Saku等人，1985, Thromb. Res. 39:1-8)。Ronneberger(1987, Xth Int. Congr. Pharmacol., Sydney, 990)證明ApoA-I可增加米格魯犬(beagle dog)及食蟹獼猴(Cynomologous monkey)中之纖維蛋白溶解。在活體外可注意到對人類血漿之類似活性。Ronneberger能夠證實ApoA-I處理之動物中脂質沈積及動脈斑塊形成減少。

活體外研究表明ApoA-I與卵磷脂之複合物可促進游離膽固醇自培養之動脈平滑肌細胞流出(Stein等人，1975, Biochem. Biophys. Acta, 380:106-18)。藉由此機制，HDL亦可降低該等細胞之增殖(Yoshida等人，1984, Exp. Mol Pathol. 41:258-66)。

亦證實用包含 ApoA-I 或 ApoA-I 模擬肽之 HDL 進行之輸注療法可由 ABC1 轉運體調節血漿 HDL 含量，從而產生治療心血管疾病之功效（參見例如 Brewer 等人，2004, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1755-1760）。

已分離 ApoA-I 之兩種天然存在之人類多形現象，其中精胺酸殘基經半胱胺酸取代。在脂蛋白元 A-I_M 中 (ApoA-I_M)，此取代在殘基 173 處發生，而在脂蛋白元 A-I_P 中 (ApoA-I_P) 中，此取代在殘基 151 處發生 (Franceschini 等人，1980, *J. Clin. Invest.* 66:892-900；Weisgraber 等人，1983, *J. Biol. Chem.* 258:2508-13；Bruckert 等人，1997, *Atherosclerosis* 128:121-28；Daum 等人，1999, *J. Mol. Med.* 77:614-22；Klon 等人，2000, *Biophys. J.* 79(3):1679-85)。亦已分離 ApoA-I 之另一種天然存在之人類多形現象，其中位置 144 處白胺酸經精胺酸取代。此多形現象稱為脂蛋白元 A-I 薩拉戈薩 (ApoA-I_Z) 且與重度低 α -脂蛋白血症及高密度脂蛋白 (HDL) 膽固醇逆轉運作用增強相關 (Recalde 等人，2001, *Atherosclerosis* 154(3):613-623；Fiddymment 等人，2011, *Protein Expr. Purif.* 80(1):110-116)。

包含 ApoA-I_M 或 ApoA-I_P 之二硫鍵連接之均二聚體之重組 HDL 粒子使二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼 (DMPC) 乳液澄清之能力及促進膽固醇流出之能力與包含野生型 ApoA-I 之重組 HDL 粒子類似 (Calabresi 等人，1997b, *Biochemistry* 36:12428-33；Franceschini 等人，1999, *Arterioscler.*

Thromb. Vasc. Biol. 19:1257-62; Daum等人, 1999, J. Mol. Med. 77:614-22)。在兩種突變中, 異型接合個體之HDL含量降低, 但奇怪的是, 其罹患動脈粥樣硬化之風險降低 (Franceschini等人, 1980, J. Clin. Invest. 66:892-900; Weisgraber等人, 1983, J. Biol. Chem. 258:2508-13; Bruckert等人, 1997, Atherosclerosis 128:121-28)。包含任一種變異體之重組HDL粒子均能夠進行LCAT活化, 但與包含野生型ApoA-I之重組HDL粒子相比效率較低 (Calabresi等人, 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 232:345-49; Daum等人, 1999, J. Mol. Med. 77:614-22)。

ApoA-I_M突變作為常染色體顯性特性遺傳; 已鑑別一個家族內之八代載體 (Gualandri等人, 1984, Am. J. Hum. Genet. 37:1083-97)。ApoA-I_M載體個體之狀態之特徵在於HDL-膽固醇含量顯著降低。此外, 載體個體不明顯顯示任何動脈疾病風險增加。實情為, 藉由檢驗系譜記錄, 似乎該等個體可受「保護」而免患動脈粥樣硬化 (Sirtori等人, 2001, Circulation, 103: 1949-1954; Roma等人, 1993, J. Clin. Invest. 91(4):1445-520)。

突變載體中ApoA-I_M之可能保護作用之機制似乎與突變ApoA-I_M之結構修飾(失去一個 α -螺旋及疏水性殘基暴露增加)有關 (Franceschini等人, 1985, J. Biol. Chem. 260:1632-35)。失去多個 α -螺旋之緊密結構使得分子柔順性增加, 其與正常ApoA-I相比更易於與脂質締合。此外, 脂蛋白複合物更易於發生變性, 因此表明在突變體情況下脂質傳遞

亦得到改良。

Bielicki等人(1997, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (9):1637-43)已證明ApoA-I_M與野生型ApoA-I相比募集細胞膜膽固醇之能力有限。此外，由ApoA-I_M與細胞膜脂質之締合形成之初生HDL主要為7.4 nm粒子而非由野生型ApoA-I形成的9 nm及11 nm的較大複合物。該等觀測結果表明ApoA-I一級序列中之Arg₁₇₃→Cys₁₇₃取代干擾細胞膽固醇募集及初生HDL組合的正常過程。突變與自細胞移除膽固醇之效率降低顯著相關。因此其抗動脈粥樣硬化性質可能與RCT無關。

由Arg₁₇₃→Cys₁₇₃取代引起之最驚人的結構變化為ApoA-I_M之二聚化(Bielicki等人，1997, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (9):1637-43)。ApoA-I_M可與自身形成均二聚體且可與ApoA-II形成雜二聚體。包含脂蛋白元混合物之血液部分之研究表明循環中存在二聚體及複合物可使得脂蛋白元之清除半衰期延長。已在突變載體之臨床研究中觀測到該延長清除半衰期(Gregg等人，1988, NATO ARW on Human Apolipoprotein Mutants: From Gene Structure to Phenotypic Expression, Limone S G)。其他研究表明ApoA-I_M二聚體(ApoA-I_M/ApoA-I_M)在活體外充當HDL粒子之相互轉化中之抑制因子(Franceschini等人，1990, *J. Biol. Chem.* 265:12224-31)。

3.4 血脂異常及相關病症之當前療法

脂質異常性病症為與血清膽固醇及三酸甘油酯含量升高

及血清HDL:LDL比較低有關之疾病且包括高脂質血症，尤其為高膽固醇血症、冠心病、冠狀動脈病、血管及血管周圍疾病及心血管疾病，諸如動脈粥樣硬化。亦包括由動脈血流不足引起之與動脈粥樣硬化相關之症候群，諸如短暫性缺血性發作或間歇性跛行。當前存在多種療法可用於降低與脂質異常性病變相關之血清膽固醇及三酸甘油酯升高。然而，各療法在功效、副作用及適用之患者群體方面均具有其自身缺陷及限制。

膽汁酸結合樹脂為一類藥物，其中斷膽汁酸自腸至肝臟之再循環；例如消膽胺(cholestyramine)(Questran Light®, Bristol-Myers Squibb)、鹽酸考來替潑(colestipol hydrochloride)(Colestid®, The Upjohn Company)及鹽酸考來維倫(colesevelam hydrochloride)(Welchol®, Daiichi-Sankyo Company)。當經口使用時，該等帶正電荷之樹脂結合於腸中帶負電荷的膽汁酸。因為樹脂不能自腸中吸收，所以其載運著膽汁酸與其一起排出。然而，使用該等樹脂最多僅能使血清膽固醇含量降低約20%且與胃腸副作用(包括便秘及某些維生素缺乏症)相關。此外，因為樹脂結合其他藥物，所以必須在攝取樹脂前至少1小時或攝取樹脂後4至6小時使用其他口服藥物；因此使心臟患者之藥物治療方案複雜化。

士他汀(Statin)為降膽固醇藥劑，其藉由抑制HMGCoA還原酶(其為與膽固醇生物合成路徑有關之關鍵酶)來阻斷膽固醇合成。士他汀(例如洛伐他汀(lovastatin)(Mevacor®)、

辛伐他汀(simvastatin)(Zocor®)、普伐他汀(pravastatin)(Pravachol®)、氟伐他汀(fluvastatin)(Lescol®)及阿托伐他汀(atorvastatin)(Lipitor®))有時與膽汁酸結合樹脂組合使用。士他汀顯著降低血清膽固醇及LDL血清含量且減緩冠狀動脈粥樣硬化進程。然而，血清HDL膽固醇含量僅適度增加。降LDL作用之機制可能涉及降低VLDL濃度及誘導LDL受體之細胞表現兩者，引起LDL之產生降低及/或分解代謝增加。副作用(包括肝及腎功能障礙)與使用該等藥物相關(The Physicians Desk Reference，第56版，2002, Medical Economics)。

菸酸(菸鹼酸)為水溶性維生素B複合物，其用作膳食補充劑及抗高血脂劑。菸酸減少VLDL之產生且有效降低LDL。在一些情況下，其與膽汁酸結合樹脂組合使用。當以充足劑量使用時，菸酸可增加HDL，然而，其有效性受到在該等高劑量下使用時之嚴重副作用的限制。Niaspan®為一種緩釋菸酸形式，其與純菸酸相比產生較少副作用。菸酸/洛伐他汀(Nicostatin®)為含有菸酸及洛伐他汀兩者且組合各藥物之益處的調配物。

纖維酸酯為一類降脂質藥物，其用於治療各種形式之高脂質血症(亦即血清三酸甘油酯升高)，其可能亦與高膽固醇血症相關。纖維酸酯似乎降低VLDL部分且適度增加HDL，然而該等藥物對血清膽固醇之作用可變化。在美國，已批准纖維酸酯(諸如氯貝丁酯(clofibrate)(Atromid-S®)、非諾貝特(fenofibrate)(Tricor®)及苯紫貝特

(bezafibrate)(Bezalip®))用作降血脂藥物，但尚未獲准用作高膽固醇血症藥劑。舉例而言，氟貝丁酯為降血脂劑，其(經由未知機制)起作用以藉由降低VLDL部分來降低血清三酸甘油酯。儘管可降低某些患者亞群中之血清膽固醇，但對藥物之生物化學反應可變化，且並非總可預測哪些患者將獲得有利結果。未證實Atromid-S®可有效預防冠心病。化學及藥理學相關藥物吉非羅齊(gemfibrozil)(Lopid®)為脂質調節劑，其適度減少血清三酸甘油酯及VLDL膽固醇，且適度增加HDL膽固醇(HDL₂及HDL₃子部分)以及ApoA-I及A-II兩者(亦即AT/AMT-HDL部分)。然而，脂質反應不同，尤其在患者群體中。此外，儘管在無冠心病史或現有冠心病症狀之40-55週歲男性患者中觀測到對冠心病之預防作用，但尚不清楚該等發現可以何種程度推延至其他患者群體(例如婦女、較大年齡及較年輕的男性)。實情為，在已罹患冠心病之患者中未觀測到功效。嚴重副作用與使用纖維酸酯相關，包括毒性，諸如惡性病(尤其胃腸癌)、膽囊疾病及非冠狀動脈致死率增加。

口服雌激素替代療法可考慮用於停經後婦女之中度高膽固醇血症。然而，HDL增加可伴有三酸甘油酯增加。當然，雌激素治療限於特定患者群體(停經後婦女)且與嚴重副作用相關，包括誘發惡性贅生物、膽囊疾病、血栓栓塞性疾病、肝腺瘤、血壓升高、葡萄糖不耐及高鈣血症。

適用於治療高脂質血症之其他藥劑包括依折麥布

(ezetimibe)(Zetia®; Merck)，其阻斷或抑制膽固醇吸收。然而，已證實依折麥布抑制劑呈現某些毒性。

HDL以及與磷脂複合之ApoA-I之重組形式可充當非極性或兩性分子(例如膽固醇及衍生物(氧固醇、氧化固醇、植物固醇等)、膽固醇酯、磷脂及衍生物(氧化磷脂)、三酸甘油酯、氧化產物及脂多醣)之吸收劑(sink)/清除劑(參見例如 Casas 等人，1995, J. Surg. Res. Nov 59(5):544-52)。HDL亦可充當TNF- α 及其他淋巴介質之清除劑。HDL亦可充當人類血清巴拉松酶(例如PON-1、PON-2、PON-3)之載體。巴拉松酶(與HDL相關之酯酶)對保護細胞組分免於氧化具有重要作用。LDL之氧化(其在氧化應力期間發生)似乎與動脈粥樣硬化之發展直接相關(Aviram, 2000, Free Radic. Res. 33增刊: S85-97)。巴拉松酶似乎在對動脈粥樣硬化及心血管疾病之易感性中起作用(Aviram, 1999, Mol. Med. Today 5(9):381-86)。人類血清巴拉松酶(PON-1)結合於高密度脂蛋白(HDL)。其活性與動脈粥樣硬化逆相關。PON-1使有機磷酸酯水解且可藉由抑制HDL及低密度脂蛋白(LDL)之氧化來保護免患動脈粥樣硬化(Aviram, 1999, Mol. Med. Today 5(9):381-86)。實驗研究表明此保護作用與PON-1使氧化脂蛋白中特定脂質過氧化物水解之能力有關。保留或增強PON-1活性之介入可有助於延緩動脈粥樣硬化及冠心病發作。

HDL另外具有作為抗血栓形成劑及纖維蛋白原減少劑以及作為出血性休克藥劑之作用(Cockerill等人，WO

01/13939, 2001年3月1日公開)。已證實HDL且尤其ApoA-I有助於由敗血症產生之脂多醣交換至包含ApoA-I之脂質粒子中，從而引起脂多醣之功能性中和(Wright等人，WO 9534289, 1995年12月21日公開；Wright等人，1999年7月27日頒予之美國專利第5,928,624號；Wright等人，1999年8月3日頒予之美國專利第5,932,536號)。

存在多種方法可用於活體外製備脂蛋白複合物。美國專利第6,287,590號及第6,455,088號揭示需要於有機溶劑(或溶劑混合物)中共同凍乾脂蛋白元及脂質溶液且在凍乾粉末之水合作用期間形成帶電荷之脂蛋白複合物之方法。亦可藉由清潔劑透析方法形成脂蛋白複合物；例如透析脂質、脂蛋白及清潔劑(諸如膽酸鹽)之混合物且重組形成複合物(參見例如Jonas等人，1986, Methods Enzymol. 128:553-82)。美國公開案2004/0067873之實例1揭示膽酸鹽分散方法，其中脂質分散液與膽酸鹽在形成微胞之條件下組合，且該等微胞又與脂蛋白元溶液一起培育以形成複合物。最終，必需移除膽酸鹽(其具有毒性)，例如藉由透析、超濾或吸附吸收至親和性珠粒或樹脂上。美國專利第6,306,433號揭示藉由使蛋白質與脂質之流體混合物經高壓均質化來形成脂蛋白複合物。然而，對高剪力敏感之蛋白質在暴露於高壓均質化時會喪失活性。

因此，現行製備方法引起起始物質浪費，諸如蛋白質降解，及/或需要純化所得產物，諸如移除毒性劑，且因此效率較低且昂貴。此外，脂蛋白複合物製劑可為異質的，

其含有尺寸及組成不同的複合物之混合物。參見例如美國專利第5,876,968號。因此，需要開發用於產生脂蛋白複合物之新穎方法，其有效且產生較均質的複合物(較佳具有高純度)。該等製程可實現較經濟的大規模生產，同時產生由污染物引起之副作用之風險較低的較均一的醫藥學上可接受之產物。

此外，考慮到總生產率較低且重組性表現之蛋白質之培養物中存在蛋白質降解，ApoA-I、ApoA-I_M、ApoA-I_P及其他變異體以及重組HDL之治療用途目前仍因治療性投藥需要大量脂蛋白元及蛋白質生產成本而受限制(參見例如 Mallory 等人，1987, J. Biol. Chem. 262(9):4241-4247；Schmidt 等人，1997, Protein Expression & Purification 10:226-236)。早期臨床試驗已提出對於治療心血管疾病每次輸注的劑量範圍介於1.5-4 g蛋白質之間。完全治療所需之輸注次數尚未知(參見例如 Eriksson 等人，1999, Circulation 100(6):594-98；Carlson, 1995, Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 5:85-91；Nanjee 等人，2000, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20(9):2148-55；Nanjee 等人，1999, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19(4):979-89；Nanjee 等人，1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(9):1203-14)。

重組人類ApoA-I已於異源主體中表現，然而，成熟蛋白質之產率不足以用於大規模治療應用，尤其當與純化方法偶合時，純化方法會進一步降低產率且產生不純產物。

Weinberg等人，1988, J. Lipid Research 29:819-824描述藉由逆相高壓液相層析自人類血漿純化之脂蛋白元A-I、A-II及A-IV以及其同功異型物之分離。

WO 2009/025754描述來自人類血漿之 α -1-抗胰蛋白酶及ApoA-I之蛋白質分離及純化。

Hunter等人，2009, Biotechnol. Prog. 25(2):446-453描述於大腸桿菌(E. coli)中重組表現之ApoA-I米蘭變異體之大規模純化。

Caparon等人，2009, Biotechnol. And Bioeng. 105(2):239-249描述ApoA-I米蘭變異體自大腸桿菌主體之表現及純化，該大腸桿菌主體經遺傳工程改造以刪除兩個宿主細胞蛋白質從而降低經純化之脂蛋白元產物中該等蛋白質之含量。

美國專利第6,090,921號描述使用陰離子交換層析自含有ApoA-I及ApoE之人類血漿部分純化ApoA-I或脂蛋白元E(ApoE)。

Brewer等人，1986, Meth. Enzymol. 128:223-246描述使用層析技術自人類血液分離及表徵脂蛋白元。

Weisweiler等人，1987, Clinica Chimica Acta 169:249-254描述使用快速蛋白質液相層析自人類HDL分離ApoA-I及ApoA-II。

deSilva等人，1990, J. Biol. Chem. 265(24):14292-14297描述藉由免疫親和層析及逆相高效液相層析純化脂蛋白元J。

當前正研發脂蛋白及脂蛋白複合物以供臨床使用且臨床研究使用不同的基於脂蛋白之藥劑確定脂蛋白療法之可行性 (Tardif, 2010, *Journal of Clinical Lipidology* 4:399-404)。一種研究評估自體去脂化 HDL(Waksman 等人, 2010, *J Am. Coll. Cardiol.* 55:2727-2735)。另一研究評估 ETC-216, 其為重組 ApoA-I_M 與軟脂醯基-油醯基-PC(POPC)之複合物(Nissen等人, 2003, *JAMA* 290:2292-2300)。CSL-111為與大豆磷脂醯膽鹼(SBPC)複合之自血漿純化之重組人類 ApoA-I(Tardif等人, 2007, *JAMA* 297:1675-1682)。當前探索之藥物展示降低動脈粥樣硬化斑之功效, 但該作用伴有副作用, 諸如轉胺酶增加或形成 ApoA-I抗體(Nanjee等人, 1999, *Arterioscler. Vasc. Throm. Biol.* 19:979-89; Nissen等人, 2003, *JAMA* 290:2292-2300; Spieker等人, 2002, *Circulation* 105:1399-1402; Nieuwdorp等人, 2004, *Diabetologia* 51:1081-4; Drew等人, 2009, *Circulation* 119, 2103-11; Shaw等人, 2008, *Circ. Res.* 103:1084-91; Tardiff等人, 2007, *JAMA* 297:1675-1682; Waksman, 2008, *Circulation* 118:S 371; Cho, 美國專利第 7,273,849 B2號, 2007年9月25日頒予)。舉例而言, ERASE臨床試驗(Tardiff等人, 2007, *JAMA* 297:1675-1682)利用兩種 CSL-111劑量: 40 mg ApoA-I/kg及 80 mg ApoA-I/kg。80 mg/kg劑量組由於肝毒性(如由重度轉胺酶升高所示)而必需停止。甚至在40 mg/kg劑量組中, 若干患者亦出現轉胺酶升高。

因此需要更安全的更有效降低血清膽固醇、增加HDL血清含量、預防及/或治療血脂異常及/或血脂異常相關疾病、病狀及/或病症的藥物。此項技術中需要與肝毒性無關且較佳僅誘導最小(或不誘導)三酸甘油酯、LDL-三酸甘油酯或VLDL-三酸甘油酯增加之脂蛋白調配物，以及可用於可靠地以商業化規模製備該等脂蛋白調配物之穩定產生方法。

【發明內容】

本發明提供包含蛋白質部分(例如脂蛋白元部分)及脂質部分之脂蛋白複合物及其群體，其尤其適用於治療及/或預防血脂異常及血脂異常相關疾病、病症及/或病狀。已發現如本文中所描述之具有較高純度及/或均質性及/或包含特定脂質與蛋白質比之複合物群體移動膽固醇之能力增加且副作用風險降低。

脂蛋白複合物包含蛋白質部分(例如脂蛋白元部分)及脂質部分(例如磷脂部分)。蛋白質部分包括一或多種脂質結合蛋白質，諸如脂蛋白元、肽或脂蛋白元肽類似物或模擬物，其當存在於脂蛋白複合物中時能夠移動膽固醇。該等脂蛋白元及脂蛋白元肽之非限制性實例包括前原脂蛋白元、preproApoA I、proApoA-I、ApoA-I、preproApoA-II、proApoA-II、ApoA-II、preproApoA-IV、proApoA-IV、ApoA-IV、ApoA-V、preproApoE、proApoE、ApoE、preproApoA-I_M、proApoA-I_M、ApoA-I_M、preproApoA-I_P、proApoA-I_P、ApoA-I_P、preproApoA-I_Z、proApoA-I_Z及

ApoA-I₂。脂蛋白元可呈單體、二聚體或三聚物或其混合物形式。在一特定實施例中，脂蛋白元部分基本上由ApoA-I組成，最佳由單一同功異型物組成。脂蛋白複合物中之ApoA-I可與對應於SEQ ID NO:1之胺基酸25至267之蛋白質具有至少90%或至少95%序列一致性。ApoA-I視情況在對應於SEQ ID NO:1之全長ApoA-I胺基酸25(及成熟蛋白質之位置1)之位置處進一步包含天冬胺酸。較佳至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95% ApoA-I為正確加工之成熟蛋白質(亦即缺乏信號及前肽序列)且未經氧化、脫鹽胺化及/或截短。

本發明亦提供經工程改造以表現ApoA-I之哺乳動物宿主細胞，包含ApoA-I之細胞培養物及產生具生物學活性之成熟ApoA-I之方法。已發現可工程改造哺乳動物宿主細胞以表現大量成熟ApoA-I，其實質上不含由蛋白酶降解產生之未成熟ApoA-I(proApoA-I)及ApoA-I之截短形式。該等結果令人驚訝。首先，可預期用於蛋白質加工之宿主細胞機構受異源蛋白質(諸如ApoA-I)之過表現制約，從而產生未加工之未成熟蛋白質。其次，分泌至培養基中之ApoA-I經蛋白酶降解，但在培養基中僅觀測到少量截短之ApoA-I。哺乳動物宿主細胞、細胞培養物及產生ApoA-I之方法尤其適於以商業化相關量生產適用於治療應用之成熟蛋白質。

如本文中提供，哺乳動物宿主細胞經工程改造以表現如下蛋白質，該蛋白質較佳包含與SEQ ID NO:1之位置25至267具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少

99%或100%一致性的胺基酸序列(或由與SEQ ID NO:1之位置25至267具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致性的胺基酸序列組成)。蛋白質較佳在對應於SEQ ID NO:1之位置25之位置處具有天冬胺酸殘基。哺乳動物宿主細胞可視情況進一步分泌該蛋白質。在一些情況下，由哺乳動物宿主細胞表現及/或分泌之蛋白質可進一步包含具有18個胺基酸之信號序列(MKAAVLTLAVLFLTGSQA，SEQ ID NO:2)及/或具有6個胺基酸之前肽序列(RHFWQQ，SEQ ID NO:3)。在一些情況下，宿主細胞經工程改造以表現如下蛋白質，該蛋白質包含與SEQ ID NO:1具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致性的胺基酸序列。

宿主細胞可來自任何哺乳動物細胞株，包括(但不限於)中國倉鼠卵巢(例如CHO-K1或CHO-S)、VERO、BHK、BHK 570、HeLa、COS-1、COS-7、MDCK、293、3T3、PC12及W138，或來自骨髓瘤細胞或細胞株(例如鼠類骨髓瘤細胞或細胞株)。

哺乳動物宿主細胞可進一步含有多個編碼ApoA-I蛋白質(例如包含SEQ ID NO:1之位置25至267或由SEQ ID NO:1之位置25至267組成之蛋白質)之核酸之複本。舉例而言，哺乳動物宿主細胞可含有至少約5、6、7、8個或8個以上複本且至多約10、11、12、13或14個核酸複本。核酸可進一步可操作地連接於能夠在哺乳動物宿主細胞中高度表現該蛋白質之啟動子，諸如猿細胞巨大病毒啟動子，或更特定

言之即刻早期猿細胞巨大病毒啟動子。

哺乳動物宿主細胞較佳能夠產生至少約0.5、1、2或3 g ApoA-I/L培養物及/或至多約20 g ApoA-I/L培養物，例如多達4、5、6、7、8、9、10、12或15 g ApoA-I/L培養物。培養物可為約150 mL至約500 L、1000 L、2000 L、5000 L、10,000 L、25,000 L或50,000 L或50,000 L以上範圍內之任何規模。在不同實施例中，培養物體積可在10 L至50 L、50 L至100 L、100 L至150 L、150 L至200 L、200 L至300 L、300 L至500 L、500 L至1000 L、1000 L至1500 L、1500 L至2000 L、2000 L至3000 L、3000 L至5000 L、5000 L至7500 L、7500 L至10,000 L、10,000 L至20,000 L、20,000 L至40,000 L、30,000 L至50,000 L範圍內。在一些情況下，培養物為大規模培養物，諸如15 L、20 L、25 L、30 L、50 L、100 L、200 L、300 L、500 L、1000 L、5000 L、10,000 L、15,000 L、20,000 L、25,000 L、至多50,000 L或50,000 L以上。

本發明之哺乳動物宿主細胞可於培養物中生長。因此，本發明進一步提供哺乳動物細胞培養物，其包含複數個如上文或以下章節6.1.2中所描述之哺乳動物宿主細胞。細胞培養物可包括一或多個以下特徵：(a)培養物(其視情況為至少10公升、至少20公升、至少30公升、至少50公升、至少100公升、300公升、500公升、1000公升、5000公升、10,000公升、15,000公升、20,000公升、25,000公升、至多50,000公升之大批量培養物，或至少10公升、至少20公

升、至少30公升、至少50公升、至少100公升、300公升、500公升、1000公升、5000公升或至多10,000公升之連續培養物)包含至少約0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 g/L或4.0 g/L以上成熟ApoA-I蛋白質，該成熟ApoA-I蛋白質包含對應於SEQ ID NO:1之胺基酸25至267的胺基序列或由對應於SEQ ID NO:1之胺基酸25至267的胺基序列組成；(b)培養基中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%蛋白質為缺乏信號序列之ApoA-I蛋白質；(c)培養基中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%蛋白質為缺乏信號序列及前肽序列之成熟ApoA-I蛋白質；及(d)至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%成熟ApoA-I未經截短、氧化或脫醯胺化。

本發明亦提供產生具生物學活性之成熟ApoA-I之方法。通常，該等方法包含在表現及分泌ApoA-I之條件下培養上文或章節6.1.2中描述之任一種哺乳動物宿主細胞。該方法可進一步包括自培養之哺乳動物宿主細胞上清液回收且視情況純化(諸如藉由以下章節6.1.3及6.1.4中揭示之方法)具生物學活性之成熟ApoA-I之步驟。

由或可由上述方法獲得之ApoA-I可進一步與脂質複合以形成如本文中所描述之脂蛋白複合物，及/或以治療有效量併入醫藥組合物中。醫藥組合物較佳為磷酸鹽緩衝溶液，其亦含有蔗糖及/或甘露醇作為賦形劑。

進一步發現藉由使用新穎的層析與過濾步驟組合純化

ApoA-I，可產生大量純 ApoA-I，其所含之宿主細胞蛋白質、宿主細胞 DNA、內毒素及蛋白質之截短形式之量足夠低從而可賦予一或多種屬性，包括副作用風險降低及低毒性或無毒性，使得蛋白質尤其適用於治療用途。由本文中所述之方法純化之 ApoA-I 較佳於哺乳動物細胞中以重組方式產生且分泌至生長培養基中。因此，本發明係關於純化 ApoA-I 之方法，其包含以下步驟：(a)使含有 ApoA-I 之溶液與陰離子交換基質在使 ApoA-I 不結合於基質之條件下接觸；(b)使步驟(a)中所獲得之含有 ApoA-I 之溶液經具有足以移除病毒或病毒粒子之孔徑的薄膜過濾；(c)使步驟(b)中所獲得之濾液在使 ApoA-I 結合於基質之條件下通過第一逆相層析管柱；(d)使用遞增濃度之有機溶劑之梯度自第一逆相層析基質溶離含有 ApoA-I 之第一逆相溶離液；(e)使來自步驟(d)之第一 ApoA-I 逆相溶離液在使 ApoA-I 結合於基質之條件下通過第二逆相層析管柱；及(f)使用遞增濃度之有機溶劑之梯度自第二逆相層析基質溶離含有 ApoA-I 之第二逆相溶離液。步驟進行次序並非關鍵，例如在一例示性實施例中，經薄膜過濾以移除病毒或病毒粒子之步驟係在以上步驟(f)後而非在步驟(a)後進行。

本文中亦提供由或可由本文中所描述之純化方法獲得之實質上純的 ApoA-I 產物，其中 ApoA-I 之濃度為至少 10 g/L。由本文中所描述之純化方法產生之實質上純的 ApoA-I 產物較佳包含小於約 10 pg 宿主細胞 DNA/mg ApoA-I，小於約 100 ng 宿主細胞蛋白質/mg ApoA-I 及/或小於 0.1 EU 內

毒素/mg ApoA-I。ApoA-I產物之純度可為至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

此外，實質上純的ApoA-I產物可併入本文中所描述之包含ApoA-I之任一種醫藥組合物及/或脂蛋白複合物中。

脂質部分通常包括一或多種磷脂，其可為中性、帶負電荷、帶正電荷或其組合。磷脂上之脂肪酸鏈之長度較佳為12至26個或16至26個碳且其飽和度可在飽和至單不飽和範圍內變化。例示性磷脂包括小型烷基鏈磷脂、卵磷脂醯膽鹼、大豆磷脂醯膽鹼、二軟脂醯基磷脂醯膽鹼、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼、1-肉豆蔻醯基-2-軟脂醯基磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯基-2-肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯基-2-硬脂醯基磷脂醯膽鹼、1-硬脂醯基-2-軟脂醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯乙醇胺、二月桂醯基磷脂醯甘油磷脂醯膽鹼、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯肌醇、磷脂醯甘油、二磷脂醯甘油(諸如二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油、二軟脂醯基磷脂醯甘油、二硬脂醯基磷脂醯甘油、二油醯基磷脂醯甘油)、二肉豆蔻醯基磷脂酸、二軟脂醯基磷脂酸、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺、二軟脂醯基磷脂醯乙醇胺、二肉豆蔻醯基磷脂醯絲胺酸、二軟脂醯基磷脂醯絲胺酸、腦磷脂醯絲胺酸、腦鞘磷脂、卵鞘磷脂、乳鞘磷脂、軟脂醯基鞘磷脂、植物鞘磷脂、二軟脂醯基鞘磷脂、二硬脂醯基鞘磷脂、二軟脂醯基磷脂醯甘油鹽、磷脂酸、半乳糖腦苷脂、神經節苷脂、腦苷脂、二月桂基磷脂醯膽鹼、(1,3)-D-甘

露糖基-(1,3)二甘油酯、胺基苯基醯甘、3-膽固醇基-6'-(糖硫基)己基醚糖脂及膽固醇及其衍生物。包括SM及軟脂醯基鞘磷脂之磷脂部分可視情況包括少量任何類型脂質，包括(但不限於)溶血磷脂、除軟脂醯基鞘磷脂以外的鞘磷脂、半乳糖腦苷脂、神經節苷脂、腦苷脂、甘油酯、三酸甘油酯及膽固醇及其衍生物。

脂質部分最佳含有至少一種中性磷脂及視情況一或多種帶負電荷之磷脂。在包括中性及帶負電荷兩種磷脂之脂蛋白複合物中，中性及帶負電荷之磷脂可具有碳數相同或不同且飽和度相同或不同之脂肪酸鏈。在一些情況下，中性及帶負電荷之磷脂將具有相同醯基尾部，例如C16:0，或軟脂醯基、醯基鏈。

當複合物之脂質組分包含中性及帶負電荷之磷脂或由中性及帶負電荷之磷脂組成時，中性磷脂與帶負電荷之磷脂之重量/重量(重量：重量)比較佳在約99:1至約90:10，更佳約99:1至約95:5且最佳約98:2至約96:4之重量：重量比範圍內。在一個實施例中，中性磷脂及帶負電荷之磷脂以中性磷脂與帶負電荷之磷脂之重量/重量(重量：重量)比為約97:3存在。

中性磷脂可為天然的或合成的。磷脂較佳為鞘磷脂(「SM」)，諸如軟脂醯基鞘磷脂、植物鞘磷脂、二植物鞘磷脂、鞘磷脂或鞘糖脂，其視情況具有鏈長度為16至26個碳原子之飽和或單不飽和脂肪酸。SM可來自任何來源。舉例而言，SM可自乳、卵、腦獲得或以合成方式製備。

在一特定實施例中，SM係自雞蛋獲得(「卵SM」)。在另一特定實施例中，SM為軟脂醯基鞘磷脂。

在生理學pH值下帶有至少部分負電荷之任何磷脂均可用作帶負電荷之磷脂。非限制性實例包括磷脂醯肌醇、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯甘油及磷脂酸之帶負電荷形式(例如鹽)。在一特定實施例中，帶負電荷之磷脂為1,2-二軟脂醯基-sn-甘油-3-[磷醯基-rac-(1-甘油)]或DPPG(磷脂醯甘油)。較佳鹽包括鉀鹽及鈉鹽。

用於製備本發明複合物之磷脂之純度較佳為至少95%且更佳為至少99%，及/或其氧化程度低於4毫當量氧/公斤，更佳低於3毫當量氧/公斤(例如低於2毫當量氧/公斤)。氧及脂肪酸之主要初始反應產物為氫過氧化物。使用碘滴定法，可藉由分析樣品中過氧化物之存在來量測氧化程度。

本發明之脂蛋白複合物較佳具有可形成較完全且均質之複合物的脂蛋白元與脂質比，如以下實例中所示。脂蛋白複合物之特徵在於脂蛋白元部分:脂質部分莫耳比在1:80至1:120、1:100至1:115或1:105至1:110範圍內，其中脂蛋白元以ApoA-I當量表示。在特定實施例中，脂蛋白元部分:脂質部分之莫耳比為1:80至1:90(例如1:82、1:85或1:87)、1:90至1:100(例如1:95或1:98)、1:100至1:110(例如1:105或1:108)。

在特定實施例中，尤其使用卵SM作為中性脂質之實施例中，脂蛋白元部分:脂質部分之重量比在約1:2.7至約1:3範圍內(例如1:2.7)。

本發明之脂蛋白複合物亦可用作載體以傳遞疏水性、親脂性或非極性活性劑。對於該等應用，脂質部分可進一步包括或脂蛋白複合物可載有一或多種疏水性、親脂性或非極性活性劑，包括(但不限於)脂肪酸、藥物、核酸、維生素及/或營養物。活性劑之特定實例描述於章節6.2中。

本發明亦提供脂蛋白複合物群體。通常：

- 該等群體含有複數個脂蛋白複合物，其各包含蛋白質部分及脂質部分；
- 蛋白質部分含有如上文、章節6.1或章節6.5.3中所描述之脂蛋白或脂蛋白類似物；最佳蛋白質部分包含由或可由章節6.1.2中描述之方法獲得及/或由章節6.1.4中描述之方法純化之脂蛋白(例如ApoA-I蛋白質)或基本上由該脂蛋白組成；
- 脂質部分含有如上文、章節6.2或章節6.5.2中所描述之脂質；
- 脂蛋白複合物較佳由章節6.5.4中描述之熱循環方法產生。

本發明申請人發現若干個被認為可個別地或組合促成脂蛋白複合物群體之效能及安全概況之特徵。該等特徵包括：

- 群體中複合物尺寸之均質性，主要介於4 nm與15 nm之間(例如5 nm與12 nm之間、6 nm與15 nm之間或8 nm與10 nm之間)；
- 用於製備複合物之脂蛋白元之純度(例如不含脂蛋白

元之氧化、脫醯胺化、截短及/或未成熟形式及/或不含內毒素，及/或不含除脂蛋白元以外的蛋白質(諸如宿主細胞蛋白質)及/或通常存在於重組產生過程中之宿主細胞DNA)；

- 群體中複合物本身之純度(特徵為不含污染物，諸如用於製備複合物之溶劑或清潔劑；不含氧化脂質；不含脫醯胺化、氧化或截短蛋白質；及/或未複合之脂蛋白元及/或脂質的量降低或不含未複合之脂蛋白元及/或脂質)。

該等特徵中，認為複合物之均質性及複合物中未經修飾之成熟脂蛋白元之流行率可增加效能。脂蛋白元、脂質及複合物之純度可降低副作用(諸如由肝酶(例如轉胺酶)增加所反映之肝損害)風險。此外，本發明者實現藉由使大部分脂蛋白元併入複合物中之方法來製備脂蛋白複合物群體，且未複合脂蛋白元量降低亦為有益的，因為其可降低個體中可由投與異源蛋白質引起之免疫原反應之風險。

因此，本發明提供脂蛋白複合物群體，其特徵為一或多個或甚至所有以下特徵：

- (a) 該群體中至少75重量%、至少80重量%、至少85重量%、至少90重量%或至少95重量%脂蛋白(通常為ApoA-I)呈成熟形式；
- (b) 該群體中不超過25重量%、不超過20重量%、不超過15重量%、不超過10重量%或不超過5重量%脂蛋白(通常為ApoA-I)呈未成熟形式；

- (c) 群體含有不超過100微微克、不超過50微微克、不超過25微微克、不超過10微微克或不超過5微微克宿主細胞DNA/毫克脂蛋白(通常為ApoA-I)；
- (d) 群體含有不超過500奈克、不超過200奈克、不超過100奈克、不超過50奈克或不超過20奈克宿主細胞蛋白質/毫克脂蛋白(通常為ApoA-I)；
- (e) 群體中不超過25重量%、不超過20重量%、不超過15重量%、不超過10重量%或不超過5重量%脂蛋白(通常為ApoA-I)呈截短形式；
- (f) 脂蛋白組分包含成熟ApoA-I或由成熟ApoA-I組成，且該群體中之該ApoA-I中不超過20%、不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過3%、不超過2%或不超過1%甲硫胺酸112及不超過20%、不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過3%、不超過2%或不超過1%甲硫胺酸148經氧化；
- (g) 至少80%、至少85%、至少90%或至少95%脂蛋白複合物呈4 nm至15 nm尺寸，例如6 nm至15 nm尺寸，或8至12 nm尺寸，更佳為5 nm至12 nm尺寸之粒子形式，如由凝膠滲透層析(「GPC」)或動態光散射(「DLS」)量測；
- (i) 群體含有不超過1 EU、不超過0.5 EU、不超過0.3 EU或不超過0.1 EU內毒素/毫克脂蛋白(通常為ApoA-I)；
- (j) 該群體中之該脂蛋白(通常為ApoA-I)中不超過

- 15%、不超過10%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%胺基酸經脫醯胺化；
- (k) 該等複合物中之脂質部分中不超過15重量%、不超過10重量%、不超過5重量%、不超過2重量%或0重量%脂質為膽固醇；
- (l) 群體含有不超過200 ppm、100 ppm、50 ppm非水性溶劑；
- (m) 群體不含任何清潔劑(例如膽酸鹽)；
- (n) 群體均質度可為至少80%、至少85%、至少90%或至少95%，如由凝膠滲透層析中呈單峰形式之群體的百分比量測；
- (o) 群體呈組合物形式，其中至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少97%蛋白質呈複合形式；
- (p) 該群體中不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%脂質經氧化；及
- (q) 該群體中不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%甲硫胺酸及/或色胺酸殘基經氧化。

在特定實施例中，群體具有選自以下群之特徵：

- 群 I： 以上特徵(a)、(b)及(e)；
- 群 II： 以上特徵(c)、(d)及(i)；
- 群 III： 以上特徵(f)、(j)、(e)、(p)及(q)；
- 群 IV： 以上特徵(g)、(n)及(o)；
- 群 V： 以上特徵(l)及(m)；及

群VI： 以上特徵(k)。

在某些態樣中，群體之特徵為一個或兩個獨立地選自群I及群IV各者之特徵；群體之特徵視情況為三個獨立地選自群I及群IV各者之特徵。此外，群體之特徵可為一個、兩個或三個獨立地選自群II及/或群III各者之特徵。此外，群體之特徵亦可為一個或兩個獨立地選自群V之特徵及/或一個獨立地選自群VI之特徵。

某些脂質及蛋白質組分可形成複數種不同但均質的脂蛋白複合物。因此，本發明亦提供包含兩個、三個或四個脂蛋白複合物群體之組合物，該等脂蛋白複合物包含不同量的脂蛋白元分子(例如兩個、三個或四個ApoA-I分子或ApoA-I當量)。在一例示性實施例中，組合物包含兩個脂蛋白複合物群體，分別為第一群體包含每個脂蛋白複合物具有2個ApoA-I或ApoA-I當量之脂蛋白複合物，第二群體包含每個脂蛋白複合物具有3個或4個ApoA-I或ApoA-I當量之脂蛋白複合物，且視情況選用之第三群體包含每個脂蛋白複合物具有4個或3個ApoA-I或ApoA-I當量之脂蛋白複合物。

包含兩個或兩個以上脂蛋白複合物群體之組合物較佳具有低未複合脂蛋白及/或脂質含量。因此，較佳為組合物中不超過15%、不超過12%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%脂質呈未複合形式及/或組合物中不超過15%、不超過12%、不超過10%、不

超過 9%、不超過 8%、不超過 7%、不超過 6%、不超過 5%、不超過 4%、不超過 3%、不超過 2%或不超過 1%脂蛋白呈未複合形式。

本發明提供製備脂蛋白複合物之方法。該等方法係尤其基於發現使含有未複合脂質及脂質結合蛋白質或肽之懸浮液經歷熱循環條件可在相對於其他方法(諸如藉由在固定溫度下培育組分來產生脂蛋白複合物之方法)具有有利結果之情況下形成脂蛋白複合物。

本發明提供用於製備脂蛋白複合物之熱循環方法，諸如章節 6.5.1 中描述之方法。該等方法通常包含使包含脂質粒子(「脂質組分」)及脂質結合蛋白質或肽(「蛋白質組分」)之懸浮液經複數個熱循環直至大部分蛋白質組分併入脂蛋白複合物中。該等方法通常需要使懸浮液在第一較高溫度範圍內之溫度與第二較低溫度範圍內之溫度之間循環直至形成脂蛋白複合物。熱循環製程之高溫度範圍及低溫度範圍係基於脂蛋白複合物之脂質及蛋白質組分之相轉移溫度。或者，當脂質組分不呈現確定或不連續相轉移(如在使用具有不飽和脂肪酸鏈之磷脂或磷脂混合物時會發生)時，熱循環之高溫度範圍與低溫度範圍相差至少約 20°C，至多約 40°C 或甚至 40°C 以上。舉例而言，在一些實施例中，低溫度範圍與高溫度範圍相差 20°C-30°C、20°C-40°C、20°C-50°C、30°C-40°C、30°C-50°C、25°C-45°C、35°C-55°C。

對於脂質，相轉移涉及密集、有序結構(稱為凝膠狀態)

變為鬆散、較無序結構(稱為流體狀態)。此項技術中通常藉由在接近所用特定脂質或脂質混合物之轉移溫度之溫度下培育脂質粒子及脂蛋白元來形成脂蛋白複合物。脂質組分之相轉移溫度(其可由熱量測定法測定) $\pm 12^{\circ}\text{C}$ (更佳 $\pm 10^{\circ}\text{C}$)表示本發明方法之「低」溫度範圍。在某些實施例中，低溫度範圍為脂質組分之相轉移溫度 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 或 $\pm 8^{\circ}\text{C}$ 。在一個特定實施例中，低溫度範圍為低於脂質組分之相轉移溫度至少 5°C 或至少 10°C 至高於脂質組分之相轉移溫度 5°C 。

對於蛋白質，相轉移溫度涉及三級結構變為二級結構。蛋白質組分之相轉移溫度 $\pm 12^{\circ}\text{C}$ (更佳 $\pm 10^{\circ}\text{C}$)表示本發明方法之「高」溫度範圍。在特定實施例中，高溫度範圍為蛋白質組分之相轉移溫度 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 或 $\pm 8^{\circ}\text{C}$ 。在一個特定實施例中，低溫度範圍為低於蛋白質組分之相轉移溫度 10°C 至高於蛋白質組分之相轉移溫度不超過 5°C 、不超過 10°C 或不超過 15°C 。

起始懸浮液(亦即未經熱循環之懸浮液)之脂質組分較佳包含脂質粒子，例如主要包含未與脂質結合蛋白質複合之脂質。脂質組分之組成通常如以下章節6.5.2中所描述。

起始懸浮液之蛋白質組分較佳含有未與脂質複合之脂質結合肽及/或蛋白質，或以為所需複合物中之蛋白質/肽與脂質之比率的至少5倍(例如至少5倍、至少10倍或至少20倍)的蛋白質/肽與脂質之比率與脂質組合。蛋白質組分之組成通常如以下章節6.1及章節6.5.3中所描述。蛋白質組

分較佳係根據章節6.1.2中描述之方法製備及/或根據章節6.1.3或6.1.4中描述之方法純化。

在本發明之方法中，含有蛋白質組分及脂質組分之懸浮液通常在高溫度範圍與低溫度範圍之間熱循環(較佳在高溫度範圍內之溫度下開始)直至形成脂蛋白複合物。使用適量脂質及蛋白質組分(例如美國專利公開案第2006-0217312 A1號中所描述，其內容以全文引用的方式併入本文中)，可在若干次循環後實現脂質與蛋白質組分之實質上完全複合。適用於熱循環方法之蛋白質及脂質化學計量之其他細節描述於章節6.5.4中。

由該等方法產生之複合物通常為呈微胞、微脂粒、球狀或盤狀粒子形狀之超分子組合體，其中蛋白質組分在特定化學計量範圍下且以均質粒徑分佈實體上結合於脂質組分。本發明方法有利地使得起始懸浮液中脂質及/或蛋白質之實質上完全複合，產生實質上不含游離脂質及/或游離蛋白質之組合物，如由分離方法(諸如層析)觀測。因此，本發明方法可在無純化步驟下進行。

起始懸浮液中之脂質組分通常呈粒子形式。粒子尺寸較佳主要為至少45 nm、至少50 nm、至少55 nm或至少60 nm至至多65 nm、至多70 nm、至多75 nm、至多80 nm、至多100 nm、至多120 nm、至多150 nm、至多200 nm、至多250 nm、至多300 nm、至多500 nm範圍內，例如在45 nm至100 nm或45 nm至250 nm尺寸範圍內，更佳在50 nm至90 nm尺寸範圍內且最佳在55 nm至75 nm尺寸範圍內。在一

較佳實施例中，脂質粒子主要包含卵鞘磷脂且其尺寸為55至75 nm。在另一較佳實施例中，脂質粒子主要包含一或多種合成鞘磷脂(例如軟脂醯基鞘磷脂或植物鞘磷脂)且其尺寸為175 nm至250 nm。在又一較佳實施例中，脂質粒子主要包含一或多種合成脂質(例如軟脂醯基鞘磷脂或植物鞘磷脂)且其尺寸為250 nm至1000 nm。在又一較佳實施例中，脂質粒子主要包含一或多種合成脂質(例如軟脂醯基鞘磷脂或植物鞘磷脂)且其尺寸為1000 nm至4000 nm。本文中尺寸稱為 $\xi(Z)$ 平均尺寸，如由動態光散射測定。高壓均質化(例如微流體化)有利地產生合適尺寸之脂質粒子。其他用於形成粒子之方法揭示於以下章節6.5.2中且可用作均質化之替代方法。若該等方法產生不屬於較佳尺寸範圍內之粒子，則粒子可經尺寸過濾以獲得合適尺寸粒子。

本文中所描述之製備脂蛋白複合物之方法有利地產生粒徑分佈均質之複合物，從而無需進行尺寸份化。此外，本發明之方法使起始蛋白質實質上完全併入(例如至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%)脂蛋白粒子中。因此，本發明提供包含脂蛋白複合物之組合物且其中該組合物中至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%脂質結合蛋白質與脂質複合，例如使用凝膠滲透層析測定。在特定實施例中，本發明提供包含脂蛋白複合物之組合物，該等脂蛋白複合物具有4 nm至20 nm ξ 平均尺寸，例如4 nm至20 nm ξ 平均尺寸、4 nm至15 nm ξ 平均尺寸、4 nm至12 nm ξ 平均尺寸、5 nm至15 nm ξ 平均尺寸、5

nm至12 nm ξ 平均尺寸、5 nm至10 nm ξ 平均尺寸、5 nm至20 nm ξ 平均尺寸、6 nm至15 nm ξ 平均尺寸或8 nm至12 nm ξ 平均尺寸，且其中該組合物中至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%脂質結合蛋白質與脂質複合，例如使用凝膠滲透層析測定。根據本文中所描述之方法使脂質粒子與脂蛋白一起經熱循環通常產生4 nm至15 nm尺寸脂蛋白粒子群體，例如6 nm至15 nm尺寸、5 nm至12 nm尺寸或8 nm至12 nm尺寸脂蛋白粒子群體。經熱循環之脂質粒子之尺寸可在50 nm至250 nm範圍內。在一較佳實施例中，脂質粒子主要包含卵鞘磷脂且其尺寸為55至75 nm。在另一較佳實施例中，脂質粒子主要包含一或多種合成鞘磷脂(例如植物鞘磷脂)且其尺寸為175 nm至250 nm。

製備脂蛋白複合物之方法中之一或多個步驟可在惰性氣體下進行。由此可減少或防止脂蛋白元及/或脂質之氧化，藉此降低副作用(諸如肝損傷)風險。合適惰性氣體包括氮氣、氬氣及氫氣。

由或可由上述方法獲得之脂蛋白複合物尤其適用於治療用途，因為在形成複合物後無需進一步純化步驟。

本發明亦提供脂蛋白複合物群體，及包含如本文中所描述之脂蛋白複合物或其群體且可視情況包括一或多種醫藥學上可接受之載劑、賦形劑及/或稀釋劑的醫藥組合物。在一些實施例中，醫藥組合物以適用於投藥之單位劑量封裝。舉例而言，在一些實施例中，組合物包含封裝於密封小瓶中之單位劑量之乾燥(例如凍乾)脂蛋白複合物。該等

組合物適於用水、生理溶液(諸如鹽水)或緩衝液復原且經由注射投與。該等組合物可視情況包括一或多種防結塊劑及/或抗聚結劑以促進帶電荷複合物之復原，或包括一或多種經設計以調節復原懸浮液之pH值、重量莫耳滲透濃度及/或鹽度之緩衝劑、等滲劑(例如蔗糖及/或甘露醇)、糖或鹽(例如氯化鈉)。上述脂蛋白複合物群體及/或醫藥組合物可在使氧化最少之條件下製備，藉此降低由氧化產物引起之副作用(諸如肝損傷)風險。舉例而言，可在惰性氣體(諸如氮氣、氬氣或氦氣)下製備醫藥組合物。

對於商業化應用，適於製備脂蛋白複合物及醫藥組合物之大規模製劑。因此，本發明亦提供至少1 L、2 L、5 L或10 L且至多15 L、20 L、30 L、50 L或50 L以上之製劑(例如5 L至30 L、10 L至15 L或30 L至50 L之製劑)，其包含足以使脂質結合蛋白質之濃度為至少約3 mg/mL、至少約4 mg/mL或至少約5 mg/mL且至多約10 mg/mL、約15 mg/mL或約20 mg/mL(較佳在約8 mg/mL至至約12 mg/mL範圍內，最佳為約8 mg/mL)之量的脂蛋白複合物。在一特定實施例中，製劑體積為15 L至25 L且含有約100 g至約250 g ApoA-I。在另一特定實施例中，製劑體積為30 L至50 L且含有約240 g至約780 g ApoA-I。

本文中所描述之脂蛋白複合物適用於治療動物(最佳為人類)之脂質異常性病徵。該等病狀包括(但不限於)高脂質血症且尤其為高膽固醇血症(包括異種接合子家族性高膽固醇血症及同種接合子家族性高膽固醇血症)，及心血管

疾病，諸如動脈粥樣硬化(包括治療及預防動脈粥樣硬化)及動脈粥樣硬化之各種臨床症狀，諸如中風、缺血性中風、短暫性缺血性發作、心肌梗塞、急性冠狀動脈症候群、心絞痛、間歇性跛行、嚴重肢體缺血、瓣膜狹窄及主動脈瓣硬化；再狹窄(例如預防或治療因醫療程序(諸如氣囊血管成形術)而發展之動脈粥樣硬化斑)；及其他病症，諸如內毒血症，其通常引起敗血性休克。

已發現本文中所描述之脂蛋白複合物及組合物在以低於迄今研究之其他脂蛋白複合物所用劑量之劑量投與時實現及/或促進膽固醇流出。參見例如 Spieker 等人，2002, *Circulation* 105:1399-1402(使用 80 mg/kg 劑量)；Nissen 等人，2003, *JAMA* 290:2292-2300(使用 15 mg/kg 或 40 mg/kg 劑量)；Tardif 等人，2007 *JAMA* 297:1675-1682(使用 40 mg/kg 至 80 mg/kg 劑量)，使用 15 mg/kg 至 80 mg/kg 範圍內之劑量。此外，已發現本文中所描述之脂蛋白複合物之副作用降低。如以下實例中所示，已發現本發明之脂蛋白複合物在低至 2 mg/kg 之劑量下有效移動膽固醇，且與先前投與人類患者之脂蛋白複合物形成對比，其不顯著提高三酸甘油酯、VLDL 及肝酶(諸如轉胺酶)含量(參見 Nanjee 等人，1999, *Arterioscler. Vasc. Throm. Biol.* 19:979-89)。此外，在具有正常肝及/或腎功能之正常個體中，即使在劑量增至約 15 mg/kg(無三酸甘油酯升高)或甚至高達 45 mg/kg(無轉胺酶增加)時仍觀測到副作用降低。因此，較佳在具有正常肝功能、正常腎功能或其兩者之個體中評估

本發明複合物在無副作用下投與之能力。

不受理論約束，本發明者將本發明之脂蛋白複合物之效益歸因於與先前療法相比更均質之複合物粒徑分佈及降低量之受損蛋白質及/或脂質(例如氧化蛋白質、脫醯胺化蛋白質及氧化脂質)。此外咸信包含脂質部分之帶負電荷之磷脂將賦予本文中所描述之複合物及組合物以與習知脂蛋白複合物相比改良之治療性質。小型盤狀前- β HDL粒子(其於腎中降解)與大型盤狀及/或球形HDL(其由肝識別，該HDL之膽固醇於肝中儲存、再循環、代謝(以膽汁酸形式)或清除(於膽汁中))之間的關鍵差異之一為粒子電荷。小型盤狀前- β HDL粒子之負表面電荷低於帶負電荷之大型盤狀及/或球形HDL粒子。咸信較高負電荷為引起粒子經肝臟識別之因素之一，且因此避免粒子經腎臟分解代謝。此外，已證實腎不易於吸收帶電荷粒子(參見Hacker等人，2009, **Pharmacology: Principles and Practice**, 183)。因此，部分歸因於帶電荷磷脂之存在，咸信本文中所描述之帶負電荷之脂蛋白複合物及組合物與習知脂蛋白複合物相比滯留於循環中之時間更長，或電荷將以電荷依賴性方式影響脂蛋白之半衰期。預期其較長循環(滯留)時間以及負電荷所引起之複合物與現有HDL聚集及融合之速率及/或程度降低將促進膽固醇移動(藉由給予複合物更多的時間以聚積膽固醇)及酯化(藉由給予LCAT更多的時間以催化酯化反應)。電荷亦可提高膽固醇捕捉及/或移除速率，藉此促進更大量地移除膽固醇。因此，預期本文中所描述之

帶負電荷之脂蛋白複合物及組合物將提供優於習知脂蛋白療法之治療效益，因為將需要投與較少複合物及/或組合物且在較不通常之情況下，副作用降低。

因此，本文中提供之方法通常涉及向個體投與治療有效量之本文中所描述之脂蛋白複合物、脂蛋白複合物群體或醫藥組合物以治療或預防脂質異常性病徵。脂蛋白複合物可以每次注射約0.25 mg/kg ApoA-I當量至約45 mg/kg範圍內之劑量(例如約0.5 mg/kg至約30 mg/kg或約1 mg/kg ApoA-I當量至約15 mg/kg ApoA-I當量之劑量)投與。可藉由選擇使三酸甘油酯、VLDL-膽固醇及/或VLDL-三酸甘油酯之含量增加最小之劑量來進一步調節劑量以適於接受治療之個體。在特定實施例中，劑量為約3 mg/kg、約6 mg/kg或約12 mg/kg。

該等方法進一步包含以5至14天或6至12天範圍內之時間間隔(諸如1週或2週之時間間隔)投與脂蛋白複合物。該等方法可進一步包含以任一上述時間間隔且較佳以1週時間間隔投與脂蛋白複合物4、5、6、7、8、9、10、11、12或至多52次。對於慢性病狀，可投與52次以上。舉例而言，在一個實施例中，投與脂蛋白複合物6次，各次投藥之間間隔1週。視情況可在該等方法之前進行初始誘導期，在此期間更頻繁地投與脂蛋白複合物。

複合物及/或其醫藥組合物可非經腸(例如靜脈內)投與。可以輸注形式經約1至約24小時，或約1至4小時、約0.5至2小時或約1小時範圍內之時間進行靜脈內投藥。

以下實例展示投與30 mg/kg及45 mg/kg劑量後三酸甘油酯含量小幅增加，其由高度膽固醇移動引起之VLDL及LDL增加來解釋。可在治療期間控制該等參數，如其在醫院實驗室中藉由標準脂質檢查(lipid panel)來常規量測。基於以下實例，可視患者對藥品之反應選擇劑量以使三酸甘油酯及VLDL-膽固醇及VLDL-三酸甘油酯含量增加最小，從而實現個別化類型藥品。

複合物及/或組合物可單獨投與(作為單一藥物療法)，或其可與適用於治療及/或預防血脂異常及/或其相關病狀、疾病及/或病症之其他治療劑組合投與。可與本文中所描述之帶負電荷之脂蛋白複合物及組合物組合投與之治療劑之非限制性實例包括膽汁酸結合樹脂、HMG CoA-還原酶抑制劑(士他汀)、菸酸、樹脂、膽固醇吸收抑制劑、血小板凝集抑制劑、纖維酸酯、抗凝血劑、CETP抑制劑(例如安特普(anacetrapib)及達特普(dalcetrapib))及/或PCSKG抗體或配位體。

【實施方式】

本發明提供脂蛋白複合物、其群體以及製備該等脂蛋白複合物之方法。該等複合物及其群體及組合物(例如醫藥組合物)尤其適用於治療及/或預防血脂異常及/或血脂異常相關疾病、病症及/或病狀。如「發明內容」章節中論述，脂蛋白複合物包含兩個主要部分，脂蛋白元部分及磷脂部分(較佳呈規定重量或莫耳比)，且較佳包括指定量之中性磷脂及視情況選用之一或多種帶負電荷之磷脂。

6.1 蛋白質部分

本發明提供脂蛋白複合物，其包含蛋白質部分。此外，本發明提供製備脂蛋白複合物之方法。脂蛋白複合物之蛋白質組分並非本發明方法成功之關鍵。幾乎任何可提供治療及/或預防效益之脂質結合蛋白質，諸如脂蛋白元及/或其衍生物或類似物均可包括於複合物中。此外，與脂質締合時可活化LCAT或形成盤狀粒子之任何 α -螺旋肽或肽類似物，或任何「模擬」脂蛋白元(諸如ApoA-I)活性之其他類型之分子均可包括於脂蛋白複合物中且為術語「脂質結合蛋白質」所涵蓋。

6.1.1 脂質結合蛋白質

此外，本發明提供純化以重組方式產生之蛋白質(例如用於製備脂蛋白複合物)之方法。以重組方式產生之蛋白質最佳為脂蛋白元。合適蛋白質包括脂蛋白元ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoA-V及ApoE；較佳為成熟形式。脂質結合蛋白質亦為上述脂蛋白元之活性多晶型物、同功異型物、變異體及突變體以及截短形式，其中最常見為脂蛋白元A-I_{乳脂}(ApoA-I_M)、脂蛋白元A-I_{乳脂}(ApoA-I_P)及脂蛋白元A-I_{脂乳脂}(ApoA-I_Z)。含有半胱胺酸殘基之脂蛋白元突變體亦已知且亦可使用(參見例如美國公開案第2003/0181372號)。脂蛋白元可呈單體或二聚體形式，二聚體可為均二聚體或雜二聚體。舉例而言，可使用ApoA-I(Duverger等人，1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(12):1424-29)、ApoA-I_M(Franceschini等人，1985, J.

Biol. Chem. 260:1632-35)、ApoA-_{IP}(Daum等人, 1999, J. Mol. Med. 77:614-22)、ApoA-II(Shelness等人, 1985, J. Biol. Chem. 260(14):8637-46; Shelness等人, 1984, J. Biol. Chem. 259(15):9929-35)、ApoA-IV(Duverger等人, 1991, Euro. J. Biochem. 201(2):373-83)、ApoE(McLean等人, 1983, J. Biol. Chem. 258(14):8993-9000)、ApoJ及ApoH之均二聚體及雜二聚體(可行情況下)。脂蛋白元可包括對應於促進其分離之元件(諸如His標籤)或其他經設計用於其他目的之元件的殘基, 只要脂蛋白元在包括於複合物中時保留某些生物活性即可。

如此項技術中熟知, 該等脂蛋白元可自動物來源(且尤其自人類來源)純化或以重組方式產生, 參見例如Chung等人, 1980, J. Lipid Res. 21(3):284-91; Cheung等人, 1987, J. Lipid Res. 28(8):913-29。亦參見美國專利第5,059,528號、第5,128,318號、第6,617,134號; 美國公開案第20002/0156007號、第2004/0067873號、第2004/0077541號及第2004/0266660號; 及PCT公開案第WO/2008/104890號及第WO/2007/023476號。亦可使用其他純化方法, 例如以下章節6.1.3及6.1.4中描述之方法。

相當於脂蛋白元之肽及肽類似物以及模擬ApoA-I、ApoA-I_M、ApoA-II、ApoA-IV及ApoE之活性之促效劑(其適用作本文中所描述之複合物及組合物中之脂蛋白元)之非限制性實例揭示於美國專利第6,004,925號、第6,037,323號及第6,046,166號(頒予Dasseux等人); 美國專利第

5,840,688號(頒予Tso)；美國公開案第2004/0266671號、第2004/0254120號、第2003/0171277號及第2003/0045460號(頒予Fogelman)；美國公開案第2003/0087819號(頒予Bielicki)及PCT公開案第WO/2010/093918號(頒予Dasseux等人)中，其揭示內容以全文引用的方式併入本文中。該等肽及肽類似物可包含L-胺基酸或D-胺基酸或L-胺基酸與D-胺基酸之混合物。其亦可包括一或多種非肽或醯胺鍵，諸如一或多種熟知肽/醯胺電子等排體。該等「肽及/或肽模擬劑」脂蛋白元可使用此項技術中已知的用於肽合成之任何技術合成或製備，包括例如美國專利第6,004,925號、第6,037,323號及第6,046,166號中描述之技術。

複合物可包括單一類型之脂質結合蛋白質或兩種或兩種以上不同脂質結合蛋白質(其可來源於相同或不同物種)之混合物。儘管並非必需，但脂蛋白複合物將較佳包含來源於或胺基酸序列對應於所治療之動物物種的脂質結合蛋白質以避免誘發對療法之免疫反應。因此，對於治療人類患者，本發明複合物中較佳使用人類來源之脂質結合蛋白質。使用肽模擬脂蛋白元亦可降低或避免免疫反應。

在某些較佳實施例中，脂質結合蛋白質為胺基酸序列與成熟人類ApoA-I蛋白質具有至少95%序列一致性的蛋白質，例如具有對應於SEQ ID NO:1之位置25至267之胺基酸序列的蛋白質。在某些實施例中，成熟人類ApoA-I蛋白質之胺基酸序列與SEQ ID NO:1之位置25至267具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性。在一些

實施例中，成熟人類 ApoA-I 蛋白質之胺基酸序列在位置 1(亦即對應於 SEQ ID NO:1 之位置 25 之位置)處具有天冬胺酸。在一特定實施例中，成熟人類 ApoA-I 蛋白質具有對應於 SEQ ID NO:1 之位置 25 至 267 之胺基酸序列。在一較佳實施例中，ApoA-I 蛋白質係於哺乳動物宿主細胞(最佳為中國倉鼠卵巢(「CHO」)細胞)中以重組方式產生，如以下子章節中所描述。

6.1.2 脂蛋白元之重組表現

本發明提供用於產生脂質結合蛋白質(諸如 ApoA-I)之重組表現方法，及相關核酸、哺乳動物宿主細胞、細胞培養物。所得重組脂質結合蛋白質可經純化及/或併入本文中所描述之脂蛋白複合物中。

通常，對於重組產生，將編碼脂質結合蛋白質或肽之聚核苷酸序列插入適當表現運載體中，亦即含有插入之編碼序列之轉錄及轉譯所必需之元件或在 RNA 病毒載體情況下，複製及轉譯所必需之元件的載體。表現載體可來源於病毒，諸如腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒、反轉錄病毒或慢病毒。接著將表現運載體轉染至合適目標細胞中，該細胞將表現蛋白質或肽。合適宿主細胞包括(但不限於)細菌物種、哺乳動物或昆蟲宿主細胞系統，包括桿狀病毒系統(參見例如 Luckow 等人，Bio/Technology, 6, 47 (1988))，及培養細胞株(established cell line)，諸如 293、COS-7、C127、3T3、CHO、HeLa、BHK 等。視所用表現系統而定，接著藉由此項技術中之公認程序分離表現之肽。用於

重組蛋白質及肽產生之方法在此項技術中熟知(參見例如 Sambrook 等人, 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; 及 Ausubel 等人, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 其均以全文引用的方式併入本文中)。

當 ApoA-I 為脂質結合蛋白質時, ApoA-I 蛋白質自編碼 ApoA-I 之重組核苷酸序列表現。在一些實施例中, 編碼 ApoA-I 之核苷酸序列為人類核苷酸序列。人類 ApoA-I 核苷酸序列之非限制性實例揭示於美國專利第 5,876,968 號; 第 5,643,757 號; 及第 5,990,081 號, 及 WO 96/37608 中; 其揭示內容以全文引用的方式併入本文中。在某些實施例中, 核苷酸序列編碼成熟 ApoA-I 蛋白質之胺基酸序列(較佳可操作地連接於用於自宿主細胞分泌 ApoA-I 之信號順序(例如 SEQ ID NO:1 之胺基酸 1-18)及/或原蛋白質序列(例如 SEQ ID NO:1 之胺基酸 19-25))。其他適用於引導 ApoA-I 之分泌之信號順序可與 ApoA-I 異源(例如人類白蛋白信號肽或人類 IL-2 信號肽)或與 ApoA-I 同源。

核苷酸序列較佳編碼成熟人類 ApoA-I 多肽, 例如其中胺基酸序列與對應於 SEQ ID NO:1 之位置 25 至 267 之胺基酸序列具有至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 一致性的多肽, 視情況其中胺基酸序列在位置 25 處包含天冬胺酸。在一較佳實施例中, 核苷酸序列編碼具有 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列之多肽。核苷酸序列亦可編碼

其中胺基酸序列與 GenBank 寄存編號 NP_000030、AAB59514、P02647、CAA30377、AAA51746 或 AAH05380.1 中之一者所闡述之人類 ApoA-I 蛋白質之胺基酸序列具有至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 一致性的多肽，視情況該胺基酸序列在對應於成熟人類 ApoA-I 蛋白質之第一胺基酸之位置處包含天冬胺酸。

編碼 ApoA-I 之聚核苷酸可經密碼子最佳化以用於在重組宿主細胞中表現。較佳宿主細胞為哺乳動物宿主細胞，包括(但不限於)中國倉鼠卵巢細胞(例如 CHO-K1；ATCC 編號 CCL 61；CHO-S(GIBCO Life Technologies Inc., Rockville, MD，目錄號 #11619012))、VERO 細胞、BHK(ATCC 編號 CRL 1632)、BHK 570(ATCC 編號 CRL 10314)、HeLa 細胞、COS-1(ATCC 編號 CRL 1650)、COS-7(ATCC 編號 CRL 1651)、MDCK 細胞、293 細胞(ATCC 編號 CRL 1573；Graham 等人，J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977)、3T3 細胞、骨髓瘤細胞(尤其鼠類)、PC12 細胞及 W138 細胞。在某些實施例中，哺乳動物細胞(諸如 CHO-S 細胞(Invitrogen™, Carlsbad CA))適合於在無血清培養基中生長。其他合適細胞株在此項技術中已知且可自公用寄存中心(諸如美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)(Manassas, Va)獲得。

對於 ApoA-I 之重組表現，編碼 ApoA-I 之聚核苷酸可操作地連接於調節 ApoA-I 於相關宿主細胞中之表現的一或多個控制序列(例如啟動子或終止子)。控制序列對 ApoA-I 編碼

序列而言可為原生或外來的，且對表現ApoA-I之宿主細胞而言亦可為原生或外來的。控制序列包括(但不限於)啟動子、核糖體結合位點、前導子(leader)、聚腺苷酸化序列、前肽序列、信號肽序列及轉錄終止子。在一些實施例中，控制序列包括啟動子、核糖體結合位點及轉錄及轉譯停止信號。控制序列亦可包括一或多個連接子以達成引入促進控制序列與編碼ApoA-I之核苷酸序列之編碼區域接合之特定限制位點的目的。

促使ApoA-I重組表現之啟動子可為組成性啟動子、調節性啟動子或誘導性啟動子。合適啟動子序列可自編碼細胞外或細胞內多肽之基因獲得，該等多肽對宿主細胞而言可為內源或異源的。用於分離、鑑別及操作不同強度之啟動子之方法可自此項技術中獲得或容易地自此項技術修改。參見例如 Nevoigt 等人 (2006) Appl. Environ. Microbiol. 72:5266-5273，其揭示內容以全文引用的方式併入本文中。

一或多個控制序列可來源於病毒來源。舉例而言，在某些態樣中，啟動子來源於多瘤病毒或腺病毒主要晚期啟動子。在其他態樣中，啟動子來源於猿猴病毒40(Simian Virus 40, SV40)，其可以亦含有SV40病毒複製起點之片段形式獲得(Fiers等人，1978, Nature, 273:113-120)，或來源於細胞巨大病毒，例如猿猴細胞巨大病毒立即早期啟動子(參見美國專利第4,956,288號)。其他合適啟動子包括來源於金屬硫蛋白基因之啟動子(參見美國專利第4,579,821

號及第4,601,978號)。

本文中亦提供重組ApoA-I表現載體。重組表現載體可為可由重組DNA技術操作以促進異源ApoA-I於重組宿主細胞中表現的任何載體，例如質體或病毒。表現載體可整合至重組宿主細胞之染色體中且包含一或多個可操作地連接於一或多個適用於產生ApoA-I之控制序列之異源基因。在其他實施例中，表現載體為染色體外複製型DNA分子，例如線性或閉環質體，發現其具有低複本數(例如約1至約10個複本/基因組當量)或高複本數(例如超過約10個複本/基因組當量)。在多種實施例中，表現載體包括選擇性標記，諸如賦予包含該載體之重組宿主有機物以抗生素抗性(例如安比西林(ampicillin)抗性、卡那黴素(kanamycin)抗性、氯黴素(chloramphenicol)抗性或四環素(tetracycline)抗性)之基因。在特定態樣中，DNA構築體、載體及聚核苷酸適用於在哺乳動物細胞中表現ApoA-I。用於在哺乳動物細胞中表現ApoA-I之載體可包括複製起點、啟動子及任何必需核糖體結合位點、RNA剪接位點、聚腺苷酸化位點及與宿主細胞系統相容之轉錄終止子序列。在一些態樣中，複製起點對宿主細胞而言為異源的，例如來源於病毒(例如SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV、BPV)。在其他態樣中，複製起點係由宿主細胞染色體複製機制提供。

用於將外來DNA引入哺乳動物宿主細胞中之方法、試劑及工具在此項技術中已知且包括(但不限於)磷酸鈣介導之轉染(Wigler等人，1978, Cell 14:725; Corsaro等人，1981,

Somatic Cell Genetics 7:603 ; Graham 等人 , 1973, Virology 52:456)、電穿孔(Neumann等人, 1982, EMBO J. 1:841-5)、DEAE-聚葡萄糖介導之轉染(Ausubel等人(編), Short Protocols in Molecular Biology, 第3版(John Wiley & Sons 1995))及脂質體介導之轉染(Hawley-Nelson等人, 1993, Focus 15:73; Ciccarone等人, 1993, Focus 15:80)。

對於高產量生產, ApoA-I之穩定表現較佳。舉例而言, 在將外來DNA引入宿主細胞中後, 可使宿主細胞於富集培養基中生長1-2天, 接著換為選擇性培養基。不使用含有病毒複製起點之表現載體, 宿主細胞可用包含核苷酸序列(包含受適當表現控制元件控制之ApoA-I編碼序列)及選擇性標記之載體轉型。載體中之選擇性標記賦予針對選擇之抗性且使細胞能夠將載體穩定整合至其染色體中且生長以形成灶點(focus), 其又可經選殖且擴增至細胞株中。可使用多種選擇系統, 包括(但不限於)疱疹單純型病毒胸苷激酶(Wigler等人, 1977, Cell 11: 223)、次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(Szybalska及Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026)及腺嘌呤磷酸核糖轉移酶(Lowy等人, 1980, Cell 22: 817)基因可分別用於 tk^- 、 $hgprt^-$ 或 $aprt^-$ 細胞中。又, 抗代謝物抗性可用作藉由使用例如以下各者進行選擇之基礎: $dhfr$, 其賦予對甲胺喋呤(methotrexate)之抗性(Wigler等人, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare等人, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt , 其賦予對黴酚酸之抗性(Mulligan及

Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, 其賦予對胺基糖苷 G-418 之抗性 (Colberre-Garapin 等人, 1981, J. Mol. Biol. 150: 1); 及/或 hyg, 其賦予對潮黴素之抗性 (Santerre 等人, 1984, Gene 30: 147)。

亦可使用整合至宿主細胞基因組中之反轉錄病毒載體實現穩定、高產量表現(參見例如美國專利公開案第 2008/0286779 號及第 2004/0235173 號)。或者, 可由基因活化方法實現 ApoA-I 之穩定、高產量表現, 基因活化方法需要活化內源 ApoA-I 基因在所選哺乳動物細胞之基因組 DNA 中表現且使其進行擴增, 例如 WO 1994/012650 中所描述。增加 ApoA-I 基因(含有 ApoA-I 編碼序列及一或多個控制元件)可促進 ApoA-I 之高產量表現。表現 ApoA-I 之哺乳動物宿主細胞之 ApoA-I 基因複本指數較佳為至少 2、至少 3、至少 4 或至少 5。在特定實施例中, 表現 ApoA-I 之哺乳動物宿主細胞之 ApoA-I 基因複本指數為至少 6、至少 7、至少 8、至少 9 或至少 10。

在某些實施例中, 哺乳動物細胞適於產生至少 0.5 g/L、至少 1 g/L、至少 1.5 g/L、至少 2 g/L、至少 2.5 g/L、至少 3 g/L、至少 3.5 g/L 及視情況至多 4 g/L、至多 4.5 g/L、至多 5 g/L、至多 5.5 g/L 或至多 6 g/L 之量的 ApoA-I。哺乳動物宿主細胞較佳能夠產生至少約 0.5、1、2 或 3 g ApoA-I/L 培養物及/或至多約 20 g ApoA-I/L 培養物, 例如多達 4、5、6、7、8、9、10、12 或 15 g ApoA-I/L 培養物。

在某些實施例中, 哺乳動物細胞適合於在無血清培養基

中生長。在該等實施例中，ApoA-I係自細胞分泌。在其他實施例中，ApoA-I不自細胞分泌。

本文中提供之哺乳動物宿主細胞可用於產生ApoA-I。通常，該等方法包含在表現ApoA-I之條件下培養本文中所描述之哺乳動物宿主細胞。此外，該等方法可包含自哺乳動物細胞培養物之上清液回收並視情況純化成熟ApoA-I。

培養條件(包括培養基、溫度、pH值)可適宜於所培養之哺乳動物宿主細胞及所選培養模式(搖瓶、生物反應器、滾瓶等)。哺乳動物細胞可於大批量培養物、連續培養物或半連續培養物中生長。

本文中亦提供包含複數個本文中所描述之產生ApoA-I之哺乳動物宿主細胞的哺乳動物細胞培養物。在一些實施例中，哺乳動物細胞培養物包含至少0.5 g/L、至少1 g/L、至少1.5 g/L、至少2 g/L、至少2.5 g/L、至少3 g/L、至少3.5 g/L且視情況至多4 g/L、至多4.5 g/L、至多5 g/L、至多5.5 g/L或至多6 g/L ApoA-I。培養物可為約150 mL至約500 mL、1 L、10 L、15 L、50 L、100 L、200 L、250 L、300 L、350 L、400 L、500 L、750 L、1000 L、1500 L、2000 L、2500 L、3000 L、5000 L、7500 L、10000 L、15000 L、20000 L、25000 L、50000 L或50000 L以上範圍內的任何規模。在一些情況下，培養物為大規模培養物，諸如15 L、20 L、25 L、30 L、50 L、100 L、200 L、300 L、500 L、1000 L、5000 L、10000 L、15000 L、20000 L、25000 L、至多50000 L或50000 L以上。

6.1.3 純化脂蛋白元

本發明係關於獲得高度純化之脂蛋白元之方法，該脂蛋白元適用於製備本文中所描述之脂蛋白複合物及其組合物。該等方法可應用於任何脂蛋白元，包括(但不限於)ApoA-I、ApoA-II、ApoA-III或ApoA-IV；ApoB48及ApoB100；ApoC-I、ApoC-II、ApoC-III或ApoC-IV；ApoD；ApoE、ApoH；ApoJ。更特定言之，本發明係關於獲得高度純化之ApoA-I之方法。在一些實施例中，ApoA-I為具有選自(但不限於)Genbank寄存編號NP_000030、AAB59514、P02647、CAA30377、AAA51746及AAH05380.1所闡述之序列中之序列的人類蛋白質。在某些實施例中，ApoA-I為如以上章節6.1.2中描述之人類蛋白質。在其他實施例中，本發明之方法可用於純化自非人類動物獲得之ApoA-I(參見例如美國公開案第2004/0077541號)，例如牛、馬、綿羊、猴、狒狒、山羊、兔、犬、刺蝟、獾、小鼠、大鼠、貓、天竺鼠、倉鼠、鴨、雞、鮭魚及鰻魚(Brouillette等人，2001, *Biochim. Biophys. Acta.* 1531:4-46；Yu等人，1991, *Cell Struct. Funct.* 16(4):347-55；Chen及Albers, 1983, *Biochim Biophys Acta.* 753(1):40-6；Luo等人，1989, *J Lipid Res.* 30(11):1735-46；Blaton等人，1977, *Biochemistry* 16:2157-63；Sparrow等人，1995, *J Lipid Res.* 36(3):485-95；Beaubatie等人，1986, *J. Lipid Res.* 27:140-49；Januzzi等人，1992, *Genomics* 14(4):1081-8；Goulinet及Chapman, 1993, *J. Lipid Res.* 34(6):943-59；

Collet 等人，1997, *J Lipid Res.* 38(4):634-44；及 Frank 及 Marcel, 2000, *J. Lipid Res.* 41(6):853-72)。

可由本文中揭示之方法純化之 ApoA-I 蛋白質之實例包括 (但不限於) ApoA-I 之前原脂蛋白元形式、ApoA-I 之原體形式 (proform) 及成熟形式，及活性多晶型物、同功異型物、變異體及突變體以及截短形式，例如 ApoA-I_M、ApoA-I_Z 及 ApoA-I_P。ApoA-I_M 為 ApoA-I 之 R173C 分子變異體 (參見例如 Parolini 等人，2003, *J Biol Chem.* 278(7):4740-6；Calabresi 等人，1999, *Biochemistry* 38:16307-14；及 Calabresi 等人，1997, *Biochemistry* 36:12428-33)。ApoA-I_P 為 ApoA-I 之 R151C 分子變異體 (參見例如 Daum 等人，1999, *J Mol Med.* 77(8):614-22)。ApoA-I_Z 為 ApoA-I 之 L144R 分子變異體 (參見 Recalde 等人，2001, *Atherosclerosis* 154(3):613-623；Fiddymment 等人，2011, *Protein Expr. Purif.* 80(1):110-116)。含有半胱胺酸殘基之脂蛋白元 A-I 突變體亦已知且亦可由本文中所描述之方法純化 (參見例如美國公開案第 2003/0181372 號)。用於本文中所描述之方法中之 ApoA-I 可呈單體、均二聚體或雜二聚體形式。舉例而言，可製備之原 ApoA-I 及成熟 ApoA-I 之均二聚體及雜二聚體尤其包括 ApoA-I (Duverger 等人，1996, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16(12):1424-29)、ApoA-I_M (Franceschini 等人，1985, *J Biol Chem.* 260:1632-35) 及 ApoA-I_P (Daum 等人，1999, *J Mol Med.* 77:614-22)。

本文中所描述之純化方法可以便於熟習此項技術者之任

何規模進行。

在一些態樣中，可由本文中所描述之方法純化之ApoA-I蛋白質之胺基酸序列與SEQ ID NO:1之胺基酸25-267具有至少75%一致性、至少80%一致性、至少85%一致性、至少90%一致性、至少91%一致性、至少92%一致性、至少93%一致性、至少94%一致性、至少95%一致性、至少96%一致性、至少97%一致性、至少98%一致性、至少99%一致性或至少100%一致性。

脂蛋白元可來自任何來源，包括來自血漿或來自原核或真核細胞中之重組表現。在特定實施例中，脂蛋白元為ApoA-I，例如人類ApoA-I。在一些態樣中，ApoA-I於原核或真核宿主細胞之細胞質或周質中表現。在該等實施例中，使細胞破裂以釋放ApoA-I至上清液中，隨後純化ApoA-I。此項技術中已熟知細胞破裂方法。例示性細胞破裂方法包括(但不限於)酶促法、音波處理、清潔劑法及機械方法。在某些較佳態樣中，ApoA-I於哺乳動物細胞(較佳CHO細胞)中表現且分泌至生長培養基中。在該等實施例中，ApoA-I自澄清的無細胞培養基純化。應理解，儘管本文中結合人類ApoA-I詳細描述純化方法，但視易於由熟習此項技術者確定之特定蛋白質特徵(例如分子量、等電點、斯托克半徑(Stokes radius)、疏水性、多聚狀態等)而定，使純化條件適合於其他脂蛋白元以及非人類ApoA-I，ApoA-I或其他脂蛋白元之多晶型物、同功異型物、變異體、突變體及截短形式處於此項技術之技能範疇內。

當 ApoA-I 係自血漿製備時，其可由任何已知方法自血漿分離，包括(但不限於)冷份化製程，諸如 Cohn 等人，1946, J. Am. Chem. Soc. 68:459-475(「科恩製程(Cohn process)」)或 Oncley 等人，1949, J. Am. Chem. Soc. 71:541-550(「科恩-昂科利製程(Cohn-Oncley process)」)描述之製程。用於自血漿分離脂蛋白元之其他方法包括科恩製程及科恩-昂科利製程之變體，諸如祁斯特勒-尼斯克曼製程(Kistler-Nitschmann process)(參見 Nitschmann 等人，1954, Helv. Chim. Acta 37:866-873；Kistler 等人，1962, Vox Sang. 7:414-424)。

在該等實施例中，脂蛋白元係藉由用冷的醇(例如乙醇)自血漿中沈澱而獲得。用於血漿冷份化之其他醇包括 C1-C6 直鏈或分支鏈醇，諸如甲醇、正丙醇、異丙醇、正丁醇、第二丁醇、異丁醇及第三丁醇。在多種實施例中，可使用除醇以外的可降低蛋白質溶解度之試劑使脂蛋白元自血漿中沈澱。該等試劑包括(但不限於)醚、硫酸銨、7-乙氧基吡啶-3,9-二胺(利凡諾(rivanol))及聚乙二醇。沈澱之蛋白質可由此項技術中已知的任何方法與上清液分離，包括(但不限於)沈降、離心及過濾。

ApoA-I 可自血漿之任何含有該蛋白質之部分回收。在一些實施例中，ApoA-I 係自人類血漿之血清部分回收，該血清部分中血纖維蛋白元之量已藉由用約 8% (w/w) 乙醇沈澱而降低。在其他實施例中，脂蛋白元係自人類血漿之血清部分回收，該血清部分中其他血清蛋白(例如 β -球蛋白及 γ -

γ 球蛋白)之濃度已藉由用約25% (w/w)乙醇沈澱而降低。在其他實施例中，脂蛋白元係以沈澱形式自人類血清回收，其係藉由使乙醇濃度增加至約38%至約42% (w/w)而獲得。在一特定實施例中，藉由提高乙醇濃度至約40%，以沈澱形式自所得人類血清中回收得到脂蛋白元(科恩部分IV(Cohn's fraction IV))。可依此項技術中已知的任何方法(包括(但不限於)離心及過濾)，自血清部分回收沈澱之ApoA-I。

在一些實施例中，用於回收脂蛋白元之血漿部分之溫度應足夠低，以防止蛋白質變性。在該等實施例中，ApoA-I部分之溫度在約-10°C至約0°C範圍內，諸如約-8°C至約-2°C範圍內。在多種實施例中，用於回收ApoA-I之血漿部分之pH值在可防止蛋白質變性之範圍內。在該等實施例中，含有ApoA-I之部分之pH值在約5至約7範圍內，諸如約5.5至約6.5範圍內。

6.1.4 改良之脂蛋白純化製程

本發明申請人已發現下文描述且實例中說明之改良之純化製程，其產生成熟、完整且實質上不含污染物之脂蛋白。本文中所描述之純化方法可依便於熟習此項技術者之任何規模進行。

該等方法可應用於任何脂蛋白元，包括(但不限於)ApoA-I、ApoA-II、ApoA-III或ApoA-IV；ApoB48及ApoB100；ApoC-I、ApoC-II、ApoC-III或ApoC-IV；ApoD；ApoE、ApoH；ApoJ。更特定言之，本發明係關於

獲得高度純化之ApoA-I之方法。在一些實施例中，ApoA-I為具有選自(但不限於)Genbank寄存編號NP_000030、AAB59514、P02647、CAA30377、AAA51746及AAH05380.1所闡述之序列中之序列的人類蛋白質。在某些實施例中，ApoA-I為如以上章節6.1.2中描述之人類蛋白質。在其他實施例中，本發明之方法可用於純化自非人類動物(例如牛、馬、綿羊、猴、狒狒、山羊、兔、犬、刺蝟、獾、小鼠、大鼠、貓、天竺鼠、倉鼠、鴨、雞、鮭魚及鰻魚)獲得之ApoA-I(參見例如美國公開案第2004/0077541號)(Brouillette等人，2001, *Biochim Biophys Acta*. 1531:4-46；Yu等人，1991, *Cell Struct Funct*. 16(4):347-55；Chen及Albers, 1983, *Biochim Biophys Acta*. 753(1):40-6；Luo等人，1989, *J Lipid Res*. 30(11):1735-46；Blaton等人，1977, *Biochemistry* 16:2157-63；Sparrow等人，1995, *J Lipid Res*. 36(3):485-95；Beaubatie等人，1986, *J Lipid Res*. 27:140-49；Januzzi等人，1992, *Genomics* 14(4):1081-8；Goulinet及Chapman, 1993, *J Lipid Res*. 34(6):943-59；Collet等人，1997, *J Lipid Res*. 38(4):634-44；及Frank及Marcel, 2000, *J Lipid Res*. 41(6):853-72)。

可由本文中揭示之方法純化之ApoA-I蛋白質之實例包括(但不限於)ApoA-I之前原脂蛋白元形式、ApoA-I之原體形式及成熟形式，及活性多晶型物、同功異型物、變體及突變體以及截短形式，例如ApoA-I_M、ApoA-I_Z及ApoA-I_P。含有半胱胺酸殘基之脂蛋白元A-I突變體亦已知且亦可由

本文中所描述之方法純化(參見例如美國公開案第2003/0181372號)。用於本文中所描述之方法中之ApoA-I可呈單體、均二聚體或雜二聚體形式。舉例而言，可製備之原ApoA-I及成熟ApoA-I之均二聚體及雜二聚體尤其包括ApoA-I(Duverger等人，1996, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16(12):1424-29)、ApoA-I_M(Franceschini等人，1985, *J Biol Chem.* 260:1632-35)及ApoA-I_P(Daum等人，1999, *J Mol Med.* 77:614-22)。

在一些態樣中，可由本文中所描述之方法純化之ApoA-I蛋白質之胺基酸序列與SEQ ID NO:1之胺基酸25-267具有至少75%一致性、至少80%一致性、至少85%一致性、至少90%一致性、至少91%一致性、至少92%一致性、至少93%一致性、至少94%一致性、至少95%一致性、至少96%一致性、至少97%一致性、至少98%一致性、至少99%一致性或至少100%一致性。

脂蛋白元可來自任何來源，包括來自血漿或來自原核或真核細胞中之重組表現。在特定實施例中，脂蛋白元為ApoA-I，例如人類ApoA-I。在一些態樣中，ApoA-I於原核或真核宿主細胞之細胞質或周質中表現。在該等實施例中，使細胞破裂以釋放ApoA-I至上清液中，隨後純化ApoA-I。此項技術中已熟知細胞破裂方法。例示性細胞破裂方法包括(但不限於)酶促法、音波處理、清潔劑法及機械方法。在某些較佳態樣中，ApoA-I於哺乳動物細胞(較佳CHO細胞)中表現且分泌至生長培養基中。在該等實施

例中，ApoA-I自澄清的無細胞培養基純化。應理解，儘管本文中結合人類ApoA-I詳細描述純化方法，但視易於由熟習此項技術者確定之特定蛋白質特徵(例如分子量、等電點、斯托克半徑、疏水性、多聚狀態等)而定，使純化條件適合於其他脂蛋白元以及非人類ApoA-I，ApoA-I或其他脂蛋白元之多晶型物、同功異型物、變異體、突變體及截短形式處於此項技術之技能範疇內。

通常，純化方法包含以下步驟：(a)使含有ApoA-I之溶液與陰離子交換基質在使ApoA-I不結合於基質之條件下接觸；(b)使步驟(a)中所獲得之含有ApoA-I之溶液經具有足以移除病毒或病毒粒子之孔徑的薄膜過濾；(c)使步驟(b)中所獲得之濾液在使ApoA-I結合於基質之條件下通過第一逆相層析管柱；(d)使用遞增濃度之有機溶劑之梯度自第一逆相層析基質溶離含有ApoA-I之第一逆相溶離液；(e)使來自步驟(d)之第一ApoA-I逆相溶離液在使ApoA-I結合於基質之條件下通過第二逆相層析管柱；及(f)使用遞增濃度之有機溶劑之梯度自第二逆相層析基質溶離含有ApoA-I之第二逆相溶離液。步驟進行次序並不關鍵。如熟習此項技術者顯而易見，步驟次序可存在多種排列，一些排列描述於下文。

在某些態樣中，在步驟(a)中使含有ApoA-I之溶液與陰離子交換基質接觸之前對其進行調節。進行調節以調節蛋白質溶液之pH值使得其處於使步驟(a)中ApoA-I不結合於陰離子交換基質(亦即蛋白質不具有淨負電荷且步驟(a)以

陰性模式進行)之範圍內。在該等態樣中，含有 ApoA-I 之溶液之 pH 值為約 5 至約 7，較佳為約 5.0 至約 5.6。在特定態樣中，pH 值為約 5.1 至約 5.5。在其他態樣中，pH 值為約 5.3。可藉由添加合適酸(例如鹽酸)或鹼(例如氫氧化鈉)直至獲得所需範圍內之 pH 值來進行 pH 值調節。在一些實施例中，在調節步驟前過濾含有 ApoA-I 之溶液以移除細胞及細胞碎片。在其他實施例中，當無調節步驟時，視情況在步驟(a)之前過濾含有 ApoA-I 之溶液以移除細胞及細胞碎片。

在一些實施例中，使含有 ApoA-I 之溶液與陰離子交換基質接觸之步驟(a)係藉由使蛋白質溶液通過層析管柱來進行。在該等實施例中，管柱以約 10 cm 至約 50 cm，較佳約 10 cm 至約 30 cm 之床高度且更佳約 20 cm 之床高度填充。在某些態樣中，管柱用每公升包含約 10 g 至約 50 g(諸如約 10 g 至約 30 g，諸如約 25 g 至約 35 g) ApoA-I 之蛋白質溶液裝載。在特定實施例中，管柱用每公升包含多達約 32 g ApoA-I 之蛋白質溶液裝載。在其他實施例中，步驟(a)係以分批模式進行，亦即藉由向燒瓶中之蛋白質溶液中添加陰離子交換基質，混合足以使污染物結合於基質之時間，接著分離基質材料與蛋白質溶液，例如藉由過濾或離心。在某些實施例中，過濾蛋白質溶液以移除溶液中之粒子，隨後使蛋白質溶液與陰離子交換基質接觸。

本文中所描述之方法之步驟(a)中所用的陰離子交換基質可為此項技術中已知的任何陰離子交換基質。合適陰離子

交換基質包括(但不限於)Q-瓊脂糖凝膠FF、Q-Spherosil、DEAE-瓊脂糖凝膠FF、Q-纖維素、DEAE-纖維素及Q-Spherox。在一特定實施例中，陰離子交換基質為Q-瓊脂糖凝膠FF(GE Healthcare)。在某些態樣中，在步驟(a)中使蛋白質溶液與陰離子交換基質接觸前，使基質於pH值在上述較佳範圍內的緩衝液中平衡使得ApoA-I不結合於基質。適用於在步驟(a)之前平衡陰離子交換基質且用於進行步驟(a)之緩衝液為熟習此項技術者已知。在特定實施例中，緩衝液為TAMP A(20 mM磷酸鈉，pH 5.3)。

在多種實施例中，使用步驟(a)以使ApoA-I相對於除ApoA-I以外的蛋白質(例如宿主細胞蛋白質)、宿主細胞DNA及內毒素純化，該等除ApoA-I以外的蛋白質、宿主細胞DNA及內毒素結合於陰離子交換基質且藉此與ApoA-I分離，ApoA-I在上述pH值及鹽條件下不結合於基質。在一些態樣中，自陰離子交換步驟回收起始溶液中之ApoA-I量之至少75%、至少80%、至少85%或至少90%或90%以上。

在多種實施例中，純化方法包含步驟(b)，其中使用具有足以截獲病毒及病毒粒子之孔徑的過濾器過濾來自步驟(a)之ApoA-I溶液。視情況在以上步驟(f)之後而非步驟(a)之後進行薄膜過濾以移除病毒或病毒粒子之步驟(b)。在某些態樣中，在病毒過濾步驟(b)前藉由添加氫氧化鈉或其他合適鹼來調節來自陰離子交換基質之溶離液之pH值。來自步驟(a)之含有ApoA-I之溶液調節至約pH 7.8至約pH 8.2。在一特定態樣中，含有ApoA-I之溶液調節至約pH 8.0。步

驟(b)中所用過濾器可為具有適於截獲病毒之孔徑的任何過濾器，例如約15 nm至約75 nm之孔徑。在特定實施例中，過濾器之孔徑為約20 nm(例如Planova 20N, Asahi Kasei Medical)。熟習此項技術者應瞭解，蛋白質溶液流經病毒過濾器之流動速率由溶液性質(例如其黏度、微粒濃度等)決定。用於病毒過濾之典型流動速率為約12.5 L/h/m²，然而流動速率可調節為較高或較低以保持1巴或1巴以下之過濾器壓力。來自步驟(b)之濾液含有ApoA-I。在某些態樣中，來自病毒過濾步驟之ApoA-I回收率為來自步驟(a)之陰離子交換溶離液中之ApoA-I量之至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%或98%以上。

在特定實施例中，本文中所描述之純化方法在步驟(b)後包含步驟(c)，其中使來自步驟(b)之濾液在允許脂蛋白元A-I結合於基質之緩衝液及鹽條件下通過第一逆相層析管柱。在該等實施例中，使用遞增濃度之有機溶劑之梯度使ApoA-I相對於宿主細胞DNA、宿主細胞蛋白質、內毒素及截短形式純化。可使用此項技術中已知的多種基質進行逆相層析，包括(但不限於)基於二氧化矽、聚苯乙烯或交聯瓊脂糖之介質，其上接枝有C4至C18疏水性配位體。適用於本文中所描述之方法中之市售疏水性基質包括(但不限於)丁基瓊脂糖凝膠-FF、辛基瓊脂糖凝膠-FF、Dianon HP20ss、C18 Hypersil及Source 30 RPC。在特定實施例中，步驟(c)中所用基質為Source 30 RPC(GE Healthcare)。在某些態樣中，逆相層析管柱之床高度為約10 cm至約50

cm，諸如約10 cm至約30 cm。在一特定態樣中，逆相層析管柱之床高度為約25 cm。

在一些實施例中，來自病毒過濾步驟(b)之ApoA-I濾液以每公升約1 g至約20 g ApoA-I之濃度，諸如每公升約1.5 g至約5 g ApoA-I之濃度且更佳每公升約2.5 g至約3.5 g ApoA-I之濃度裝載於逆相管柱上。在一特定態樣中，來自步驟(b)之ApoA-I濾液以每公升約3.4 g ApoA-I之濃度裝載於逆相管柱上。可用於在裝載ApoA-I前平衡逆相管柱且確保裝載後蛋白質將結合於管柱之緩衝條件將易於由熟習此項技術者確定。管柱平衡緩衝液較佳為可使管柱pH值降低至約9.5之強緩衝液。在某些實施例中，平衡緩衝液為TAMP D(20 mM碳酸銨)。較佳，在平衡後，來自步驟(b)之含有ApoA-I之濾液(約pH 8.0)以約0.5公分/分鐘至約5.0公分/分鐘，諸如約2.0公分/分鐘至約4.0公分/分鐘之流動速率裝載於管柱上。在一特定實施例中，含有ApoA-I之濾液以約2.8公分/分鐘之流動速率裝載於管柱上。

在步驟(c)中ApoA-I結合於逆相基質後，步驟(d)中藉由暴露於緩衝液中遞增濃度之有機溶劑之梯度(諸如TAMP D緩衝液中約35%至約50%乙腈)來溶離蛋白質。在一些態樣中，可使用經約60至約90分鐘(諸如約70分鐘或更佳約80分鐘)約35%至約50%乙腈之線性梯度自管柱溶離ApoA-I。在某些態樣中，在線性梯度後用50%乙腈等度溶離約10分鐘。用於自逆相管柱溶離ApoA-I之精確條件將易於由熟習此項技術者確定。在多種實施例中，管柱裝載物中約

60%，諸如約65%、約70%、約75%或約80%或80%以上 ApoA-I存在於步驟(d)中之管柱溶離液中。

在某些態樣中，本文中所描述之純化方法在步驟(d)後進一步包含步驟(e)，使來自步驟(d)之脂蛋白元A-I逆相溶離液通過第二逆相層析管柱以進一步自全長蛋白質移除DNA、宿主細胞蛋白質及ApoA-I之截短形式。來自步驟(d)之逆相溶離液較佳在允許脂蛋白元A-I結合於基質之條件下裝載於第二逆相管柱上。步驟(e)中所用逆相基質與步驟(d)中所用基質可為相同類型基質或不同類型基質。在特定實施例中，步驟(e)中所用逆相基質為C18二氧化矽基質，諸如Daisogel SP-300-BIO C18基質(300 Å，10 μm；Daiso Co., Ltd.)。可用於在裝載ApoA-I前平衡C18管柱且確保裝載後蛋白質將結合於管柱之緩衝條件將易於由熟習此項技術者確定。管柱平衡緩衝液較佳為可使管柱pH值降低至約9.5之強緩衝液。在某些實施例中，平衡緩衝液為TAMP E(100 mM碳酸銨)。在多種實施例中，本文中所描述之純化方法之步驟(e)中所用逆相管柱之床高度為約10 cm至約50 cm，諸如約10 cm至約30 cm。在特定實施例中，步驟(e)中所用逆相管柱之床高度為約25 cm。

在多種實施例中，來自步驟(d)之ApoA-I溶離液以每公升約0.5 g至約30 g ApoA-I之濃度，諸如每公升約1 g至約10 g ApoA-I之濃度且更佳每公升約4 g至約5 g ApoA-I之濃度裝載於C18逆相管柱上。在特定實施例中，來自步驟(d)之ApoA-I溶離液以每公升約4.7 g ApoA-I之濃度裝載於C18

管柱上。較佳，在平衡後，來自步驟(d)之含有 ApoA-I 之溶離液以約 0.5 公分/分鐘至約 5.0 公分/分鐘，諸如約 1.0 公分/分鐘至約 3.0 公分/分鐘之流動速率裝載於管柱上。在一特定實施例中，含有 ApoA-I 之濾液以約 2.1 公分/分鐘之流動速率裝載於管柱上。

在步驟(e)中 ApoA-I 結合於逆相基質後，在步驟(f)中使用緩衝液中遞增濃度之有機溶劑之梯度(諸如 TAMP E 緩衝液中約 40%至約 50%乙腈)溶離蛋白質。在一些態樣中，使用經約 40至約 80分鐘(諸如約 50分鐘、約 60分鐘或約 70分鐘)約 40%至約 50%乙腈之線性梯度自管柱溶離 ApoA-I。在特定實施例中，使用經約 60分鐘 TAMP E 緩衝液中約 40%至約 50%乙腈之線性梯度自逆相基質溶離 ApoA-I。在某些態樣中，在線性梯度後用 50%乙腈等度溶離約 15分鐘。用於自逆相管柱溶離 ApoA-I 之精確條件將易於由熟習此項技術者確定。在多種實施例中，步驟(f)中之管柱溶離液中回收管柱裝載物中約 60%，諸如約 65%、約 70%、約 75%或約 80%或 80%以上 ApoA-I。

在某些實施例中，自本文中所描述之方法之步驟(f)中獲得之含有 ApoA-I 之溶離液移除有機溶劑。溶劑移除可由此項技術中已知的任何方法實現，包括(但不限於)濃縮步驟(f)中獲得之含有 ApoA-I 之溶離液且將濃縮物透濾至水性緩衝液中。在某些實施例中，來自步驟(f)之溶離液與來自步驟(f)中逆相管柱之溶離液之體積相比濃縮約 2 倍、約 2.5 倍、約 3 倍、約 3.5 倍、約 4 倍、約 4.5 倍或約 5 倍。在一特定

實施例中，溶離液濃縮約2.5倍，接著針對約10、15或20(較佳15)倍體積之合適水性緩衝液進行透濾。此項技術中已知合適水性緩衝液。尤其較佳之緩衝液為TAMP C(3 mM磷酸鈉，pH 8.0)。

在一些實施例中，顛倒層析管柱之次序。

視情況，在濃縮及緩衝液交換後，藉由陰離子交換層析以陰性模式(亦即在ApoA-I不結合於陰離子交換基質之條件下)進一步純化水性ApoA-I溶液以移除殘餘DNA及其他帶負電荷之污染物，諸如宿主細胞蛋白質(步驟(g))。在一些實施例中，以分批模式進行陰離子交換步驟。在其他實施例中，藉由管柱層析進行陰離子交換步驟。適用於分批模式或管柱層析中之陰離子交換基質包括(但不限於)Q瓊脂糖凝膠-FF或上文論述之用於步驟(a)中之任何陰離子交換基質。在特定態樣中，藉由使ApoA-I溶液通過陰離子交換膜(諸如具有大表面積及強陽離子電荷之膜，例如Sartobind Q或Mustang Q)來進行陰離子交換步驟。較佳使用Mustang Q陰離子交換膜(Pall Life Sciences)進行陰離子交換步驟。在某些態樣中，在此陰離子交換步驟前，使用任何合適酸使水性ApoA-I溶液之pH值降低至約5.5、約6.0或約6.5。在特定態樣中，使用稀磷酸使水性ApoA-I溶液之pH值降低至約6.0。在較佳實施例中，ApoA-I溶液以約12.5 L/m²/h通過Mustang Q濾筒。

在一些實施例中，濃縮陰離子交換膜濾液且視情況進行透濾以將溶劑交換為適於儲存或ApoA-I之進一步加工(諸

如與脂質複合(如以下章節6.5.1中描述)及/或調配為醫藥組合物(如以下章節6.6中所描述))之溶劑。適於儲存或ApoA-I之進一步加工之緩衝液易於由熟習此項技術者確定。在特定實施例中，經純化之ApoA-I交換至TAMP C緩衝液中。此步驟中可使用任何超濾膜，限制條件為膜之分子量截止點低於全長成熟ApoA-I之分子量使得其允許緩衝液而非蛋白質通過。在特定實施例中，使用10,000標稱分子量截止點之聚醚砜膜(例如Filtron Omega系列)。超濾後溶液中之ApoA-I濃度較佳為至少10 g/L、至少12 g/L、至少15 g/L、至少20 g/L、至少25 g/L、至少30 g/L、至少35 g/L、至少40 g/L、至少45 g/L或至少50 g/L。

6.1.5 脂蛋白元產物

本發明亦提供實質上純的成熟全長脂蛋白元。如本文中所用，術語「實質上純」係指蛋白質之純度為至少95%。在某些實施例中，實質上純的蛋白質之純度為至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%。在某些態樣中，由本文中所描述之純化方法產生之實質上純的脂蛋白元產物在使用光源相對於白色背景目視檢查時為不含可見粒子之澄清至輕微乳光無色溶液。在多種實施例中，由或可由以上章節6.1.4中描述之方法獲得之實質上純的脂蛋白元包含少量或不可偵測量的一或多種宿主細胞DNA、除脂蛋白元以外的蛋白質(例如宿主細胞蛋白質)、內毒素、殘餘溶劑以及低生物負荷(亦即樣品上或樣品中較少數目之微生物)，如下文中進一步詳細描

述。可由此項技術中已知的任何方法測定脂蛋白元產物之純度，包括(但不限於)N端Edman定序、MALDI-MS、凝膠電泳、HPLC及/或免疫分析法。

在多種實施例中，由本文中所描述之方法獲得之實質上純的脂蛋白元產物為質量為約28.1千道爾頓之全長成熟人類ApoA-I。產物中ApoA-I之質量可由此項技術中已知的任何方法測定，包括(但不限於)MALDI-MS。在多種實施例中，產物中至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99% ApoA-I蛋白質為成熟全長ApoA-I(例如包含SEQ ID NO:1之胺基酸25至267之ApoA-I)。在某些態樣中，實質上純的ApoA-I產物包含約15重量%或15重量%以下、約10重量%或10重量%以下、約5重量%或5重量%以下、約4重量%或4重量%以下、約3重量%或3重量%以下、約2重量%或2重量%以下或約1重量%或1重量%以下的N端延長ApoA-I同功異型物(例如proApoA-I)。熟習此項技術者應瞭解，產物中之任何N端延長ApoA-I均將在投藥後於血液中快速轉化為成熟ApoA-I。在多種實施例中，ApoA-I產物包含約25重量%或25重量%以下、約20重量%或20重量%以下、約15重量%或15重量%以下、約10重量%或10重量%以下、約5重量%或5重量%以下、約4重量%或4重量%以下、約3重量%或3重量%以下、約2重量%或2重量%以下、約1重量%或1重量%以下、約0.75重量%或0.75重量%以下、約0.5重量%或0.5重量%以下、約0.25重量%或0.25重量%以下或約

0.1重量%或0.1重量%以下的ApoA-I之截短形式。截短或延長之ApoA-I之量可例如由N端Edman定序及/或MALDI-MS及/或進行SDS-PAGE凝膠電泳且掃描SDS-PAGE凝膠以測定經純化之ApoA-I色帶區域之強度與所有色帶之總強度(若存在)之比率來測定。在多種實施例中，ApoA-I產物包含約20重量%或20重量%以下、約10重量%或10重量%以下、約5重量%或5重量%以下、約4重量%或4重量%以下、約3重量%或3重量%以下、約2重量%或2重量%以下、約1重量%或1重量%以下、約0.75重量%或0.75重量%以下、約0.5重量%或0.5重量%以下、約0.25重量%或0.25重量%以下或約0.1重量%或0.1重量%以下的ApoA-I之氧化形式，尤其在Met₁₁₂及/或Met₁₄₈位置處經氧化之ApoA-I。

在某些實施例中，由本文中所描述之方法產生之實質上純的脂蛋白元中之宿主細胞蛋白質含量小於約100 ppm(例如ng/mg)，諸如小於約75 ppm、小於約50 ppm、小於約40 ppm、小於約30 ppm、小於約20 ppm或小於約10 ppm。在特定實施例中，實質上純的脂蛋白元產物中之宿主細胞蛋白質含量小於約20 ppm。脂蛋白元產物中之宿主細胞蛋白質含量更佳小於約10 ppm。可由此項技術中已知的任何方法測定脂蛋白元樣品中宿主細胞蛋白質之存在及其量。當脂蛋白元係於例如哺乳動物細胞中以重組方式產生時，可使用市售ELISA套組(例如來自Cygnus Technologies之套組F015)偵測且定量宿主細胞蛋白質含量。

在一些態樣中，如本文中所描述純化之實質上純的脂蛋

白元產物中之宿主細胞DNA含量小於約50 pg/mg脂蛋白元，諸如小於約40 pg/mg脂蛋白元、小於約30 pg/mg脂蛋白元、小於約20 pg/mg脂蛋白元、小於約10 pg/mg脂蛋白元或小於約5 pg/mg脂蛋白元。在較佳實施例中，實質上純的脂蛋白元產物中之宿主細胞蛋白質含量小於約10 pg/mg脂蛋白元。可由此項技術中已知的任何方法測定脂蛋白元樣品中宿主細胞DNA之存在及其量，包括即時PCR或使用抗SSB抗體(GlycoType Biotechnology)偵測具有單股結合蛋白質之複合物，較佳藉由定量PCR測定。

在某些實施例中，由本文中所描述之方法產生之實質上純的脂蛋白元產物中之內毒素含量小於約0.5 EU/mg脂蛋白元，諸如小於約0.4 EU/mg脂蛋白元、小於約0.3 EU/mg脂蛋白元、小於約0.2 EU/mg脂蛋白元或小於約0.1 EU/mg脂蛋白元。本文中所描述之實質上純的脂蛋白元產物中之內毒素含量較佳小於約0.1 EU/mg脂蛋白元。可由此項技術中已知的任何方法實現內毒素之偵測及定量，例如使用針對革蘭氏陰性細菌內毒素(gram-negative bacterial endotoxins)之鰲變形細胞溶菌液(LAL)定性測試(Cambrex；敏感度0.125 EU/mL)。

本文中所描述之實質上純的脂蛋白元產物具有低生物負荷。術語「生物負荷」係指產物中好氧性細菌、厭氧性細菌、酵母及黴菌之含量。在多種實施例中，如本文中所描述純化之實質上純的脂蛋白元產物之生物負荷小於約1 CFU/mL。可根據任何已知方法，例如根據歐洲藥典

(European Pharmacopoeia)第 2.6.12.B 章、第 2.6.1 章及 USB 第 61 章協調方法進行生物負荷測試。

本文中所描述之實質上純的脂蛋白元產物包含少量殘餘溶劑。在特定實施例中，對於 10 mg/L 脂蛋白元，殘餘溶劑量小於約 50 ppm、小於約 45 ppm、小於約 40 ppm、小於約 35 ppm、小於約 30 ppm、小於約 25 ppm、小於約 20 ppm、小於約 15 ppm 或小於約 10 ppm。較佳，對於 10 mg/L 脂蛋白元，殘餘溶劑量小於約 41 ppm。可由此項技術中已知的任何方法分析殘餘溶劑量，包括(但不限於)GC-MS 及 HPLC。

脂蛋白元較佳為 ApoA-I(例如包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸 25-267 之 ApoA-I)。在一些實施例中，成熟人類 ApoA-I 蛋白質之胺基酸序列在位置 1(亦即對應於 SEQ ID NO:1 之位置 25 之位置)處具有天冬胺酸。

6.2 脂質部分

本發明之脂蛋白複合物及組合物包含脂質部分。脂質部分包括一或多種脂質。在多種實施例中，一或多種脂質可為飽和及/或不飽和，及天然或合成脂質。脂質部分較佳包括至少一種磷脂。

可存在於脂質部分中之合適脂質包括(但不限於)小型烷基鏈磷脂、卵磷脂醯膽鹼、大豆磷脂醯膽鹼、二軟脂醯基磷脂醯膽鹼、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼、1-肉豆蔻醯基-2-軟脂醯基磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯基-2-肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯基-2-硬脂醯基磷

脂醯膽鹼、1-硬脂醯基-2-軟脂醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯乙醇胺、二月桂醯基磷脂醯甘油磷脂醯膽鹼、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯肌醇、磷脂醯甘油、二磷脂醯甘油(諸如二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油、二軟脂醯基磷脂醯甘油、二硬脂醯基磷脂醯甘油、二油醯基磷脂醯甘油)、二肉豆蔻醯基磷脂酸、二軟脂醯基磷脂酸、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺、二軟脂醯基磷脂醯乙醇胺、二肉豆蔻醯基磷脂醯絲胺酸、二軟脂醯基磷脂醯絲胺酸、腦磷脂醯絲胺酸、腦鞘磷脂、軟脂醯基鞘磷脂、二軟脂醯基鞘磷脂、卵鞘磷脂、乳鞘磷脂、植物鞘磷脂、二硬脂醯基鞘磷脂、二軟脂醯基磷脂醯甘油鹽、磷脂酸、半乳糖腦苷脂、神經節苷脂、腦苷脂、二月桂基磷脂醯膽鹼、(1,3)-D-甘露糖基-(1,3)二甘油酯、胺基苯基糖苷、3-膽固醇基-6'-(糖硫基)己基醚糖脂及膽固醇及其衍生物。可使用合成脂質(諸如合成軟脂醯基鞘磷脂或N-軟脂醯基-4-羥基二氫鞘胺醇-1-磷酸膽鹼(一種形式之植物鞘磷脂))以使脂質氧化最少。包括軟脂醯基鞘磷脂之磷脂部分可視情況包括少量任何類型脂質，包括(但不限於)溶血磷脂、除軟脂醯基鞘磷脂以外的鞘磷脂、半乳糖腦苷脂、神經節苷脂、腦苷脂、甘油酯、三酸甘油酯及膽固醇及其衍生物。

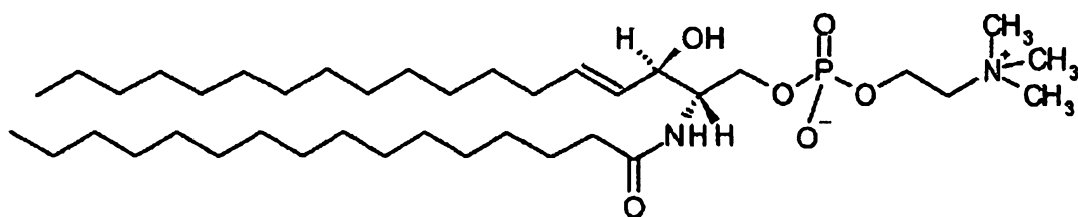
在較佳實施例中，脂質部分包括兩種類型之磷脂：鞘磷脂(SM)及帶負電荷之磷脂。SM為「中性」磷脂，因為其在生理學pH值下淨電荷為約0。所用SM之身分並非成功之

關鍵。因此，如本文中所用，術語「SM」包括來源於或獲自天然來源之鞘磷脂，以及天然存在之SM之類似物及衍生物，其與天然存在之SM相同，不會被LCAT水解。SM為結構與卵磷脂極類似之磷脂，但與卵磷脂不同，其不具有甘油主鏈且因此不具有連接醯基鏈之酯鍵。實情為，SM具有神經醯胺主鏈，用醯胺鍵連接醯基鏈。SM不為LCAT之受質且通常不會被其水解。然而，其可充當LCAT抑制劑或可藉由稀釋受質磷脂之濃度而降低LCAT活性。因為SM不水解，所以其滯留於循環中之時間較長。預期此特徵將允許本文中所描述之帶負電荷之脂蛋白複合物與不包括SM之脂蛋白元複合物相比具有較長藥理學作用(移動膽固醇)持續時間且吸收更多脂質，尤其膽固醇。此作用可使得與不包括SM之脂蛋白複合物相比治療所需之給藥頻率較低或劑量較小。

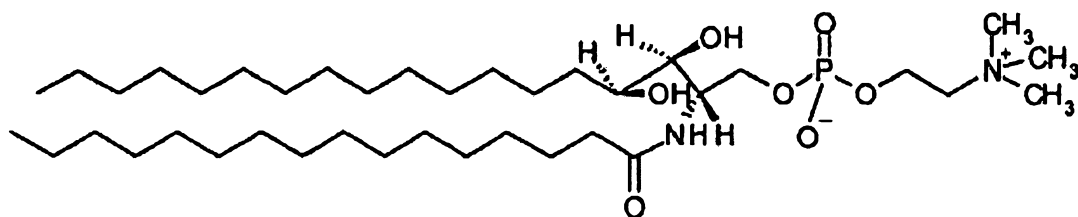
SM可自幾乎任何來源獲得。舉例而言，SM可自乳、卵或腦獲得。亦可使用SM類似物或衍生物。適用之SM類似物及衍生物之非限制性實例包括(但不限於)軟脂醯基鞘磷脂、N-軟脂醯基-4-羥基二氫鞘胺醇-1-磷酸膽鹼(一種形式之植物鞘磷脂)、軟脂醯基鞘磷脂、硬脂醯基鞘磷脂、D-赤-N-16:0-鞘磷脂及其二氫異構體、D-赤-N-16:0-二氫-鞘磷脂。可使用合成SM(諸如合成軟脂醯基鞘磷脂或N-軟脂醯基-4-羥基二氫鞘胺醇-1-磷酸膽鹼(植物鞘磷脂))以產生與動物來源之鞘脂相比更均質複合物及較少污染物及/或氧化產物。

例示性鞘磷脂軟脂醯基鞘磷脂及植物鞘磷脂展示如下。

軟脂醯基 SM



植物 SM



自天然來源分離之鞘磷脂可以人為方式富集一個特定飽和或不飽和醯基鏈。舉例而言，乳鞘磷脂 (Avanti Phospholipid, Alabaster, Ala.) 之特徵在於長飽和醯基鏈 (亦即具有 20 個或 20 個以上碳原子之醯基鏈)。相對比而言，卵鞘磷脂之特徵在於短飽和醯基鏈 (亦即具有少於 20 個碳原子之醯基鏈)。舉例而言，僅約 20% 乳鞘磷脂包含 C16:0 (16 個碳，飽和) 醯基鏈，而約 80% 卵鞘磷脂包含 C16:0 醯基鏈。使用溶劑提取，乳鞘磷脂之組成可經富集以具有與卵鞘磷脂相當之醯基鏈組成，或反之亦然。

SM 可為半合成，使得其具有特定醯基鏈。舉例而言，可首先自乳汁純化乳鞘磷脂，接著一個特定醯基鏈 (例如 C16:0 醯基鏈) 可裂解且由另一醯基鏈置換。SM 亦可為全合成，例如藉由大規模合成。參見例如 1993 年 6 月 15 日頒予 Dong 等人之題為 Synthesis of D-erythro-sphingomyelins 之

美國專利第 5,220,043 號；Weis, 1999, Chem. Phys. Lipids 102 (1-2):3-12。

包含半合成或合成 SM 之醯基鏈之長度及飽和度可選擇性變化。醯基鏈可為飽和或不飽和的，且可含有約 6 至約 24 個碳原子。各鏈可含有相同數目之碳原子或各鏈可含有不同數目之碳原子。在一些實施例中，半合成或合成 SM 包含混合醯基鏈使得一個鏈為飽和的而一個鏈為不飽和的。在該等混合醯基鏈 SM 中，鏈長度可相同或不同。在其他實施例中，半合成或合成 SM 之醯基鏈均為飽和的或均為不飽和的。又，該等鏈可含有相同或不同數目之碳原子。在一些實施例中，半合成或合成 SM 中之兩條醯基鏈相同。在一特定實施例中，該等鏈對應於天然存在之脂肪酸(諸如油酸、軟脂酸或硬脂酸)之醯基鏈。在另一實施例中，使用具有飽和或不飽和官能化鏈之 SM。在另一特定實施例中，兩條醯基鏈均為飽和的且含有 6 至 24 個碳原子。半合成及合成 SM 中可包括之常見脂肪酸中之醯基鏈之非限制性實例提供於下表 1 中：

表 1	
長度:不飽和數	通用名稱
14:0	肉豆蔻酸
16:0	軟脂酸
18:0	硬脂酸
18:1 順 Δ^9	油酸
18:2 順 $\Delta^{9,12}$	亞麻油酸
18:3 順 $\Delta^{9,12,15}$	亞麻酸
20:4 順 $\Delta^{5,8,11,14}$	二十碳四烯酸
20:5 順 $\Delta^{5,8,11,14,17}$	二十碳五烯酸(ω -3 脂肪酸)

在較佳實施例中，SM為軟脂醯基SM，諸如具有C16:0醯基鏈之合成軟脂醯基SM，或為包括軟脂醯基SM作為主成分之卵SM。

在一特定實施例中，使用官能化SM，諸如植物鞘磷脂。

脂質部分較佳包括帶負電荷之磷脂。如本文中所用，「帶負電荷之磷脂」為在生理學pH值下具有淨負電荷之磷脂。帶負電荷之磷脂可包含單一類型之帶負電荷之磷脂或兩種或兩種以上不同帶負電荷之磷脂之混合物。在一些實施例中，帶電荷磷脂為帶負電荷之甘油磷脂。帶電荷磷脂之身分並非成功之關鍵。合適帶負電荷之磷脂之特定實例包括(但不限於)1,2-二軟脂醯基-sn-甘油-3-[磷醯基-rac-(1-甘油)]、磷脂醯甘油、磷脂醯肌醇、磷脂醯絲胺酸及磷脂酸。在一些實施例中，帶負電荷之磷脂包含磷脂醯肌醇、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯甘油及/或磷脂酸中之一或多者。在一特定實施例中，帶負電荷之磷脂由1,2-二軟脂醯基-sn-甘油-3-[磷醯基-rac-(1-甘油)]或DPPG組成。

與SM相同，帶負電荷之磷脂可自天然來源獲得或由化學合成製備。在使用合成帶負電荷之磷脂之實施例中，醯基鏈之身分可選擇性變化，如上文關於SM所論述。在本文中所描述之帶負電荷之脂蛋白複合物之一些實施例中，帶負電荷之磷脂上的兩條醯基鏈相同。在一些實施例中，SM及帶負電荷之磷脂上之醯基鏈全部相同。在一特定實施例中，帶負電荷之磷脂及/或SM均具有C16:0或C16:1醯

基鏈。在一特定實施例中，SM之脂肪酸部分主要為C16:1軟脂醯基。在一個特定實施例中，帶電荷磷脂及/或SM之醯基鏈對應於軟脂酸之醯基鏈。

所用磷脂之純度較佳為至少95%及/或其中氧化劑含量降低。自天然來源獲得之脂質較佳具有較少的多不飽和脂肪酸部分及/或對氧化不敏感之脂肪酸部分。可使用碘滴定法測定樣品中之氧化度，碘滴定法提供過氧化值，以每公斤樣品中分離之碘之毫當量數表示，縮寫為毫當量氧/公斤。參見例如Gray, J.I., Measurement of Lipid Oxidation: A Review, Journal of the American Oil Chemists Society, 第55卷, 第539-545頁(1978); Heaton, F.W.及Uri N., Improved Iodometric Methods for the Determination of Lipid Peroxides, Journal of the Science of food and Agriculture, 第9卷, 第781-786頁(1958)。氧化度或過氧化物含量較佳較低，例如小於5毫當量氧/公斤、小於4毫當量氧/公斤、小於3毫當量氧/公斤或小於2毫當量氧/公斤。

包括SM及軟脂醯基鞘磷脂之脂質部分可視情況包括少量其他脂質。可使用幾乎任何類型之脂質，包括(但不限於)溶血磷脂、半乳糖腦苷脂、神經節苷脂、腦苷脂、甘油酯、三酸甘油酯及膽固醇以及其衍生物。

該等視情況選用之脂質當包括在脂質部分內時將通常佔脂質部分之小於約15重量%，但在一些情況下可包括更多的視情況選用之脂質。在一些實施例中，視情況選用之脂

質佔小於約10重量%、小於約5重量%或小於約2重量%。
在一些實施例中，脂質部分不包括視情況選用之脂質。

在一特定實施例中，磷脂部分含有呈90:10至99:1，更佳95:5至98:2範圍內之重量比(SM:帶負電荷之磷脂)的卵SM或軟脂醯基SM或植物鞘磷脂及DPPG。在一個實施例中，重量比為97:3。

本發明之脂蛋白複合物亦可用作載體以傳遞疏水性、親脂性或非極性活性劑以用於多種治療或診斷應用。對於該等應用，脂質部分可進一步包括一或多種疏水性、親脂性或非極性活性劑，包括(但不限於)脂肪酸、藥物、核酸、維生素及/或營養物。合適疏水性、親脂性或非極性活性劑不受治療類別的限制且可為(例如)鎮痛劑、消炎劑、驅蟲劑、抗心律不整劑、抗細菌劑、抗病毒劑、抗凝劑、抗抑鬱劑、抗糖尿病劑、抗癲癇劑、抗真菌劑、抗痛風劑、抗高血壓劑、抗瘧疾劑、抗偏頭痛劑、抗葷毒鹼劑、抗贅生劑、勃起困難改良劑、免疫抑制劑、抗原蟲劑、抗甲狀腺劑、抗焦慮劑、鎮靜劑、安眠劑、安定劑、 β -阻斷劑、心肌收縮劑、皮質類固醇、利尿劑、抗震顫麻痹劑、胃-腸藥劑、組織胺受體拮抗劑、去角質劑、脂質調節劑、抗心絞痛劑、cox-2抑制劑、白三烯抑制劑、巨環內酯、肌肉鬆弛劑、營養劑、核酸(例如小型干擾RNA)、類鴉片鎮痛劑、蛋白酶抑制劑、性激素、刺激劑、肌肉鬆弛劑、抗骨質疏鬆劑、抗肥胖劑、認知增強劑、抗尿失禁劑、營養油、抗良性前列腺肥大劑、必需脂肪酸、非必需脂肪酸及

其混合物。

合適之疏水性、親脂性或非極性活性劑之特定非限制性實例為：阿曲汀(acetretin)、胺基甲酸甲酯(albendazole)、沙丁胺醇(albuterol)、胺魯米特(aminogluthetimide)、胺碘酮(amiodarone)、胺氯地平(amlodipine)、安非他命(amphetamine)、雙性黴素B(amphotericin B)、阿托伐他汀(atorvastatin)、阿托伐醌(atovaquone)、阿奇黴素(azithromycin)、巴氯芬(baclofen)、倍氯米松(beclomethasone)、苯那普利(benzepiril)、苯佐那酯(benzonatate)、倍他米松(betamethasone)、比卡魯胺(bicalutamide)、布地奈德(budesonide)、安非他酮(bupropion)、白消安(busulfan)、布替萘芬(butenafine)、骨化二醇(calcifediol)、鈣泊三醇(calcipotriene)、骨化三醇(calcitriol)、喜樹鹼(camptothecin)、坎地沙坦(candesartan)、辣椒鹼(capsaicin)、卡馬平(carbamezepine)、胡蘿蔔素、塞內昔布(celecoxib)、西立伐他汀(cerivastatin)、西替利嗪(cetirizine)、氯芬尼拉明(chlorpheniramine)、膽鈣化醇(cholecalciferol)、西洛他唑(cilostazol)、西咪替丁(cimetidine)、桂利嗪(cinnarizine)、環丙沙星(ciprofloxacin)、西沙必利(cisapride)、克拉黴素(clarithromycin)、氯馬斯汀(clemastine)、克羅米芬(clomiphene)、氯米帕明(clomipramine)、氯吡格雷(clopidogrel)、可待因(codeine)、輔酶Q10、環苯紫林(cyclobenzaprine)、環孢素(cyclosporin)、達那唑(danazol)、

丹曲林(dantrolene)、右氯菲安明(dexchlorpheniramine)、
 雙氯芬酸(diclofenac)、雙香豆素(dicoumarol)、地高辛
 (digoxin)、脫氫表雄固酮(dehydroepiandrosterone)、二氫
 麥角胺(dihydroergotamine)、二氫速固醇(dihydrotachysterol)、
 地紅黴素(dirithromycin)、多尼澤倍(donezepil)、依非韋倫
 (efavirenz)、伊普沙坦(eposartan)、麥角鈣化醇
 (ergocalciferol)、麥角胺(ergotamine)、必需脂肪酸源、依
 託度酸(etodolac)、依託泊苷(etoposide)、法莫替丁
 (famotidine)、非諾貝特、芬太尼(fentanyl)、非索非那定
 (fexofenadine)、非那雄安(finasteride)、氟康唑
 (fluconazole)、氟吡洛芬(flurbiprofen)、氟伐他汀
 (fluvastatin)、磷苯妥英(fosphenytoin)、夫羅曲坦
 (frovatriptan)、富來頓(furazolidone)、加巴汀
 (gabapentin)、吉非羅齊(gemfibrozil)、格列本脲
 (glibenclamide)、格列吡嗪(glipizide)、格列瑞得
 (glyburide)、格列美脲(glimepiride)、灰黃黴素
 (griseofulvin)、鹵泛群(halofantrine)、布洛芬
 (ibuprofen)、厄貝沙坦(irbesartan)、伊立替康
 (irinotecan)、二硝酸異山梨醇酯(isosorbide dinitrate)、異
 維甲酸(isotretinoin)、伊曲康唑(itraconazole)、伊維菌素
 (ivermectin)、酮康唑(ketoconazole)、酮洛酸(ketorolac)、
 拉莫三嗪(lamotrigine)、蘭索拉唑(lansoprazole)、來氟米
 特(leflunomide)、賴諾普利(lisinopril)、洛哌丁胺
 (loperamide)、洛拉他定(loratadine)、洛伐他汀

(lovastatin)、L-甲狀腺素(L-thyroxine)、葉黃素(lutein)、
番茄紅素(lycopene)、甲羥助孕酮(medroxyprogesterone)、
美服培酮(mifepristone)、甲氟喹(mefloquine)、乙酸甲地
孕酮(megestrol acetate)、美沙酮(methadone)、甲氧沙林
(methoxsalen)、甲硝噻唑(metronidazole)、黴康唑
(miconazole)、咪達唑倫(midazolam)、米格列醇(miglitol)、
敏樂定(minoxidil)、米托蒽醌(mitoxantrone)、孟魯司特
(montelukast)、萘丁美酮(nabumetone)、納布啡(nalbuphine)、
納拉曲坦(naratriptan)、奈非那韋(nelfinavir)、硝苯地平
(nifedipine)、尼索地平(nilsolidipine)、尼魯利得
(nilutanide)、呋喃妥因(nitrofurantoin)、尼紫替丁
(nizatidine)、奧美拉唑(omeprazole)、奧普瑞白介素
(oprevelkin)、雌二醇(oestradiol)、奧沙普嗪(oxaprozin)、
太平洋紫杉醇(paclitaxel)、旁卡西醇(paracalcitol)、帕羅
西汀(paroxetine)、戊唑星(pentazocine)、吡格列酮
(pioglitazone)、苯噻啉(pizofetin)、普伐他汀(pravastatin)、
潑尼松龍(prednisolone)、普羅布可(probucol)、孕酮
(progesterone)、假麻黃素(pseudoephedrine)、吡啶斯的明
(pyridostigmine)、雷貝拉唑(rabeprazole)、雷諾昔酚
(raloxifene)、羅非昔布(rofecoxib)、瑞格列奈(repaglinide)、
利福布汀(rifabutine)、利福噴丁(rifapentine)、利美索龍
(rimexolone)、利托那韋(ritanovir)、利紫曲坦(rizatriptan)、
羅格列酮(rosiglitazone)、沙喹那韋(saquinavir)、舍曲林
(sertraline)、諾美婷(sibutramine)、檸檬酸西地那非

(sildenafil citrate)、辛伐他汀(simvastatin)、西羅莫司(sirolimus)、螺內酯(spironolactone)、舒馬曲坦(sumatriptan)、他可林(tacrine)、他克莫司(tacrolimus)、他莫昔芬(tamoxifen)、他蘇洛辛(tamsulosin)、蓓薩羅丁(targretin)、他紫羅汀(tazarotene)、替米沙坦(telmisartan)、替尼泊苷(teniposide)、特比萘芬(terbinafine)、特拉唑嗪(terazosin)、四氫大麻酚(tetrahydrocannabinol)、噻加賓(tiagabine)、噻氯匹定(ticlopidine)、替羅非班(tirofibran)、替紫尼丁(tizanidine)、托吡酯(topiramate)、拓撲替康(topotecan)、托瑞米酚(toremifene)、曲馬多(tramadol)、維甲酸(tretinoin)、曲格列酮(troglitazone)、曲氟沙星(trovafloxacin)、泛癸利酮(ubidecarenone)、維沙坦(valsartan)、文拉法辛(venlafaxine)、維替泊芬(verteporfin)、胺己烯酸(vigabatrin)、維生素A、維生素D、維生素E、維生素K、紫魯司特(zafirlukast)、齊留通(zileuton)、佐米曲普坦(zolmitriptan)、唑吡坦(zolpidem)及佐匹克隆(zopiclone)。亦可使用以上列出之藥劑之鹽、異構體及衍生物以及混合物。

6.3 脂蛋白複合物

本發明提供包含蛋白質部分及脂質部分之脂蛋白複合物，其中各者之組成已分別描述於以上章節6.1及6.2中。

通常，蛋白質部分包括一或多種脂質結合蛋白質，諸如脂蛋白元及/或其衍生物或類似物，其提供治療及/或預防效益。複合物可包括單一類型之脂質結合蛋白質或兩種或

兩種以上不同脂質結合蛋白質(其可來源於相同或不同物種)之混合物。合適脂質結合蛋白質描述於以上章節6.1中。儘管並非必需,但脂蛋白複合物將較佳包含來源於或胺基酸序列對應於所治療之動物物種的脂質結合蛋白質以避免誘發對療法之免疫反應。因此,對於治療人類患者,本發明複合物中較佳使用人類來源之脂質結合蛋白質。使用肽模擬脂蛋白元亦可降低或避免免疫反應。

認為使用高純度脂蛋白元(例如成熟且未經截短、未經氧化、未經脫醯胺化、未受內毒素污染及/或未受其他蛋白質或核酸污染)可增強脂蛋白複合物之治療效能及/或增強其安全性。因此,蛋白質部分可包含至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%成熟全長ApoA-I,視情況具有不超過25%、不超過20%、不超過15%、不超過10%、不超過5%或約0%氧化甲硫胺酸-112或甲硫胺酸-148,及/或不超過15%、不超過10%、不超過5%或約0%去胺基之胺基酸。可根據以上章節6.1.3及6.1.4中描述之方法純化脂蛋白元。

在一特定實施例中,蛋白質部分包含ApoA-I或基本上由ApoA-I組成,例如實質上純的成熟全長ApoA-I,如以上章節6.1.5中所描述。

脂質部分包括一或多種脂質,其可為飽和、不飽和、天然及合成脂質及/或磷脂。合適脂質包括(但不限於)小型烷基鏈磷脂、卵磷脂醯膽鹼、大豆磷脂醯膽鹼、二軟脂醯基

磷脂醯膽鹼、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼、1-肉豆蔻醯基-2-軟脂醯基磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯基-2-肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯基-2-硬脂醯基磷脂醯膽鹼、1-硬脂醯基-2-軟脂醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯乙醇胺、二月桂醯基磷脂醯甘油、磷脂醯膽鹼、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯肌醇、磷脂醯甘油、二磷脂醯甘油(諸如二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油、二軟脂醯基磷脂醯甘油、二硬脂醯基磷脂醯甘油、二油醯基磷脂醯甘油)、二肉豆蔻醯基磷脂酸、二軟脂醯基磷脂酸、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺、二軟脂醯基磷脂醯乙醇胺、二肉豆蔻醯基磷脂醯絲胺酸、二軟脂醯基磷脂醯絲胺酸、腦磷脂醯絲胺酸、腦鞘磷脂、二軟脂醯基鞘磷脂、二硬脂醯基鞘磷脂、二軟脂醯基磷脂醯甘油鹽、磷脂酸、半乳糖腦苷脂、神經節苷脂、腦苷脂、二月桂基磷脂醯膽鹼、(1,3)-D-甘露糖基-(1,3)二甘油酯、胺基苯基糖苷、3-膽固醇基-6'-(糖硫基)己基醚糖脂及膽固醇以及其衍生物。包括SM及軟脂醯基鞘磷脂之磷脂部分可視情況包括少量任何類型之脂質，包括(但不限於)溶血磷脂、除軟脂醯基鞘磷脂以外的鞘磷脂、半乳糖腦苷脂、神經節苷脂、腦苷脂、甘油酯、三酸甘油酯及膽固醇以及其衍生物。較佳為合成脂質，諸如合成軟脂醯基鞘磷脂或N-軟脂醯基-4-羥基二氫鞘胺醇-1-磷酸膽鹼(植物鞘磷脂)。其他脂質描述於以上章節6.2中。脂蛋白複合物較佳包含鞘磷脂。

本發明之脂蛋白複合物可視情況載有疏水性、親脂性或非極性活性劑(包括(但不限於)脂肪酸、藥物、核酸、維生素及/或營養物)以用於多種治療或診斷應用。合適藥劑描述於以上章節6.2中。

可使用本文中所描述之任何方法製備脂蛋白複合物。較佳如章節6.5.1至6.5.4中所描述製備複合物。

本文中所描述之帶負電荷之脂蛋白複合物中脂質部分與蛋白質部分之莫耳比可變化且將尤其視包含蛋白質部分之脂蛋白元之身分、包含脂質部分之帶電荷磷脂之身分及量以及帶電荷脂蛋白複合物之所需尺寸之因素而定。由於認為脂蛋白元(諸如ApoA-I)之生物活性係由包含脂蛋白元之兩性螺旋介導，因此可便利地使用ApoA-I蛋白質當量表示脂質:脂蛋白元莫耳比中之脂蛋白元部分。視用於計算螺旋之方法而定，通常認為ApoA-I含有6-10個兩性螺旋。其他脂蛋白元可根據ApoA-I當量基於其所含兩性螺旋數目表示。舉例而言，ApoA-I_M(其通常以二硫橋聯二聚體形式存在)可表示為2個ApoA-I當量，因為每一個ApoA-I_M分子中所含兩性螺旋數為ApoA-I分子之兩倍。相對比而言，含有單一兩性螺旋之肽脂蛋白元可表示為1/10-1/6個ApoA-I當量，因為每一個分子中所含兩性螺旋數為ApoA-I分子之1/10-1/6。通常，脂蛋白複合物之脂質:ApoA-I當量莫耳比(本文中定義為「R_i」)將在約105:1至110:1範圍內。在一些實施例中，R_i為約108:1。重量比可使用磷脂約650-800之MW獲得。

在一些實施例中，脂質:ApoA-I當量之莫耳比(「RSM」)在約80:1至約110:1範圍內，例如約80:1至約100:1。在一特定實例中，脂蛋白複合物之RSM可為約82:1。

構成帶負電荷之脂蛋白複合物之各種脂蛋白元及/或磷脂分子可用任何此項技術中已知的可偵測標記來標記，包括穩定同位素(例如 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 等)；放射性同位素(例如 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{125}I 等)；螢光團；化學發光物質；或酶標記。

在較佳實施例中，脂蛋白複合物為帶負電荷之脂蛋白複合物，其包含蛋白質部分(其較佳為成熟全長ApoA-I)及脂質部分(包含中性磷脂、鞘磷脂(SM)及帶負電荷之磷脂)。

已發現構成脂蛋白複合物之脂質部分之SM及帶負電荷之磷脂之組成及相對量會影響包含該等複合物之組合物之均質性及穩定性。如實例章節中說明，包含其中脂質部分包含SM及帶負電荷之磷脂之複合物的組合物與其中脂質部分包括DPPC及SM之類似組合物相比更均質且更穩定。

因此，含有SM及帶負電荷之脂質之本發明複合物較佳在無卵磷脂下形成以改良其均質性及穩定性。一旦形成含有SM及帶負電荷之脂質之均質複合物，則可併入其他脂質，諸如卵磷脂。

視情況選用之脂質當包括在脂質部分內時將通常佔脂質部分之小於約15%，但在一些情況下可包括更多的視情況選用之脂質。在一些實施例中，視情況選用之脂質佔約10重量%、小於約5重量%或小於約2重量%。在一些實施例中，帶負電荷之脂蛋白複合物之脂質部分不包括視情況選

用之脂質。

在一特定實施例中，磷脂部分含有呈90:10至99:1，更佳95:5至98:2範圍內(例如97:3)之重量比(SM:帶負電荷之磷脂)的卵SM或軟脂醯基SM或植物SM及DPPG。

一些脂蛋白元在活體內自一種脂蛋白複合物交換為另一種複合物(脂蛋白元ApoA-I即如此)。在該交換過程中，脂蛋白元通常載有一或多個磷脂分子。由於此性質，預期本文中所描述之帶負電荷之脂蛋白複合物將使帶負電荷之磷脂「接種」至內源HDL，藉此使其轉型為對腎清除更具抗性之 α -粒子。因此，預期投與本文中所描述之帶負電荷之脂蛋白複合物及組合物將提高HDL血清含量及/或改變內源HDL半衰期以及內源HDL代謝。預期此將引起膽固醇代謝變化及脂質逆轉運。

如實例章節中說明，包含其中ApoA-I:SM及DPPG磷脂之重量比為約1:2.7之複合物的組合物比具有其他重量：重量比之類似組合物更均質且更穩定。因此，本發明提供脂蛋白組合物，其中蛋白質：脂質重量比經最佳化以形成均質複合物群體。對於ApoA-I、SM及DPPG之複合物及類似分子質量之組分之複合物，此重量：重量比在1:2.6至1:3範圍內且最佳為1:2.7。在特定實施例中，ApoA-I蛋白質部分與脂質部分之比率通常在約1:2.7至約1:3範圍內，較佳為1:2.7。此對應於約1:90至1:140範圍內之ApoA-I蛋白質與磷脂之莫耳比。因此，本發明提供其中蛋白質與脂質之莫耳比為約1:90至約1:120、約1:100至約1:140或約1:95至約

1:125之複合物。特定地在此最佳化比率下，ApoA-I蛋白質部分以及SM及DPPG脂質部分形成尺寸及電荷特徵與天然HDL相同之實質上均質複合物，如分別由管柱層析及凝膠電泳分析。

可藉由改變 R_i 來控制帶負電荷之脂蛋白複合物之尺寸。亦即， R_i 越小則圓片越小。舉例而言，大型盤狀圓片之 R_i 通常在約200:1至100:1範圍內，而小型盤狀圓片之 R_i 通常在約100:1至30:1範圍內。

在一些特定實施例中，帶負電荷之脂蛋白複合物為大型盤狀圓片，其含有2-4個ApoA-I當量(例如2-4個ApoA-I分子、1-2個ApoA-I_M二聚體分子或12-40個單螺旋肽分子)、1個帶負電荷之磷脂分子及400個SM分子。在其他特定實施例中，帶負電荷之脂蛋白複合物為小型盤狀圓片，其含有2-4個ApoA-I當量；1-10個，更佳3-6個帶負電荷之磷脂分子；及90-225個，更佳100-210個SM分子。

6.3.1 複合物及粒徑之量測

脂蛋白複合物之組成及其尺寸以及用於製備脂蛋白複合物之脂質粒子之尺寸可使用此項技術中已知的多種技術測定。

溶液中脂蛋白複合物之蛋白質及脂質濃度可由此項技術中已知的任何方法量測，包括(但不限於)蛋白質及磷脂分析法、層析法(諸如HPLC)、凝膠過濾、與各種偵測器(包括質譜分析、UV或二極體陣列、螢光、彈性光散射等)偶聯之GC。亦可由相同層析技術以及肽圖譜、SDS-PAGE凝

膠電泳、ApoA-I之N端及C端定序以及用於測定脂質氧化之標準分析法測定脂質及蛋白質之完整性。

脂蛋白複合物以及用於製備脂蛋白複合物之脂質粒子之尺寸可在如本文中所描述之範圍內。可使用此項技術中已知的方法測定脂質粒徑及/或脂質及蛋白質複合物尺寸。例示性方法包括動態光散射及凝膠滲透層析。

動態光散射(DLS)(亦稱為光子相關光譜學)量測命中溶液中由布朗運動(Brownian motion)移動之粒子之光束之波長變化。特定地，移動粒子在經雷射照射時散射光且所散射光之所得強度波動可用於計算溶液中球體的粒徑分佈。參見Zetasizer Nano Series User Manual, MAN0317第2.1期(2004年7月)。DLS測定溶液中粒子之強度分佈及平均值，由此可計算粒子體積及數目分佈及平均值。DLS技術可用於測定用於製備脂蛋白複合物之脂質粒子之尺寸以及脂蛋白複合物本身之尺寸。合適DLS儀器為Malvern Instruments之Zetasizer Nano。

亦可使用凝膠滲透層析(GPC)測定含蛋白質複合物之尺寸。凝膠滲透層析基於分子尺寸分離混合物中之組分。可藉由比較複合物之溶離概況與已知標準物或參考樣品之溶離概況(通常藉由與校準曲線比較)來測定脂質-蛋白質複合物之尺寸。參考樣品可自市場購得且可包括蛋白質及非蛋白質兩種標準物，諸如白蛋白、鐵蛋白及維生素B₁₂。通用方案參見Molecular Biology (1998)，第IV部分，10.9.1-10.9.2。

適用於製備本發明之脂蛋白複合物之脂質粒子之尺寸可為至少 45 nm、至少 50 nm、至少 55 nm、至少 60 nm，如由 DLS 量測(例如使用基於強度之量測法)。此外，脂質粒子之尺寸可為至多 65 nm、至多 70 nm、至多 80 nm、至多 90 nm、至多 100 nm、至多 120 nm、至多 150 nm、至多 200 nm、至多 250 nm、至多 300 nm 或至多 500 nm，如由 DLS 量測。

本發明之脂蛋白複合物之尺寸可在 4 nm 至 15 nm、6 nm 至 15 nm、4 nm 至 12 nm、5 nm 至 12 nm、6 nm 至 12 nm、8 nm 至 12 nm 或 8 nm 至 10 nm 範圍內，如由本文中所描述之技術量測。

6.4 脂蛋白複合物群體

本發明亦提供本文中所描述之脂蛋白複合物群體。群體包含複數個本文中所描述之脂蛋白複合物，各脂蛋白複合物包含如以上章節 6.3 中描述之蛋白質部分及脂質部分。本發明申請人發現若干個被認為可個別地或組合促成脂蛋白複合物群體之效能及安全概況之特徵。脂蛋白複合物群體可單獨或以組合形式併有任何數目之本文中所描述之特徵。

首先，認為群體中脂蛋白複合物之均質性，亦即群體中一或多個離散脂蛋白複合物之流行率，如由群體中一或多個離散脂蛋白複合物峰表示，及脂蛋白複合物中未經修飾之成熟脂蛋白元之流行率可提高效能。因此，脂蛋白複合物群體可包含蛋白質部分，其包含脂蛋白元(例如 ApoA-I)

及脂質部分或基本上由脂蛋白元及脂質部分組成，其中該群體之均質度為至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%，如由凝膠滲透層析中呈單峰形式之群體之百分比量測。

在一些實施例中，群體中脂蛋白複合物尺寸可介於4 nm與15 nm之間，例如介於5 nm與12 nm之間，介於6 nm與15 nm之間或介於8 nm與10 nm之間。

群體中脂蛋白元(例如ApoA-I)可為成熟，較佳全長(未經截短)ApoA-I，且群體可含有至少75重量%、至少80重量%、至少85重量%、至少90重量%、至少95重量%、至少96重量%、至少97重量%、至少98重量%、至少99重量%成熟，較佳全長(未經截短)ApoA-I。在一些實施例中，群體包括不超過25重量%、不超過20重量%、不超過15重量%、不超過10重量%或不超過5重量%未成熟或未完全加工之ApoA-I及/或不超過20重量%、不超過15重量%、不超過10重量%或不超過5重量%截短ApoA-I。

其次，認為複合物中脂蛋白元及脂質之純度及脂蛋白複合物中相對不存在污染物(亦稱為脂蛋白複合物之純度)可降低副作用(諸如由肝酶(例如轉胺酶)增加所反映之肝損傷)風險。脂蛋白元之純度可由氧化及/或脫醯胺化之相對缺乏程度來量測。因此，在某些實施例中，脂蛋白複合物群體中之氧化脂蛋白元量降低，諸如不超過20%、不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%、不超過1%氧化甲硫胺酸，尤其為甲硫胺酸-

112或甲硫胺酸-148，或不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%氧化色胺酸。脂蛋白複合物群體亦可具有降低之脫醯胺化胺基酸百分比，例如不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%去胺基之胺基酸。

亦需要控制脂蛋白複合物中脂質之純度。因此，在一些實施例中，該群體中不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%脂質經氧化。

複合物及其群體之純度之另一量度為由產生或純化脂蛋白元之方法或製備脂蛋白複合物本身之方法所產生之污染物減少或不含該等污染物。因此，當自宿主細胞(例如哺乳動物宿主細胞)純化脂蛋白元時，脂蛋白複合物群體較佳不含宿主細胞DNA或蛋白質。在特定實施例中，群體含有不超過500奈克、不超過200奈克、不超過100奈克、不超過50奈克或不超過20奈克宿主細胞蛋白質/毫克脂蛋白，及/或不超過100微微克、不超過50微微克、不超過25微微克、不超過10微微克或不超過5微微克宿主細胞DNA/毫克脂蛋白(通常為ApoA-I)。

其他可能存在且需避免之污染物為內毒素(其尤其可存在於細胞培養物及血漿樣品中)以及溶劑及清潔劑(其可視用於製備及/或純化脂蛋白複合物之方法而存在)。脂蛋白複合物群體可含有至多約1 EU、約0.5 EU、約0.3 EU或約0.1 EU內毒素/毫克脂蛋白(例如ApoA-I)。脂蛋白複合物群

體亦可限於含有不超過200 ppm、250 ppm、100 ppm非水性溶劑。在一特定實施例中，群體不含任何清潔劑(例如膽酸鹽)。

此外，使用本文中揭示之方法，可將大部分脂蛋白元起始物質併入複合物中，從而限制群體中未複合之脂蛋白元的量。未複合之脂蛋白元的量降低係有益的，因為其可降低由暴露於異源蛋白質引起之免疫反應之風險。脂蛋白複合物群體可呈組合物形式，其中至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%蛋白質處於脂蛋白複合物中(亦即複合形式)。脂蛋白複合物群體可視情況呈組合物形式，其中至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%脂質處於脂蛋白複合物中。

群體可視情況包含複合物，其中脂質部分包含以脂質計不超過15重量%、不超過10重量%、不超過5重量%、不超過4重量%、不超過3重量%、不超過2重量%、不超過1重量%或0重量%膽固醇。

某些脂質及蛋白質組分可形成複數種不同但均質的脂蛋白複合物。因此，本發明亦提供包含兩個、三個或四個脂蛋白複合物群體之組合物，該等脂蛋白複合物包含不同量的脂蛋白元分子(例如兩個、三個或四個ApoA-I分子或ApoA-I當量)。在一例示性實施例中，組合物包含兩個脂蛋白複合物群體，分別為第一群體包含每個脂蛋白複合物具有2個ApoA-I或ApoA-I當量之脂蛋白複合物，第二群體

包含每個脂蛋白複合物具有3個或4個ApoA-I或ApoA-I當量之脂蛋白複合物且視情況選用之第三群體包含每個脂蛋白複合物具有4個或3個ApoA-I或ApoA-I當量之脂蛋白複合物。

包含兩個或兩個以上脂蛋白複合物群體之組合物較佳具有低含量之未複合脂蛋白及/或脂質。因此，較佳為組合物中不超過15%、不超過12%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%脂質呈未複合形式及/或組合物中不超過15%、不超過12%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%脂蛋白呈未複合形式。

本文中亦提供脂蛋白複合物或其群體之大規模製劑，其尤其適用於商業化應用，諸如大規模製備用於治療目的之脂蛋白複合物。本文中涵蓋之製劑包含如本文中所描述之脂蛋白複合物(例如帶負電荷之脂蛋白複合物)群體。

製劑以適於商業化規模製備組合物(例如醫藥組合物及劑型)之脂蛋白複合物之體積、量及所得濃度提供。典型製劑體積在約5 L至約50 L範圍內，例如約5 L、約6 L、約7 L、約8 L、約9 L、約10 L、約11 L、約12 L、約13 L、約14 L、約15 L、約16 L、約17 L、約18 L、約19 L、約20 L、約25 L、約30 L、約35 L、約40 L、約45 L或約50 L。在一較佳實施例中，製劑體積為約20 L。

製劑進一步含有脂蛋白複合物或其群體，該等脂蛋白複合物或其群體之量足以使脂蛋白元之濃度在每毫升約5毫克至約15毫克，5毫克至約10毫克，約10毫克至約15毫克，或約8毫克至約12毫克脂蛋白元範圍內。視製劑體積而定，該等量可在約25 g至約350 g範圍內，表示為製劑中脂蛋白元(例如ApoA-I)之量。在一特定實施例中，每毫升製劑含有約8毫克ApoA-I。

在一特定實施例中，製劑體積為15 L至25 L且含有約100 g至約250 g ApoA-I。在另一特定實施例中，製劑體積為30 L至50 L且含有約240 g至約780 g ApoA-I。

6.5 製備脂蛋白複合物之方法

6.5.1 製備脂蛋白複合物之基於熱循環之方法

已發現本文中所描述之使用蛋白質及脂質組分之熱循環之方法可用於產生脂蛋白複合物且具有優於其他方法之優點。在本文中提供之熱循環方法中，蛋白質組分及脂質組分經熱循環直至大部分蛋白質組分(例如至少60%、至少70%、至少80%或至少90%)與脂質組分複合，從而形成脂蛋白複合物。熟習此項技術者應瞭解，本發明之用於產生脂蛋白複合物之方法與其他方法相比之優點包括高複合效率，從而產生實質上均質且純的最終產物，且較少或無副產物(例如未複合蛋白質)或製備雜質(例如清潔劑或界面活性劑、降解之蛋白質、氧化組分)存在於所得產物中，從而無需昂貴且不經濟的純化步驟。因此，該等方法有效且極少或不浪費起始物質。此外，該等製程易於按比例放大

且具有低設備成本。可在無工業溶劑下進行該等製程亦使得其為環保的。

為使蛋白質及脂質組分之氧化最少，較佳在惰性氣體(例如氮氣、氬氣或氦氣)層下進行複合物形成過程(包括脂質組分之均質化)中之一個、一個以上或所有步驟。

6.5.2 脂質組分

本發明之熱循環方法可利用多種脂質(單獨或以組合形式)，包括如以上章節6.2中所描述之飽和、不飽和、天然及合成脂質及/或磷脂。

可使用產生脂質粒子(諸如多層微脂粒(「MLV」)、單層小微脂粒(「SUV」)、單層大微脂粒(「LUV」)、微胞、分散液及其類似物)之任何方法製備脂質以供與蛋白質組分一起進行熱循環。

已知一系列技術可用於製備脂質粒子。已使用多種方案製備脂質粒子，形成不同類型微脂粒。用於本發明之熱循環方法中之粒子較佳主要處於45-80 nm尺寸範圍內，最佳處於55 nm至75 nm尺寸範圍內。

高壓均質化(例如微流體化)有利地產生合適尺寸之粒子。均質化壓力較佳為至少1,000巴、至少1,200巴、至少1,400巴、至少1,600巴、至少1,800巴且最佳為至少2,000巴，例如至少2,200巴、至少2,400巴、至少2,600巴、至少2,800巴、至少3,000巴、至少3,200巴、至少3,400巴、至少3,600巴、至少3,800巴或至少4,000巴。在特定實施例中，均質化壓力介於任何前述壓力值對之間的範圍內，例如

1,600至3,200巴；1,800至2,800巴；1,900至2,500巴；2,000至2,500巴；2,000至3,000巴；2,400至3,800巴；2,800至3,400巴等。1巴等於100 kPa、1,000,000達因/平方公分(微巴)、0.987 atm(大氣壓)、14.5038 psi、29.53 inHg及750.06托。

在一種合適的均質化方法中，將脂質之乳液轉移至110Y型微流化床(Microfluidics Inc, Newton, Mass.)之進料器中。該單元在均質化期間浸沒於浴槽中以保持製程溫度(例如55℃、58℃、62℃等)且在使用前用惰性氣體(氮氣)沖洗。起動後，使乳液在跨越相互作用頭之壓力梯度下經5-20分鐘以連續再循環通過均質器。在無蛋白質組分下均質化脂質組分可避免均質化技術中所用之高剪應力破壞蛋白質組分。

可適當地使用其他方法，限制條件為可獲得合適尺寸之粒子。舉例而言，水性溶液對脂質之水合作用可引起脂質分散且自發形成多層微脂粒(「MLV」)。MLV為具有多個脂質雙層圍繞中央水性核心之粒子。該等類型粒子大於單層小微脂粒(SUV)且直徑可為350-400 nm。可藉由於圓底燒瓶中使脂質溶解於氯仿中且蒸發氯仿直至脂質在燒瓶壁上形成薄層來製備MLV。添加水性溶液且使脂質層再水合。旋轉或渦漩燒瓶時形成微脂粒。Deamer等人，1983, *Liposomes* (Ostro編)，Marcel Dekker, Inc. New York(引用Bangham等人，1965, *J. Mol. Biol.* 13:238)。此方法亦可用於產生單層微脂粒。Johnson等人，1971, *Biochim.*

Biophys. Acta 233:820。

單層小微脂粒(SUV)為具有單一脂質雙層圍繞水性核心之粒子。視用於產生SUV之方法而定，其直徑尺寸可在25-110 nm範圍內。如下製備第一批SUV：於氯仿中在氮氣下乾燥磷脂製劑，添加水層以產生毫莫耳濃度範圍內之脂質濃度且在45℃下音波處理溶液以使其澄清。Deamer等人，1983, Liposomes (Ostro編)，Marcel Dekker, Inc. New York。以此方式製備之SUV產生直徑在25-50 nm範圍內之粒子。

製備SUV之另一種方法為將乙醇/脂質溶液快速注射至待囊封之水性溶液中。Deamer等人，1983, Liposomes (Ostro編)，Marcel Dekker, Inc. New York(引用Batzri等人，1973, Biochim. Biophys. Acta 298:1015)。由此方法產生之SUV之直徑尺寸在30-110 nm範圍內。

亦可藉由使多層微脂粒在20,000 psi下通過法式壓碎機4次來製備SUV。所產生之SUV之直徑尺寸將在30-50 nm範圍內。Deamer等人，1983, Liposomes (Ostro編)，Marcel Dekker, Inc. New York(引用Barenholz等人，1979, FEBS Letters 99:210)。

亦可藉由在高壓下經小孔膜擠壓水性磷脂製劑來形成多層及單層磷脂微脂粒(Hope等人，1996, Chemistry and Physics of Lipids, 40:89-107)。

單層大微脂粒與SUV的類似之處為其為單一脂質雙層圍繞中央水性核心，但LUV比SUV大得多。視其組分部分及

製備方法而定，LUV之直徑尺寸可在50-1000 nm範圍內。Deamer等人，1983, *Liposomes* (Ostro編)，Marcel Dekker, Inc. New York。通常使用三種方法中之一者製備LUV：清潔劑稀釋、逆相蒸發及輸注。

在清潔劑稀釋技術中，使用清潔劑溶液(諸如膽酸鹽、去氧膽酸鹽、辛基葡萄糖苷、庚基葡萄糖苷及Triton X-100)自脂質製劑形成微胞。接著對溶液進行透析以移除清潔劑。Deamer等人，1983, *Liposomes* (Ostro編)，Marcel Dekker, Inc. New York。

逆相蒸發技術使脂質溶解於水性-非極性溶液中，形成反向微胞(inverted micelle)。蒸發非極性溶劑且微胞聚集以形成LUV。此方法通常需要大量脂質。

輸注法將溶解於非極性溶液中之脂質注射至待囊封之水性溶液中。隨著非極性溶液蒸發，脂質聚集於氣/水界面上。隨著氣體鼓泡通過水性溶液，脂質薄片形成LUV及寡層粒子。藉由過濾將粒子按尺寸分類。Deamer等人，1983, *Liposomes* (Ostro編)，Marcel Dekker, Inc. New York(引用Deamer等人，1976, *Biochim. Biophys. Acta* 443: 629及Schieren等人，1978, *Biochim. Biophys. Acta* 542: 137)。

可表徵所得脂質製劑之等分試樣以確認脂質粒子適用作本文中所揭示之熱循環方法中之脂質組分。可使用此項技術中已知的任何方法進行脂質製劑之表徵，包括(但不限於)尺寸排除過濾、凝膠過濾、管柱過濾、凝膠滲透層析

及非變性凝膠電泳。

6.5.3 蛋白質組分

脂蛋白複合物之蛋白質組分並非本發明熱循環方法成功之關鍵。幾乎任何可提供治療及/或預防效益之脂質結合蛋白質，諸如脂蛋白元及/或其衍生物或類似物均可包括於複合物中。此外，與脂質締合時可活化LCAT或形成盤狀粒子的任何 α -螺旋肽或肽類似物，或「模擬」脂蛋白元(諸如ApoA-I)活性之任何其他類型分子均可包括於脂蛋白複合物中且因此包括在「脂質結合蛋白質」之定義內。可用於熱循環方法中之脂質結合蛋白質包括以上章節6.1中描述之方法。可如以上章節6.1.2中所描述以重組方式產生脂質結合蛋白質。可如以上章節6.1.3中所描述純化脂質結合蛋白質。

如此項技術中熟知，蛋白質組分可自動物來源(且尤其自人類來源)純化、化學合成或以重組方式產生，參見例如Chung等人，1980, J. Lipid Res. 21(3):284-91；Cheung等人，1987, J. Lipid Res. 28(8):913-29。亦參見美國專利第5,059,528號、第5,128,318號、第6,617,134號；美國公開案第20002/0156007號、第2004/0067873號、第2004/0077541號及第2004/0266660號；及PCT公開案第WO/2008/104890號及第WO/2007/023476號。

蛋白質組分可包括脂質以使得蛋白質/肽與脂質之比率為所需複合物中之蛋白質/肽與脂質之比率的至少5倍(例如至少5倍、至少10倍或至少20倍)。舉例而言，為產生所需

蛋白質與脂質之莫耳比為1:200之脂蛋白複合物，蛋白質組分中之蛋白質可與脂質(其通常僅表示最終複合物中之小部分脂質)以例如1:10至1:20之比率組合。不暗示任何機制，此蛋白質與少量脂質之「預」複合在所需複合物具有一種以上類型脂質時適用，其使得在由熱循環產生之脂蛋白複合物中少量(例如所需脂蛋白複合物中總脂質之10重量%或10重量%以下，總脂質之5重量%或5重量%以下，總脂質之3重量%或3重量%以下，總脂質之2重量%或2重量%以下或總脂質之1重量%或1重量%以下)存在之脂質更均質分佈。

6.5.4 由熱循環產生脂蛋白複合物

該等方法通常需要使包含脂質粒子及脂質結合蛋白質之懸浮液在「高」溫度範圍與「低」溫度範圍之間熱循環直至形成脂蛋白複合物。

經熱循環之懸浮液含有脂質組分及蛋白質組分，較佳在高溫度範圍內之溫度下將該等組分混合在一起以形成「起始」懸浮液，其隨後經熱循環。

起始懸浮液中之最佳脂質與蛋白質比率由欲產生之最終脂蛋白複合物中組分之所需化學計量決定。熟習此項技術者應瞭解，脂質部分與蛋白質部分之莫耳比將尤其視蛋白質組分中蛋白質及/或肽之身分、脂質部分中脂質之身分及量以及所需脂蛋白複合物尺寸之因素而定。脂蛋白複合物中合適之脂質與蛋白質比率可使用此項技術中已知的多種功能性分析法確定，包括(但不限於)凝膠電泳移動性分

析法、尺寸排除層析、與HDL受體相互作用、由ATP結合卡匣轉運體(ABCA1)識別、肝臟吸收及藥物動力學/藥效學。舉例而言，凝膠電泳移動性分析法可用於確定複合物中之最佳脂質組分與蛋白質組分比率。當由本發明之方法產生之複合物帶電荷時，由於脂質組分中包含磷脂，複合物可經設計成展現與天然前- β -HDL或 α -HDL粒子類似的電泳遷移動性。因此，在一些實施例中，天然前- β -HDL或 α -HDL粒子可用作測定複合物移動性之標準物。

在一較佳實施例中，最終複合物具有至少一種脂蛋白元或脂蛋白元模擬物(最佳分別為成熟人類ApoA-I或ApoA-I肽)、至少一種中性脂質及至少一種帶負電荷之脂質，諸如PCT WO 2006/100567中所描述者，其內容以引用的方式併入本文中。

由於認為脂蛋白元(諸如ApoA-I)之生物活性係由包含脂蛋白元之兩性螺旋介導，因此可便利地使用ApoA-I蛋白質當量表示脂質:脂蛋白元莫耳比中之脂蛋白元部分。視用於計算螺旋之方法而定，通常認為ApoA-I含有6-10個兩性螺旋。其他脂蛋白元可根據ApoA-I當量基於其所含兩性螺旋數目表示。舉例而言，ApoA-I_M(其通常以二硫橋聯二聚體形式存在)可表示為2個ApoA-I當量，因為每一個ApoA-I_M分子中所含兩性螺旋數為ApoA-I分子之兩倍。相對比而言，含有單一兩性螺旋之肽脂蛋白元可表示為1/10至1/6個ApoA-I當量，因為每一個分子中所含兩性螺旋數為ApoA-I分子之1/10至1/6。

通常，脂蛋白複合物中脂質:ApoA-I當量莫耳比(本文中定義為「 R_i 」)將在約2:1至200:1範圍內。在一些實施例中， R_i 為約50:1至150:1，或75:1至125:1、10:1至175:1。重量比可使用磷脂約650-800之MW獲得。

在某些實施例中，組分之莫耳比為2-6(帶負電荷之脂質，例如DPPG): 90-120(中性脂質，例如SM):1(ApoA-I當量)。在一特定實施例中，如實例1中描述，複合物包含脂質與蛋白質之莫耳比為約108:1之DPPG、SM及ApoA-I，其中DPPG佔總脂質之3重量%(+/- 1重量%)且SM佔脂質之97重量%(+/- 5重量%)。

在熱循環開始前，起始懸浮液中脂質及蛋白質組分之濃度可在1至30 mg/mL ApoA-I當量濃度及1至100 mg/mL脂質濃度範圍內。在特定實施例中，蛋白質組分之濃度係選自1至30 mg/ml、2至20 mg/ml、5至20 mg/ml、2至10 mg/ml、5至15 mg/ml、5至20 mg/ml及10至20 mg/ml，且脂質組分之濃度係獨立地選自10至100 mg/ml、10至75 mg/ml、25至50 mg/ml、10至75 mg/ml、25至100 mg/ml、25至75 mg/ml及1至75 mg/ml。

熱循環製程之高溫度範圍及低溫度範圍係基於脂蛋白複合物之脂質及蛋白質組分之相轉移溫度。或者，當脂質組分不呈現確定或不連續相轉移時(如在使用具有不飽和脂肪酸鏈之磷脂或磷脂混合物時會發生)，熱循環之高溫度範圍與低溫度範圍相差至少約20°C，至多約40°C或甚至40°C以上。舉例而言，在一些實施例中，低溫度範圍與高

溫度範圍相差 20°C - 30°C 、 20°C - 40°C 、 20°C - 50°C 、 30°C - 40°C 、 30°C - 50°C 、 25°C - 45°C 、 35°C - 55°C 。

對於脂質，相轉移涉及密集、有序結構(稱為凝膠狀態)變為鬆散、較無序結構(稱為流體狀態)。在此項技術中通常藉由在接近所用特定脂質或脂質混合物之轉移溫度之溫度下培育脂質粒子及脂蛋白元來形成脂蛋白複合物。脂質組分之相轉移溫度(其可由熱量測定法測定) $\pm 5^{\circ}\text{C}$ - 10°C 表示本發明方法之「低」溫度範圍。

對於蛋白質，相轉移溫度涉及摺疊三維結構變為二維結構。對於脂質，相轉移涉及密集、有序結構(稱為凝膠狀態)變為鬆散、較無序結構(稱為流體狀態)。在此項技術中通常藉由在接近所用特定脂質或脂質混合物之轉移溫度之溫度下培育脂質粒子及脂蛋白元來形成脂蛋白複合物。

脂質組分之相轉移溫度(其可由熱量測定法測定) $\pm 12^{\circ}\text{C}$ (更佳 $\pm 10^{\circ}\text{C}$)表示本發明方法之「低」溫度範圍。在某些實施例中，低溫度範圍為脂質組分之相轉移溫度 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 或 $\pm 8^{\circ}\text{C}$ 。在一個特定實施例中，低溫度範圍為低於脂質組分之相轉移溫度至少 5°C 或至少 10°C 至高於脂質組分之相轉移溫度 5°C 。

對於蛋白質，相轉移溫度涉及三級結構變為二級結構。蛋白質組分之相轉移溫度 $\pm 12^{\circ}\text{C}$ (更佳 $\pm 10^{\circ}\text{C}$)表示本發明方法之「高」溫度範圍。在特定實施例中，高溫度範圍為蛋白質組分之相轉移溫度 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 或 $\pm 8^{\circ}\text{C}$ 。在一個特定實施例中，低溫度範圍為低於蛋白質組分之相轉

移溫度 10°C 至高於蛋白質組分之相轉移溫度不超過 5°C 、不超過 10°C 或不超過 15°C 。

使起始懸浮液在高溫與低溫之間熱循環(較佳在高溫下開始)，直至起始懸浮液中至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%蛋白質併入脂蛋白複合物中。使用合適化學計算量的脂質及蛋白質組分，在若干次循環後可實現脂質與蛋白質組分之實質上完全複合。循環次數將視蛋白質及脂質組分、循環持續時間而定，但通常將需要5次或5次以上循環、10次或10次以上循環或15次或15次以上循環(在高溫及低溫兩者下)以實現實質上完全複合。循環通常在2分鐘至60分鐘範圍內。在特定實施例中，循環係在各溫度下5至30分鐘、10至20分鐘、5至20分鐘、2至45分鐘或5至45分鐘範圍內。

由該等方法產生之複合物通常為呈微胞、微脂粒、球狀或盤狀粒子形狀之超分子組合體，其中蛋白質組分在磷脂與蛋白質之間的特定化學計量範圍下且以均質粒徑分佈實體上結合於脂質組分。本發明方法有利地使得起始懸浮液中脂質及/或蛋白質之實質上完全複合，產生實質上不含游離脂質及/或游離蛋白質之組合物，如由分離方法(諸如層析)觀測。因此，本發明方法可在無純化步驟下進行。

本發明之方法有利地產生粒徑分佈均質之複合物，從而無需進行尺寸份化。

在本發明之一些實施例中，脂蛋白複合物將含有一種以

上類型之脂質，包括一或多種相對較少量(例如佔脂質組分之小於10%、小於5%、小於3%或小於1%)之脂質。為使分散最佳化，可將少量使用之脂質與蛋白質組分預摻合而非併入脂質組分中之脂質粒子中。

可表徵所得脂蛋白複合物之等分試樣以確認複合物具有所需特徵，例如蛋白質組分實質上完全(例如>90%、>95%、>97%或>98%)併入脂質組分中。可使用此項技術中已知的任何方法進行複合物之表徵，包括(但不限於)尺寸排除過濾、凝膠過濾、管柱過濾、凝膠滲透層析及非變性凝膠電泳。

本文中所描述之脂蛋白複合物或組合物之均質性及/或穩定性可由此項技術中已知的任何方法量測，包括(但不限於)層析法，諸如凝膠過濾層析。舉例而言，在一些實施例中，單峰或有限數目之峰可與穩定複合物相關。可藉由監測隨時間推移出現新的峰來測定複合物穩定性。出現新的峰為由於粒子不穩定性而引起複合物重組之標誌。

為使蛋白質及脂質組分之氧化最少，熱循環較佳在惰性氣體(例如氮氣、氬氣或氦氣)層下進行。

6.5.5 製備脂蛋白複合物之其他方法

本文中所描述之脂蛋白複合物(包括帶負電荷之脂蛋白複合物)可以多種形式製備，包括(但不限於)微脂粒、脂質體、蛋白脂質體、微胞及盤狀粒子。除上述熱循環方法外，可使用熟習此項技術者已知的多種方法製備脂蛋白複合物。可使用製備脂質體或蛋白脂質體之多種技術。舉例

而言，脂蛋白元可與合適磷脂一起經音波處理(使用超音波浴或超音波探針)以形成複合物。或者，脂蛋白元(例如ApoA-I)可與預成型脂質微脂粒組合，從而自發形成脂蛋白複合物。亦可藉由清潔劑透析方法形成脂蛋白複合物；例如對脂蛋白元、帶電荷磷脂以及SM及清潔劑(諸如膽酸鹽)之混合物進行透析以移除清潔劑且重組以形成帶負電荷之脂蛋白複合物(參見例如Jonas等人，1986, *Methods in Enzymol.* 128:553-82)，或藉由使用擠壓裝置或均質化形成。

在一些實施例中，藉由使用高壓(例如約32000 p.s.i.)進行均質化歷時約40、約50或約60分鐘製備複合物。在一特定實施例中，如下製備包含ApoA-I、SN及DPPG之複合物。將ApoA-I溶解於磷酸鹽緩衝液中且與使用高剪切混合器製備之DPPG於磷酸鹽緩衝液中之分散液一起在50°C下培育。接著將ApoA-I/DPPG混合物與SM之分散液組合且在30°C-50°C下在高於30,000 p.s.i.之壓力下均質化直至複合物形成實質上完成，如由動態光散射或凝膠滲透層析監測。

在一些實施例中，可由美國公開案2004/0067873之實例1中描述之膽酸鹽分散法製備脂蛋白複合物，其揭示內容以引用的方式併入本文中。簡言之，使乾燥脂質於NaHCO₃緩衝液中水合，接著渦漩且音波處理直至所有脂質分散。添加膽酸鹽溶液，在週期性渦漩及音波處理下培育混合物30分鐘直至其變澄清，表明形成脂質膽酸鹽微

胞。添加含 ProApoA-I 之 NaHCO_3 緩衝液且溶液在約 37°C - 50°C 下培育 1 小時。

可藉由此項技術中熟知的方法移除膽酸鹽。舉例而言，可藉由透析、超濾或藉由吸附吸收於親和性珠粒或樹脂上移除膽酸鹽分子來移除膽酸鹽。在一個實施例中，添加親和性珠粒（例如 BIO-BEADS® (Bio-Rad Laboratories)）至帶負電荷之脂蛋白複合物與膽酸鹽之製劑中以吸附膽酸鹽。在另一實施例中，使製劑（例如脂蛋白複合物與膽酸鹽之微胞製劑）通過填充有親和性珠粒之管柱。

在一特定實施例中，藉由將製劑裝載於注射器內之 BIO-BEADS® 上自脂蛋白複合物製劑移除膽酸鹽。接著用障壁膜密封注射器且在搖動下在 4°C 下培育隔夜。在使用前，藉由注射溶液通過 BIO-BEADS®（膽酸鹽經珠粒吸附）來移除膽酸鹽。

預期當脂蛋白複合物（諸如本文中所描述之帶負電荷之脂蛋白複合物）具有與 HDL，尤其與前- β -1 或前- β -2 HDL 群體中之 HDL 類似之尺寸及密度時，該等複合物於循環中之半衰期延長。可藉由凍乾製備存放期較長之穩定製劑。在一些實施例中，使用此項技術中通常已知的共凍乾方法製備 ApoA-I 脂質複合物。簡言之，共凍乾步驟包括將 ApoA-I 與脂質之混合物溶解於有機溶劑或溶劑混合物中，或單獨溶解 ApoA-I 及脂質且將其混合在一起。用於共凍乾之溶劑或溶劑混合物之理想特徵包括：(i) 能夠溶解疏水性脂質及兩性蛋白質之中等相對極性，(ii) 符合 FDA 溶劑準則 (FDA

solvent guideline)(Federal Register, 第62卷, 第247期)之II類或III類溶劑, 以避免與殘餘有機溶劑有關的潛在毒性, (iii)低沸點, 以確保易於在凍乾期間移除溶劑, (iv)高熔點, 以實現較快冷凍、較高冷凝溫度及冷凍乾燥器上耗損較小。在一些實施例中, 使用冰乙酸。亦可使用甲醇、冰乙酸、二甲苯或環己烷之組合。

接著凍乾ApoA-I-脂質溶液以獲得均質粉末。可最佳化凍乾條件以使得溶劑快速蒸發且經凍乾之脂蛋白元-脂質粉末中之殘餘溶劑量最小。熟習此項技術者可視溶劑性質、容器類型及尺寸、維持溶液、填充體積及所用冷凍乾燥器之特徵來確定冷凍乾燥條件之選擇。

凍乾脂蛋白複合物可用於製備散裝產品以用於醫藥再調配, 或用於製備個別等分試樣或劑量單元, 其可經復原以獲得脂蛋白複合物之溶液或懸浮液。對於復原, 凍乾粉末用水性溶液再水合至合適體積(例如5 mg多肽/ml, 其便於靜脈內注射)。在一些實施例中, 凍乾粉末用磷酸鹽緩衝鹽水或生理食鹽水溶液再水合。可攪拌或渦旋混合物以促進再水合。復原步驟可在等於或高於複合物之脂質組分之相轉移溫度的溫度下進行。

在凍乾脂蛋白元-脂質粉末用具有合適pH值及重量莫耳滲透濃度之水性介質水合後, ApoA-I-脂質複合物可自發形成。在一些實施例中, 水合介質含有選自(但不限於)蔗糖、海藻糖及甘油之穩定劑。在一些實施例中, 將溶液加熱至高於脂質之轉移溫度之溫度若干次以形成複合物。脂

質與蛋白質之比率可為1:1至200:1(莫耳/莫耳)且較佳為3:1至2:1脂質:蛋白質(w/w)，更佳為2.7:1至2.1:1脂質:蛋白質(w/w)，例如2.7:1脂質:蛋白質(w/w)。使粉末水合以獲得5-30 mg/mL之最終複合物濃度(以蛋白質當量表示)。

在多種實施例中，可藉由於 NH_4HCO_3 水溶液中冷凍乾燥多肽溶液來獲得ApoA-I粉末。接著藉由使脂質粉末及ApoA-I粉末溶解於冰乙酸中來形成ApoA-I與脂質(例如鞘磷脂)之均質溶液。接著凍乾溶液，且藉由所得粉末於水性介質中水合來形成HDL樣脂蛋白元-脂質複合物。

在一些實施例中，藉由共凍乾磷脂與蛋白質溶液或懸浮液來形成ApoA-I-脂質複合物。凍乾ApoA-I及脂質(例如磷脂)於有機溶劑或有機溶劑混合物中之均質溶液，接著藉由凍乾粉末於水性緩衝液中水合而自發形成ApoA-I-脂質複合物。此方法中所用有機溶劑及溶劑混合物之實例包括(但不限於)乙酸、乙酸/二甲苯混合物、乙酸/環己烷混合物及甲醇/二甲苯混合物。

可表徵所得復原製劑之等分試樣以確認複合物具有所需粒徑分佈；例如HDL之粒徑分佈。用於表徵尺寸之例示性方法為凝膠過濾層析。一系列分子量及斯托克直徑已知的蛋白質以及人類HDL可用作校準管柱之標準物。

在其他實施例中，藉由使ApoA-I與美國專利公開案第2006/0217312號及國際公開案第WO 2006/100567號(PCT/IB2006/000635)中揭示之脂質複合來製備重組ApoA-I-脂質複合物，該等文獻之揭示內容以引用的方式併入本

文中。

美國專利第 6,004,925 號、第 6,037,323 號、第 6,046,166 號及第 6,287,590 號(其以全文引用的方式併入本文中)揭示用於製備具有與 HDL 類似之特徵之帶負電荷之脂蛋白複合物的簡單方法。此方法(其涉及共凍乾脂蛋白元及脂質於有機溶劑(或溶劑混合物)中之溶液且在凍乾粉末水合期間形成帶負電荷之脂蛋白複合物)具有以下優點：(1)該方法之步驟極少；(2)該方法使用廉價溶劑；(3)所包括之大部分或所有成分均用於形成設計之複合物，因此避免其他方法中普遍存在之起始物質浪費；(4)形成在儲存期間極穩定之凍乾複合物，使得所得複合物可在臨用前復原；(5)所得複合物在形成後及使用前通常無需進一步純化；(6)避免有毒化合物，包括清潔劑，諸如膽酸鹽；及(7)產生方法可易於按比例放大且適於 GMP 製備(亦即在無內毒素環境中)。

其他合適方法描述於美國公開申請案第 2006/0217312 號及國際公開案 WO 2006/100567(PCT/IB 2006/000635)中，各者之揭示內容以引用的方式併入本文中。

為使蛋白質及脂質組分之氧化最少，較佳在惰性氣體(例如氮氣、氬氣或氦氣)層下進行複合物形成過程中之一個、一個以上或所有步驟。

溶液中脂蛋白元-脂質粒子之蛋白質及脂質濃度可由此項技術中已知的任何方法量測，包括(但不限於)蛋白質及磷脂分析法、層析法(諸如 HPLC)、凝膠過濾、與各種偵測器(包括質譜分析、UV 或二極體陣列、螢光、彈性光散射

等)偶聯之GC。亦可由相同層析技術以及肽圖譜、SDS-PAGE凝膠電泳、ApoA-I之N端及C端定序以及用於測定脂質氧化之標準分析法測定脂質及蛋白質之完整性。

6.6 醫藥組合物

本發明涵蓋之醫藥組合物包含作為活性成分之帶負電荷之脂蛋白複合物於適於在活體內投與及傳遞之醫藥學上可接受之載劑中。因為肽可包含酸性及/或鹼性末端及/或側鏈，所以肽模擬脂蛋白元可以游離酸或游離鹼形式或醫藥學上可接受之鹽形式包括於組合物中。亦可使用經修飾之蛋白質，諸如醯胺化、醯化、乙醯化或聚乙二醇化蛋白質。醫藥組合物可視情況包含載有一或多種疏水性、親脂性或非極性活性劑之脂蛋白複合物，如以上章節6.2及6.3中所描述。

可注射組合物包括活性成分於水性或油性媒劑中之無菌懸浮液、溶液或乳液。組合物亦可包含調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。在一些實施例中，可注射組合物包含於磷酸鹽緩衝鹽水(10 mM磷酸鈉，80 mg/mL蔗糖，pH 8.2)中之帶負電荷之脂蛋白複合物。注射用組合物可以單位劑型存在(例如安瓿或多劑量容器中)且可包含添加之防腐劑。對於輸注，組合物可提供於由與帶負電荷之脂蛋白複合物相容之材料(諸如乙烯乙酸乙烯酯或此項技術中已知的任何其他相容材料)製成的輸注袋中。

合適劑型以每毫升約5毫克至約15毫克脂蛋白之最終濃度包含帶負電荷之脂蛋白複合物。在一特定實施例中，劑

型以每毫升約8毫克至約10毫克(較佳每毫升約8毫克)脂蛋白元A-I之最終濃度包含帶負電荷之脂蛋白複合物。

為使蛋白質及脂質組分之氧化最少，較佳在惰性氣體(例如氮氣、氬氣或氦氣)層下調配及/或填充醫藥組合物。

6.7 治療方法

本文中所描述之脂蛋白複合物(例如帶負電荷之脂蛋白複合物)及組合物用於脂蛋白複合物已證實適用之各種目的。即使在以顯著低於當前可用之治療方案所需之脂蛋白元量(每次投與20 mg/kg至100 mg/kg，每2至5天一次，1.4 g至8 g/平均體重人類)之劑量投與時，脂蛋白複合物(諸如帶負電荷之脂蛋白複合物)仍可有效地移動膽固醇。

因此，本發明之複合物及組合物尤其適用於治療或預防心血管疾病、病症及/或相關病狀。治療或預防個體之心血管疾病、病症及/或相關病狀之方法通常包含根據有效治療或預防特定適應症之方案向個體投與低(<15 mg/kg)劑量或量之本文中所描述之脂蛋白複合物或醫藥組合物。

脂蛋白複合物係以足以或有效提供治療效益之量投與。在治療心血管疾病、病症及/或相關病狀之情形中，若發生以下一或多個事件，則可推斷獲得治療效益：與基線相比膽固醇移動增加、動脈粥樣硬化斑體積減小、與基線含量相比游離膽固醇之高密度脂蛋白(HDL)部分增加，而平均血漿三酸甘油酯濃度未增加或肝轉胺酶(或丙胺酸轉胺酶)含量未增加超出正常範圍。完全治癒雖然理想但對於治療效益而言並非必需存在。

在一些實施例中，以每次注射約2 mg/kg ApoA-I當量至約12 mg/kg ApoA-I當量之劑量投與脂蛋白複合物。在一些實施例中，以約3 mg/kg ApoA-I當量之劑量投與脂蛋白複合物。在一些實施例中，以約6 mg/kg ApoA-I當量之劑量投與脂蛋白複合物。在一些實施例中，以約12 mg/kg ApoA-I當量之劑量投與脂蛋白複合物。

待治療個體為罹患或需預防心血管疾病、病症及/或相關病狀之個體。該等可用本文中所描述之脂蛋白複合物及組合物治療或預防之心血管疾病、病症及/或相關病狀之非限制性實例包括周邊血管疾病、再狹窄、動脈粥樣硬化及動脈粥樣硬化之多種臨床症狀，諸如中風、缺血性中風、短暫性缺血性發作、心肌梗塞、急性冠狀動脈症候群、心絞痛、間歇性跛行、嚴重肢體缺血、瓣膜狹窄及主動脈瓣硬化。個體可為具有急性冠狀動脈症候群(諸如心肌梗塞(伴有或不伴有ST升高)或不穩定絞痛)發作病史之個體。所治療個體可為任何動物，例如哺乳動物，尤其為人類。

在一個實施例中，該等方法涵蓋治療或預防心血管疾病之方法，其包含向個體投與在投與後不改變患者基線ApoA-I之量的本文中所描述之帶電荷脂蛋白複合物或組合物。

在其他實施例中，該等方法涵蓋治療或預防心血管疾病之方法，其包含向個體投與有效達成以下效果之量的本文中所描述之脂蛋白複合物(例如帶電荷複合物)或組合物：

在投藥後約兩小時游離或複合脂蛋白元血清含量比投藥前之基線(初始)含量高約5 mg/dL至100 mg/dL及/或在投藥後約24小時游離或複合脂蛋白元血清含量比投藥前之基線含量高約5 mg/dL至20 mg/dL。

在另一實施例中，該等方法涵蓋治療或預防心血管疾病之方法，其包含向個體投與有效達成以下效果之量的本文中所描述之脂蛋白複合物(例如帶電荷複合物)或組合物：在投藥後至少1天內HDL-膽固醇部分之循環血漿濃度比投藥前之初始HDL-膽固醇部分高至少約10%。

在另一實施例中，該等方法涵蓋治療或預防心血管疾病之方法，其包含向個體投與有效達成以下效果之量的本文中所描述之脂蛋白複合物(例如帶電荷複合物)或組合物：在投藥後5分鐘至投藥後1天內HDL-膽固醇部分之循環血漿濃度介於30 mg/dL與300 mg/dL之間。

在另一實施例中，該等方法涵蓋治療或預防心血管疾病之方法，其包含向個體投與有效達成以下效果之量的本文中所描述之脂蛋白複合物(例如帶電荷複合物)或組合物：在投藥後5分鐘至投藥後1天內膽固醇酯之循環血漿濃度介於30 mg/dL與300 mg/dL之間。

在另一實施例中，該等方法涵蓋治療或預防心血管疾病之方法，其包含向個體投與有效達成以下效果之量的本文中所描述之脂蛋白複合物(例如帶電荷複合物)或組合物：在投藥後至少1天內糞便膽固醇排泄量比投藥前之基線(初始)量增加至少約10%。

本文中所描述之帶負電荷之脂蛋白複合物或組合物可單獨使用或與用於治療或預防前述病狀之其他藥物一起以組合療法使用。該等療法包括(但不限於)同時或依序投與相關藥物。舉例而言，在高膽固醇血症(諸如家族性高膽固醇血症(同種接合子或異種接合子))或動脈粥樣硬化之治療過程中，帶電荷脂蛋白調配物可與當前使用之任一或多種降膽固醇療法(例如膽汁酸樹脂、菸酸、士他汀、膽固醇吸收抑制劑及/或纖維酸酯)一起投與。該組合方案可產生尤其有益之治療作用，因為各藥物作用於膽固醇合成及轉運中之不同目標；亦即膽汁酸樹脂影響膽固醇再循環、乳糜微粒及LDL群體；菸酸主要影響VLDL及LDL群體；士他汀抑制膽固醇合成、減少LDL群體(且可能增加LDL受體表現)；而本文中所描述之脂蛋白複合物(包括帶負電荷之脂蛋白複合物)影響RCT，增加HDL且促進膽固醇流出。

在另一實施例中，本文中所描述之脂蛋白複合物(包括帶負電荷之脂蛋白複合物)或組合物可與纖維酸酯結合用於治療或預防冠心病；冠狀動脈病；心血管疾病、再狹窄、血管或血管周疾病；動脈粥樣硬化(包括治療及預防動脈粥樣硬化)。例示性調配物及治療方案描述於下文中。

本文中所描述之脂蛋白複合物(包括帶負電荷之脂蛋白複合物)或組合物可以增加小型HDL部分(例如前- β -HDL部分、前- γ -HDL部分及類前- β -HDL部分、 α HDL部分、HDL3及/或HDL2部分)之劑量投與。在一些實施例中，劑量有效

達成動脈粥樣硬化斑減少，如由例如成像技術量測，諸如磁共振成像(MRI)或血管內超音波(IVUS)。IVUS追蹤之參數包括(但不限於)動脈粥樣瘤體積相較於基線之變化百分比及總動脈粥樣瘤體積變化。MRI追蹤之參數包括(但不限於)IVUS追蹤之參數以及斑塊之脂質組成及鈣化。

可使用患者作為其自身對照來量測斑塊消退(時間0對末次輸注結束時；或末次輸注後數週內；或療法開始後3個月、6個月或1年內之時間t)。

最佳可由非經腸投藥途徑實現投藥，包括靜脈內(IV)、肌肉內(IM)、皮內、皮下(SC)及腹膜內(IP)注射。在某些實施例中，用灌注器、滲濾器或導管投藥。在一些實施例中，藉由注射、皮下可植入泵或積存製劑以達成與經由非經腸投藥獲得者相等之循環血清濃度之量投與脂蛋白複合物，例如帶負電荷之脂蛋白複合物。複合物亦可吸附於例如血管支架或其他裝置中。

可經由多種不同治療方案進行投藥。舉例而言，可在1天內週期性投與若干次靜脈內注射，累積總注射體積不可達到每日中毒劑量。該等方法包括以6、7、8、9、10、11或12天之時間間隔投與脂蛋白複合物。在一些實施例中，以一週之時間間隔投與脂蛋白複合物。當更頻繁地投與脂蛋白複合物時，該等方法可視情況包括誘導期。

該等方法可進一步包括依上述任一時間間隔投與脂蛋白複合物4、5、6、7、8、9、10、11或12次。舉例而言，在一個實施例中，投與脂蛋白複合物6次，每次投藥之間間

隔1週。在一些實施例中，可連續注射投藥，接著停止6個月至1年，然後再開始另一組連續注射。接著可每年或每3至5年維持連續注射。連續注射可進行1天(進行輸注以維持指定複合物之血漿含量)、若干天(例如在8天期間注射4次)或若干週(例如在4週期間注射4次)完成，接著在6個月至1年後再重新開始。對於慢性病狀，可以不間斷投藥。

在另一替代例中，可投與遞增劑量，從投與約1至5次每次投藥介於50-200 mg之間的劑量起始，接著重複投與每次投藥介於200 mg與1 g之間的劑量。視患者需要而定，可由持續1小時以上之緩慢輸注、1小時或1小時以下之快速輸注或單次快速注射進行投藥。

可使用用於測定LD50(50%群體致死劑量)及ED50(50%群體有效治療劑量)之標準醫藥程序測定細胞培養物或實驗動物中各種脂蛋白複合物之毒性及治療功效。毒性作用與治療作用之間的劑量比為治療指數，且其可表示為比率LD50/ED50。展現較大治療指數之脂蛋白複合物(諸如帶負電荷之脂蛋白複合物)較佳。可追蹤之參數之非限制性實例包括肝功能轉胺酶(不超過2倍正常基線含量)。此指示過多膽固醇移至肝臟且無法同化如此大量的膽固醇。亦可監測對紅血球之作用，如自紅血球移動膽固醇使得紅血球變脆弱或影響其形狀。

可在醫學行為(例如預防性治療)前數天至數週，或在醫學行為期間或之後治療患者。投藥可與另一種侵襲性療法(諸如血管成形術、頸動脈切除術、旋轉刀切除術

(rotohlader)或器官移植(例如心臟、腎臟、肝臟等))相伴或同時進行。

在某些實施例中，向患者投與帶負電荷之脂蛋白複合物，該患者之膽固醇合成由士他汀或膽固醇合成抑制劑控制。在其他實施例中，向正在用結合樹脂(例如半合成樹脂，諸如消膽胺)或纖維(例如植物纖維)治療之患者投與帶負電荷之脂蛋白複合物以截獲膽汁鹽及膽固醇、增加膽汁酸排泄及降低血液膽固醇濃度。

6.8 其他用途

本文中所描述之脂蛋白複合物(例如帶負電荷之脂蛋白複合物)及組合物可用於活體外分析法中以量測血清HDL，例如用於診斷目的。因為ApoA-I、ApoA-II及ApoA-III與血清之HDL組分締合，因此帶負電荷之脂蛋白複合物可用作HDL群體以及前- β 1 HDL及前- β 2 HDL群體之「標記」。此外，帶負電荷之脂蛋白複合物可用作在RCT中有效之HDL亞群之標記。為此，帶負電荷之脂蛋白複合物可添加至患者血清樣品中或與患者血清樣品混合；在適當培育時間後，可藉由偵測所併入之帶負電荷之脂蛋白複合物來分析HDL組分。此可使用經標記之帶負電荷之脂蛋白複合物(例如放射性標記、螢光標記、酶標記、染料等)，或藉由使用對帶負電荷之脂蛋白複合物具有特異性之抗體(或抗體片段)之免疫分析法完成。

或者，經標記之帶負電荷之脂蛋白複合物可用於成像程序(例如CAT掃描、MRI掃描)中以觀測循環系統，或監測

RCT，或觀測脂肪紋、動脈粥樣硬化病灶及其類似物處HDL之積聚，其中HDL應執行膽固醇流出之功能。

與某些proApoA-I-脂質複合物之製備及表徵有關之實例及資料描述於美國專利公開案第2004/0067873號中，其揭示內容以全文引用的方式併入本文中。

使用某些proApoA-I-脂質複合物於動物模型系統中獲得之資料描述於美國專利公開案第2004/0067873號中，其揭示內容以全文引用的方式併入本文中。

7. 實例1：ApoA-I表現系統之開發

7.1 人類ApoA-I於中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中之選殖及表現

7.1.1 製備ApoA-I表現載體

自NCBI(P02647)獲得preproApoA-I基因序列且添加側接序列以易於選殖及改良表現。合成具有側接序列之編碼preproApoA-I之DNA且將其選殖至Bluescript KS+載體中。5'側接序列含有最佳化克紫克轉譯序列(Kozak translation sequence)。用Hind III及Bgl II限制酶自Bluescript KS+載體切除preproApoA-I插入物。此片段經凝膠純化且接合至帶有以下遺傳元件之反轉錄病毒表現載體中：融合至莫洛尼氏鼠肉瘤病毒5' LTR(Moloney Murine Sarcoma virus 5' LTR)之人類細胞巨大病毒啟動子、MoMuLV/SV封裝區域、即刻早期猿細胞巨大病毒啟動子、多選殖位點、來自MoMuLV之3' LTR及細菌複製起點及 β -內醯胺酶基因。經基因及側接區域對所得構築體之純系進行定序。基於與預

估DNA序列之一致性選擇最終純系(純系17)。接著使用與水泡性口炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus)包膜糖蛋白之表現質體共轉染之293GP細胞製備反轉錄病毒載體以進行轉導。自共轉染細胞回收且濃縮之上清液用於以下章節7.1.2中描述之CHO-S轉導步驟。

7.1.2 產生用於表現ApoA-I之哺乳動物細胞株

使用以上章節7.1.1中描述之反轉錄病毒載體對適合於在無血清培養基中生長之中國倉鼠卵巢細胞(CHO-S)進行3輪轉導(1X、2X及3X)。在各輪轉導後擴增彙集之群體以進行極冷保藏且提交細胞樣品以進行基因複本分析。基因複本指數展示於下表2中。在一式兩份的125 mL燒瓶中於16天分批補料測試中分析3X轉導之細胞株之生產率。結果展示於表3中。

表2 ApoA-I表現細胞株之基因複本指數結果		
轉導輪次	轉導後之細胞株名稱	基因複本指數
1	* CHO-S-ApoA-I-R(1X)	2.53
1	* CHO-S-ApoA-I-R(1X)	
2	** CHO-S-ApoA-I-R(2X)	5.50
2	** CHO-S-ApoA-I-R(2X)	
3	* CHO-S-ApoA-I-R(3X)	7.23

*在進行至產生2X細胞株前合併1X細胞株

**在進行至產生3X細胞株前合併2X細胞株

表 3

CHO-S-ApoA-I-R(3X)之分批補料生產率資料

3X彙集群體	天數					
	2	4	6	8	10	12
VCD*($\times 10^5$ 個細胞/毫升)	10.49	**	66.33	69.10	74.73	51.74
$\mu\text{g/mL}$ (ELISA)	89	459	1339	2755	2775	2658

*活細胞密度

**由於收集誤差未進行d4細胞計數

7.1.3 表現ApoA-I之細胞株之穩定性

對CHO-S-ApoA-I-R(3X)純系17(產生ApoA-I之種源細胞庫(master cell bank))進行非GMP表徵研究以評估其在長期培養期間生存率、生長速率、基因插入物之保存及一致產物分泌方面之穩定性。

細胞株自種源細胞庫解凍且於125 mL搖瓶中使用PF CHO LS培養基(HyClone, Logan UT)培養。藉由自第0代連續繼代至第43代來連續培養細胞。冷凍第4、8、14、19、25、31、36及43代細胞樣品。在培養結束時，解凍來自所有世代之細胞樣品且用於進行最後一輪培養以比較相同實驗中不同世代之細胞株之ApoA-I蛋白質產生。在第12天使用逆相HPLC分析測試來自各樣品之上清液以測定ApoA-I產量。發現對於各樣品，ApoA-I濃度為1259 mg/L至1400 mg/L(圖2)。

為比較基因插入物之穩定性，使用第0、4、14、25、36及43代之CHO細胞樣品分離DNA。對基因組DNA使用即時PCR以測定各樣品之遺傳插入物數目。如表3所示，基於

第0代與第43代之間的重疊標準差，基於PCR之複本數指數並不顯著不同。發現自種源細胞庫細胞株之ApoA-I產生及基因複本指數值在所測試之43代內穩定。

表 4

基因複本指數之穩定性

世代	基因複本指數	標準差
0	7.87	0.25
4	7.80	0.27
14	7.80	0.27
25	7.97	0.25
36	7.90	0.17
43	8.20	0.27

7.2 細胞生長及收集 ApoA-I

7.2.1 按比例放大至接種量及200 L生物反應器生產

經來自種源細胞庫之人類ApoA-I基因穩定轉染之CHO-S細胞之小瓶於37°C水浴中解凍且添加至含有35 mL HyQ PF-CHO LS細胞培養基之單一搖瓶(250 mL)(Thermo Fisher Scientific)中。使用血球計測定初始細胞計數為 2.48×10^5 個細胞/毫升且生存率為93.8%。接著將培養物置放於保持在37°C下濕潤、5% CO₂環境中之培育箱內的Orbit震盪器(90 rpm)上。繼代培養步驟以約 1.6×10^5 個細胞/毫升之接種密度為目標。燒瓶中第4天細胞計數為 15.01×10^5 個細胞/毫升且生存率百分比為93.9%。250 mL燒瓶繼代培養至1 L燒瓶。來自1 L燒瓶之第3天平均活細胞計數為 13.56×10^5 個細胞/毫升且生存率為95.3%。1 L燒瓶繼代培養至具有10 L拋棄式搖擺袋(Wave Bag)之搖擺式生物反應器系統20EH(Wave Bioreactor System 20EH)(GE Healthcare

Bioscience Bioprocess Corp, Somerset, NJ), 初始培養體積及初始目標細胞密度分別為1000 mL及 1.75×10^5 個細胞/毫升。搖擺式生物反應器操作設定為37°C培育溫度, 15.0 cpm搖桿速率, 10.9°搖擺角及通風氣體(氣體流動速率為0.25公升/分鐘)中5.0% CO₂濃度。在培養3天後, 搖擺袋中活細胞密度為 10.73×10^5 個細胞/毫升且添加新鮮HyQ PF-CHO LS使培養物體積為5000 mL。再過3天後, 活細胞密度為 13.25×10^5 個細胞/毫升且將搖擺袋中之內含物轉移至30 L生物反應器中。30 L生物反應器中溫度、pH值、溶氧、壓力及攪拌速率之操作設定值分別為37°C、pH 7.0、40%空氣飽和、1 psig壓力及50 rpm攪拌速率。

在第3個培養日, 30 L生物反應器中之活細胞密度為 10.80×10^5 個細胞/毫升, 其足以用 2.40×10^5 個細胞/毫升之初始目標密度接種200 L生物反應器。轉移30 L生物反應器之所有內含物且接種後重量、細胞密度及生存率分別為134.5 Kg、 2.37×10^5 個細胞/毫升及90.9%。200 L生物反應器中溫度、pH值、溶氧、壓力及攪拌速率之操作設定值分別為37°C、pH 7.0、40%空氣飽和、1 psig壓力及35 rpm攪拌速率。在第3天, 細胞密度為 15.71×10^5 個細胞/毫升, 其足以向生物反應器中添加60 L(v/v)完全培養基(AGT CD CHO 5X, Invitrogen)及200 mM L-麩醯胺酸(最終濃度10 mM)溶液。在第8天及第12天, 葡萄糖含量降至低於5 g/L, 因而開始添加3 g/L葡萄糖(20%)溶液。活細胞密度在第9天達到最大值 33.20×10^5 個細胞/毫升, 其生存率為

92.5%。在第13天在78.5%細胞生存率下自生物反應器收集所需物。整個培養期內培養物之細胞計數及生存率展示於圖3A中且整個培養期內培養基中之ApoA-I濃度展示於圖3B中。

7.2.2 收集、細胞分離及細胞儲存

藉由使生物反應器內含物相繼通過雙重Cuno(Rutherford, NJ, USA)60M02最大化過濾器及Millipore 0.22 μm Opticap(Billerica, MA, USA)進入200 L袋中來自生物反應器收集培養基。接著將澄清培養基在2°C-8°C下儲存直至進行分配操作。使澄清培養基經Millipore 0.22 μm 過濾器(Billerica, MA, USA)過濾且分配至2 L無菌PETG瓶(ThermoFisher, Marietta, OH, USA)中，接著在-20°C下冷凍直至獲准進行裝運。

8. 實例2：ApoA-I純化系統之開發

8.1 材料及方法

表現、初級分離及調節。藉由在環境溫度下儲存來解凍如實例1中所描述獲得之ApoA-I澄清細胞生長培養基(約1.8 L)。藉由用1 M HCl使pH值降低至 5.3 ± 0.2 來調節解凍之培養基以進行陰離子交換層析。

ApoA-I之純化。以20 cm床高度填充之Q-瓊脂糖凝膠FF(GE Healthcare)陰離子交換柱用TAMP A緩衝液(20 mM磷酸鈉，pH 5.3)平衡。當管柱流出物之pH值為約5.5時，判定平衡完成。將經調節之濾液在3.7 cm/min流動速率下以25-35 g ApoA-I/L陰離子交換樹脂裝載於管柱上。洗滌

ApoA-I，使其於 TAMP A 流過液 (flow-through) 中通過管柱，收集該流過液。

用 1 M NaOH 將來自陰離子交換柱之含有 ApoA-I 之流過液之 pH 值調節至 8.0 ± 0.2 。接著使溶液在約 12.5 L/h/m^2 流動速率下經 $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ Planova 20N 過濾器 (Asahi Kasei Medical) 過濾以移除病毒及病毒粒子。

用 TAMP D 緩衝液 (20 mM 碳酸銨，pH 9.5) 洗滌床高度為 25 cm 之 Source 30 逆相層析管柱直至平衡，此時管柱流出物達到 pH 9.5。將來自病毒過濾步驟之含有 ApoA-I 之濾液以約 2.8 cm/min 之流動速率裝載於管柱上。樣品中之 ApoA-I 吸附至基質且用於 TAMP D 緩衝液中之 35%-50% 乙腈梯度溶離。

於 TAMP E 緩衝液 (100 mM 碳酸銨，pH 9.5) 中洗滌以 25 cm 床高度填充之逆相二氧化矽 C18 管柱 ($300\text{\AA}$ $10 \text{ }\mu\text{m}$) 直至平衡，此時管柱流出物達到 pH 9.5。接著以 4.7 g ApoA-I/L 基質裝載 C18 管柱。以於 TAMP E 緩衝液中之 40%-50% 乙腈梯度溶離吸附至管柱基質之 ApoA-I。

藉由彙集且濃縮自 C18 管柱溶離之含有 ApoA-I 之部分約 2.5 倍，接著使濃縮物針對 15 倍體積之 TAMP C 緩衝液 (3 mM 磷酸鈉，pH 8) 透濾來自該等部分移除乙腈。使用稀磷酸使經透濾之 ApoA-I 溶液之 pH 值降低至約 6.0，接著使其通過 Mustang Q 陰離子交換膜 (Pall Life Sciences) 以移除 DNA 及宿主細胞蛋白質。使 Mustang Q 濾液針對 5 倍體積之 TAMP C 緩衝液透濾。

接著使用分子量截止點為10,000道爾頓之聚醚砜膜 (Filtron Omega系列)對經透濾之濾液進行最後超濾使得膜滯留28,000道爾頓ApoA-I。每公升蛋白質溶液含有7.8-17 g純ApoA-I，如藉由掃描SDS-PAGE凝膠且量測經純化之ApoA-I色帶區域之強度與所有色帶之總強度之比率測定。

8.2 結果

ApoA-I之表徵。藉由SDS-PAGE分析ApoA-I產物之純度大於99%，具有少量DNA及宿主細胞蛋白質且無可偵測量之截短ApoA-I。參見圖4。

9. 實例3：脂蛋白複合物組分之最佳化

9.1 製備脂蛋白元及磷脂組分

proApoA-I：蛋白質proApoA-I係由Unité de Biotechnologie, Institut Meurice, Hte Ecole Lucia De Brouckère, 1 Avenue Emile Gryzon, B-1070 Anderlecht, Belgium於凍乾之含有約90 mg蛋白質之個別100 mL燒瓶中供應。批號為20060202。蛋白質保持在約4℃下直至使用。在凍乾前，proApoA-I含量為3.225 mg/mL且尿素含量為約0.011 mg/mL。藉由將約630 mg proApoA-I溶解於25.6 mL乙酸/水(5%)中來製備proApoA-I溶液。溶液之最終濃度為25 mg/mL。

ApoA-I：如以上實例1中所描述製備ApoA-I。

鞘磷脂：卵鞘磷脂 (Coatsome® NM-10) 係由NOF Corporation, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-Shi, 660-0095, Japan供應。批號為0502ES1。鞘磷脂保持在約-20℃下直至

使用。鞘磷脂之純度為99.1%。藉由將799.4 mg經純化之鞘磷脂溶解於16 mL乙酸/水(5%)中使得最終濃度為50 mg/mL來製備鞘磷脂溶液。

磷脂醯甘油：呈鈉鹽形式之1,2-二軟脂醯基-SN-甘油-3-磷脂醯甘油(DPPG-Na, Coatsome® MG-6060 LS)係由NOF Corporation, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-Shi, 660-0095, Japan供應。批號為0309651L。DPPG-Na保持在約-20℃下直至使用。DPPG-Na之純度為99.2%。藉由將49.1 mg DPPG-Na溶解於1 mL乙酸/水(5%)中使得最終濃度為50 mg/mL來製備DPPG-Na溶液。

磷脂醯膽鹼：二-軟脂醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)係自商業來源獲得。

9.2 製備脂蛋白複合物

製備以下脂蛋白複合物：

(a) 中性脂蛋白複合物：

- a. 配方A：proApoA-I及SM，蛋白質：磷脂重量比為1:2.5；
- b. 配方B：proApoA-I及SM，蛋白質：磷脂重量比為1:2.7；
- c. 配方C：proApoA-I及SM，蛋白質：磷脂重量比為1:3.1；
- d. 配方D：proApoA-I、SM及DPPC，脂蛋白:總磷脂重量比為1:2.7且SM:DPPC重量比為50:50；
- e. 配方E：ApoA-I及SM，蛋白質：磷脂重量比為

1:2.7 ;

(b)帶負電荷之脂蛋白複合物：

- a. 配方 F：proApoA-I、SM、DPPC及DPPG，脂蛋白：總磷脂重量比為 1:2.7 且 SM:DPPC:DPPG 重量比為 48:48:4；
- b. 配方 G：proApoA-I、SM、DPPC及DPPG，脂蛋白：總磷脂重量比為 1:2.7 且 SM:DPPC:DPPG 重量比為 73:23:4；
- c. 配方 H：ApoAI、SM及DPPG，脂蛋白：總磷脂重量比為 1:2.7 且 SM:DPPG 重量比為 97:3；
- d. 配方 I：ApoAI、SM及DPPG，脂蛋白：總磷脂重量比為 1:3.0 且 SM:DPPG 重量比為 97:3；
- e. 配方 J：ApoAI、SM及DPPG，脂蛋白：總磷脂重量比為 1:3.3 且 SM:DPPG 重量比為 97:3。

9.3 脂蛋白複合物之形成速率及均質性

藉由將樣品注射至HPLC系統中以檢驗脂蛋白複合物之尺寸及分佈來測試配方A至J之脂蛋白複合物之形成。複合物係藉由共均質化產生且在指定時間取樣。

圖5展示包含不同脂蛋白:SM重量比之配方A至C及包含 1:2.7 比率之脂蛋白及中性磷脂(其中中性磷脂為 50:50 SM:DPPC)之配方D之中性脂蛋白複合物之例示性HPLC層析圖。脂蛋白:SM重量比等於 1:2.7 為最佳。配方D(其含有 SM與DPPC之混合物)顯示弱複合物形成。

添加磷脂醯膽鹼作為第二中性磷脂引起緩慢且不完全的

複合物形成。圖6展示配方D之脂蛋白複合物在10、20、30及60分鐘時之HPLC層析圖。相對比而言，如圖7所示，配方B快速形成複合物。

向SM及DPPC中添加帶負電荷之磷脂DPPG引起甚至更弱的複合物形成，如圖8中配方F之脂蛋白複合物在20、40、60及120分鐘時之HPLC層析圖所示。

如圖9所示，僅含有SM作為磷脂之脂蛋白複合物(蛋白質與脂質重量比為1:2.7)與具有相同蛋白質與脂質重量比但含有DPPC及/或DPPG之脂蛋白複合物相比形成更多的前-B HDL複合物且更快地形成。因此，僅包含SM作為中性脂質之脂蛋白複合物與除SM外亦包含DPPC之複合物(添加或不添加DPPG)相比以更快的速率形成更均質的脂蛋白複合物。

最終，脂蛋白元：磷脂重量比介於1:2.7與1:3之間(其中磷脂部分含有重量比為97:3之SM與DPPG)的帶負電荷之脂蛋白複合物與脂蛋白元：磷脂重量比為1:3.3之複合物及不帶電荷之脂蛋白複合物相比展示最佳均質性且無游離脂質峰。參見圖10，其展示配方E、H、I及J之HPLC層析圖。選擇配方B及H之脂蛋白複合物於動物中作進一步研究(實例6)且基於動物研究之結果，選擇配方H之脂蛋白複合物於人類患者中進行臨床評估(實例6及8)。

10. 實例4：使用基於熱循環之方法形成脂蛋白複合物

10.1 用於製備 ApoA-I/DPPG/鞘磷脂複合物之程序之概述

藉由在2-8°C下解凍約24-96小時來製備蛋白質濃度為1至30 mg/mL，通常為5至20 mg/mL之ApoA-I於磷酸鹽緩衝液(pH 7-9)中之冷凍溶液且稱重。向ApoA-I溶液中添加磷酸二氫鈉及磷酸氫二鈉使最終肽濃度為10 mM(於pH 7.4緩衝液中)。

藉由使磷酸鹽緩衝液(10 mM磷酸鈉，pH 8.0)溫熱至50°C之目標來製備DPPG溶液。將DPPG粉末(NOF Corporation)在環境溫度下解凍至少1.5小時，接著稱重且添加至緩衝液容器中。接著使用ULTRA-TURRAX®高效能分散機(IKA® Works, Inc.)在50°C之溫度下分散DPPG。分散後，將DPPG懸浮液及ApoA-I溶液加熱至57°C。組合DPPG懸浮液及ApoA-I溶液且在氮氣下57°C下加熱30分鐘。使此預複合物溶液冷卻至室溫。

將鞘磷脂(SM)粉末(NOF Corporation)在環境溫度下解凍，接著稱重置於玻璃槽中。將磷酸鹽緩衝液(10 mM磷酸鈉，pH 8.0)加熱至50°C，與SM粉末組合，得到220 mg/mL之SM濃度。使用ULTRA-TURRAX®將SM粉末分散於懸浮液中且使分散液冷卻至4°C，接著使其通過均質器。藉由動態光散射(DLS)監測到SM粒子之 ξ (Z)平均尺寸為55至70 nm(使用強度量測)。此可例如使用Nano DeBee均質器在32000 +/- 3000巴下實現，其中入口溫度為10°C-18°C且出口溫度較佳為30°C-40°C(且不超過59°C)，產生Z-平均尺寸為58 nm之粒子。

為進行複合，將ApoA-I/DPPG混合物及SM分散液分別溫

至57℃。在初始溫度設定值57℃下，將溫熱的SM分散液添加至ApoA-I/DPPG混合物中。攪拌組合後，使溶液冷卻至37℃，接著進行一系列熱循環(57℃至37℃)以形成ApoA-I/DPPG/SM複合物。在各溫度之間的接觸時間為5分鐘及30分鐘的情況下繼續此加熱-冷卻過程。重複加熱-冷卻循環直至大部分蛋白質組分併入脂蛋白複合物中。藉由凝膠滲透層析(GPC)監測熱循環期間複合物之尺寸及分佈。

根據上文描述(及圖11中說明)之程序製備ApoA-I/DPPG/SM複合物。ApoA-I蛋白質具有對應於圖1中描繪之序列之位置25至267之胺基酸序列。複合物含有重量比為97:3之鞘磷脂(SM)及1,2-二-十六醯基-sn-甘油-3-磷醯基-(1'-rac-甘油)(二軟脂醯基磷脂醯甘油或DPPG)。ApoA-I蛋白質與總脂質之比率為1:2.7重量/重量(w/w)，其等於1:108莫耳比。組合之脂質及蛋白質組分使用如圖5中所描繪配置之熱交換器在57℃與37℃之間循環(各溫度下5分鐘)，該熱交換器包括左側Lauda Ecoline Star版26LE型水浴(樣品於其中進行熱循環)及右側殼管熱交換器(EF-C50-HE型)(其盛裝體積為18 ml)，兩者由蠕動泵連接。

將180 mg DPPG添加至2.82公克10 mM磷酸鹽緩衝液(pH 8.0)中。用ULTRA-TURRAX®分散機在50℃下使懸浮液分散10分鐘。將22公克SM粉末與78公克10 mM磷酸鹽緩衝液(pH 8.0)組合。用ULTRA-TURRAX®分散機在50℃下使懸浮液分散20至40分鐘。使用平均粒徑設定為60 nm之NanoBEE對SM進行均質化。使DPPG、SM及蛋白質達到

57°C。在57°C下，將18 mg(0.3 ml)DPPG添加至含214 mg ApoA-I蛋白質之10 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中。在57°C下30分鐘後，添加559 mg SM粒子(2.54 ml)。接著使此溶液經熱循環以形成複合物。

展示30分鐘、60分鐘、120分鐘、180分鐘及210分鐘熱循環後ApoA-I/DPPG/SM複合物形成之凝膠滲透層析分別展示於圖13A-13E中。在較長循環時間下產生較緻密之複合物，如由主要GPC峰之銳度增加證實。對應於未複合蛋白質之峰亦隨時間推移而消失。

10.2 形成ApoA-I/鞘磷脂複合物

根據上述程序但在不預複合ApoA-I與DPPG下製備ApoA-I/SM複合物。蛋白質組分為5 ml ApoA-I(濃度為8.9 mg/mL)且脂質組分為0.5 ml卵鞘磷脂(220 mg/mL)，其已懸浮於10 mM磷酸鹽緩衝液(pH 8.0)中且經均質化以形成60 nm脂質粒子。將蛋白質及脂質組分在50°C下以1:2.5比率(重量：重量)混合。使用如圖5中描繪之熱循環設備使所得懸浮液經熱循環18小時(108次循環且循環時間為10分鐘)。凝膠滲透層析表明所形成之蛋白質/脂質複合物為基本上均質的(參見圖14之GPC層析圖)。

10.3 形成ApoA-I/DPPG/N-軟脂醯基-4-羥基二氫鞘胺醇-1-磷酸膽鹼(植物鞘磷脂)複合物

根據上述程序製備ApoA-I/DPPG/植物鞘磷脂複合物。使植物鞘磷脂粒子均質化為約183 nm尺寸(藉由DLS量測)且添加至7.8 g/L蛋白質：DPPG混合物中使最終蛋白質與脂

質(SM及DPPG)之比率為1:2.7。使含有N-軟脂醯基-4-羥基二氫鞘胺醇-1-磷酸膽鹼(植物鞘磷脂)及蛋白質：DPPG組分之懸浮液經熱循環(6次循環，37℃下10分鐘且57℃下10分鐘，總共2小時)。凝膠滲透層析表明所形成之蛋白質/脂質複合物為基本上均質的(參見圖15之GPC層析圖)。

10.4 形成ApoA-I/DPPG/合成軟脂醯基鞘磷脂

如下製備ApoA-I/DPPG/合成軟脂醯基鞘磷脂複合物。混合8.8 mL合成軟脂醯基鞘磷脂(220 mg/mL)於10 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中之溶液直至達到3300 nm粒徑。ApoA-I(945 mg，14 mg/ml)與0.03重量% DPPG(60 mg/ml)組合且在50℃下加熱30分鐘。將合成軟脂醯基鞘磷脂微胞與蛋白質/DPPG複合物組合，脂蛋白元：磷脂重量比為1:2.7。使蛋白質及脂質之懸浮液經熱循環，每10分鐘交替地在37℃及57℃下進行加熱-冷卻循環，總共進行240分鐘或直至獲得適當粒徑分佈。藉由GPC監測熱循環期間複合物之尺寸及分佈。在複合後，使濃度達到8.0 mg ApoA-I/ml，接著向複合物中添加蔗糖(40 mg/ml)及甘露醇(20 mg/ml)以達成等滲性。藉由GPC分析脂蛋白複合物且發現其基本上均質(參見圖16之GPC層析圖)。

10.5 形成ApoA-I/DPPG/植物鞘磷脂

如下製備ApoA-I/DPPG/植物鞘磷脂複合物。將2.0 mL植物鞘磷脂(220 mg/mL)於10 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中之溶液在50℃下於ULTRA-TURRAX®中分散40分鐘直至達到990 nm粒徑。將ApoA-I(15.6 mg，濃度為7.8 mg/ml)與0.03

重量% DPPG(60 mg/ml)組合且在57°C下加熱30分鐘。將植物鞘磷脂溶液與蛋白質/DPPG混合物組合，脂蛋白元：磷脂重量比為1:2.7。接著使蛋白質及脂質之懸浮液經熱循環，每10分鐘交替地在37°C及57°C下進行加熱-冷卻循環，總共進行240分鐘或直至獲得適當粒徑分佈。藉由GPC量測脂蛋白複合物群體且發現其均質度為約92.6%(參見圖17中之GPC層析圖)。

10.6 與ApoA-I肽形成複合物

使用 ApoA-I 肽 (H-Lys-Leu-Lys-Gln-Lys⁵-Leu-Ala-Glu-Leu-Leu¹⁰-Glu-Asn-Leu-Leu-Glu¹⁵-Arg-Phe-Leu-Asp-Leu²⁰-Val-Inp²²-OH ; SEQ ID NO:4) 溶液如上文所描述製備 ApoA-I 肽、DPPG及鞘磷脂之複合物。磷脂組分由卵鞘磷脂(SM)、1,2-二軟脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(二軟脂醯基磷脂醯膽鹼，DPPC)及1,2-二軟脂醯基-sn-甘油-3-[磷醯基-rac-(1-甘油)](二軟脂醯基磷脂醯-甘油，DPPG)組成，重量比為48.5:48.5:3。肽與總磷脂複合物之比率為1:2.5(w/w)。藥物複合物為CER-522複合物於磷酸鹽緩衝鹽水(12 mM磷酸鈉、130 mM氯化鈉，pH 8.2)中之溶液。藉由使起始溶液在50°C與37°C之間熱循環2小時(流動速率1 ml/min)來形成複合物。

凝膠滲透層析表明所形成之蛋白質/脂質複合物為基本上均質的，其中大多數蛋白質已併入脂蛋白複合物中(參見圖18之GPC層析圖)。

10.7 脂質粒徑及熱循環次數對複合物形成之影響

研究脂質粒徑及熱循環次數對粒徑之影響。藉由使SM溶液單程通過NanoBEE來產生四種不同起始脂質粒徑(ξ 平均值為85 nm、77 nm、66 nm及60 nm)之製劑(分別為圖19A至19D)。分析每一次通過NanoBEE之溶液之 ξ 平均值。脂質粒徑在每一次通過NanoBEE後減小且在獲得所需尺寸時收集脂質粒子。在章節10.1之複合物形成方法中測試4種不同脂質粒徑(進行5次或7次循環，在37°C下3分鐘且在57°C下10分鐘)。

當將脂質組分與蛋白質組分混合時，所得懸浮液為渾濁的。隨著複合物形成，渾濁度降低且溶液變得更透明。

5次循環後，自60 nm脂質粒子產生之複合物之懸浮液最透明。GPC層析圖(圖20A至20D)顯示所有樣品中之完全或幾乎完全複合，如由主峰之均質性證明。當以66 nm脂質粒子為起始物質時，所得脂蛋白複合物之懸浮液中不存在可由GPC偵測之未複合蛋白質，表明在5次循環後所有蛋白質均與脂質複合且所得複合物之純度為98%。7次循環後，所有四種懸浮液均變得更透明，表明複合程度更大。使用60 nm脂質粒子製備之懸浮液呈現最高澄清度。

在另一研究中，使用章節10.1中描述之方法使450 nm及40 nm SM粒子與ApoA-I及DPPG複合。使用450 nm SM粒子作為脂質組分時，大部分(但並非所有)ApoA-I併入脂蛋白複合物中，如圖21A之GPC層析圖所示(9.8分鐘峰)。使用40 nm SM粒子作為脂質組分時，併入脂蛋白複合物中之ApoA-I部分少得多，如圖21B之GPC層析圖所示(9.551分鐘

峰)。

10.8 起始溫度對複合物形成之影響

研究初始熱循環溫度對複合物形成之影響。如章節10.1中所描述製備 ApoA-I/DPPG/SM複合物，例外為將脂質組分及蛋白質組分溫熱至37°C而非57°C且在該溫度下組合。所得複合物之GPC層析圖展示於圖22中。與在57°C下起始熱循環時相比，併入脂蛋白複合物中之蛋白質組分顯著較少，如由相對較大的蛋白質峰(在圖22中9.455分鐘溶離)證明。

10.9 使用熱循環方法商業化生產脂蛋白複合物

對於大規模商業化製備，本發明之方法可按比例放大且視情況與調配步驟組合。商業化實施例描繪於圖23中。在此實施例中，在熱循環步驟後，稀釋脂蛋白複合物，與一或多種等滲劑(例如蔗糖及/或甘露醇)混合，過濾且等分裝入小瓶中。小瓶之內含物可經冷凍乾燥以延長所得調配物之存放期。

使用 DaBEE2000 以 20 公升規模生產章節 10.1 中描述之 ApoA-I/DPPG/SM複合物。用磷酸鹽緩衝液(pH 7-8)稀釋此複合物且將其與蔗糖及甘露醇混合以得到含有 10 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)、8 mg/ml ApoA-I、4% (w/w)蔗糖及 2% (w/w)甘露醇之最終調配物。

10.10 由熱循環製備之脂蛋白複合物與由共均質化製備之脂蛋白複合物之比較

將由本文中揭示之熱循環方法製備之 ApoA-I/DPPG/SM

複合物與由脂質及蛋白質組分之共均質化製備之複合物比較。與共均質化相比，由熱循環製備之複合物之純度改良至97%，如由凝膠滲透層析量測。使用SDS-PAGE，與共均質化複合物相比，由熱循環製備之複合物之主色帶純度增至98%且截短蛋白質色帶較少。

與共均質化相比，熱循環製程亦減少ApoA-I之氧化。RP-HPLC(C18)展示共均質化複合物中RT 0.93及0.99處之兩個氧化峰不存在於熱循環製程中。肽圖譜亦展示與由共均質化製備之複合物相比，由熱循環製備之複合物中ApoA-I在Met 112及Met 148處之甲硫胺酸之氧化減少。

資料概述呈現於下表5中。

表5-使用共均質化及熱循環製備之ApoA-I/DPPG/SM複合物之結果

測試	批次結果			
	共均質化 批次A	共均質化 批次B	熱循環 批次A	熱循環 批次B
由GPC獲得之複合物純度	86%	93%	96.9%	97.5%
由SDS-PAGE獲得之ApoA-I純度	色帶編號 % 1 0.3 2 5.4 3 3.4 主色帶 89.5 4 1.3	色帶編號 % 1 1.4 2 1.7 主色帶 95.7 4 1.3	色帶編號 % 主色帶 98.1	色帶編號 % 2 1.2 主色帶 98.1
由HP-SEC獲得之ApoA-I純度	RRT % 0.97 4.9 1.00 98.2 1.10 12.8	RRT % 0.97 1.5 1.00 84.9 1.10 13.6	RRT % 0.97 1.2 1.00 98.2 1.10 0.6	RRT % 0.96 0.7 1.00 98.7 1.11 0.6
由RP-HPLC(C18)獲得之ApoA-I異質性	RRT % 0.93 6.7 0.94 N/A 0.96 1.4 0.97 0.7 0.99 53.1 1.00 38.1	RRT % 0.93 0.9 0.94 0.5 0.96 1.0 0.97 2.6 0.99 N/A 1.00 94.7	RRT % 0.93 N/A 0.94 1.3 0.96 1.4 0.97 3.5 0.99 N/A 1.00 93.5	RRT % N/A 0.94 1.1 0.96 1.1 0.97 3.2 0.99 N/A 1.00 94.4
由肽圖譜/胰蛋白酶、具有UV指紋圖譜之RP-UPLC獲得之ApoA-I異質性	M ₁₁₂ ox = 73.1% ^a M ₁₄₈ ox = 4.4%	M ₁₁₂ ox = 5.5% ^a M ₁₄₈ ox = 1.0%	M ₁₁₂ ox = 4.9% ^a M ₁₄₈ ox = 1.5%	M ₁₁₂ ox = 3.6% ^a M ₁₄₈ ox = 0.9%

表5縮寫：GPC=凝膠滲透層析；R_t=滯留時間；NMT=不超過；SDS-PAGE=十二烷基硫酸鈉聚丙烯鹽胺凝膠電泳；HP-SEC=高效尺寸排除層析；RP-HPLC=逆相高效液相層析；RRT=相對滯留時間；RP-UPLC=逆相-超高效液相層析；M₁₁₂ ox=ApoA-I殘基112甲硫胺酸氧化度；M₁₄₈ ox=ApoA-I殘基148甲硫胺酸氧化度。

10.11 製備方法中惰性氣體之用途

ApoA-I為精細蛋白質，其易於發生化學不穩定性(例如氧化)。為增強含有 ApoA-I/SM/DPPC 之醫藥組合物中 ApoA-I之穩定性，在惰性氣體氮氣氛圍下製備醫藥組合物(包括熱循環、填充及精加工步驟)。以下為比較由共均質化製備之 ApoA-I/SM/DPPC複合物與在氮氣下由熱循環製備之 ApoA-I/SM/DPPC複合物之研究的結果。

表6-由兩種不同方法製備之ApoA-I/SM/DPPC複合物中Met ₁₁₂ 及Met ₁₄₈ 之氧化程度之比較分析				
批次編號	批量	製備方法	氛圍	氧化程度
1	10 L	共均質化	空氣	M ₁₁₂ OX = 14.8% M ₁₄₈ OX = 0.8%
2	9.6 L	共均質化	空氣	M ₁₁₂ OX = 64.3% M ₁₄₈ OX = 2.5%
3	9.0 L	共均質化	空氣	M ₁₁₂ OX = 71.3% M ₁₄₈ OX = 2.5%
4	19.9 L	共均質化	空氣	M ₁₁₂ OX = 38.0% M ₁₄₈ OX = 0.9%
5	18.0 L	共均質化	空氣	M ₁₁₂ OX = 5.9% M ₁₄₈ OX = 0.8%
6	17.4 L	共均質化	空氣	M ₁₁₂ OX = 73.1% M ₁₄₈ OX = 4.4%
7	12.0 L ²	共均質化	空氣	M ₁₁₂ OX = 5.5% M ₁₄₈ OX = 1.0%
8	21.6 L	熱循環	氮氣	M ₁₁₂ OX = 4.9% M ₁₄₈ OX = 1.5%
9	16.7 L	熱循環	氮氣	M ₁₁₂ OX = 3.6% M ₁₄₈ OX = 0.9%

11. 實例5：活體外膽固醇流出研究

於Fu5AH大鼠肝腫瘤細胞中研究 ApoA-I-脂質複合物之生物活性(量測ABCA1介導之膽固醇流出)。

Fu5AH大鼠肝腫瘤細胞高度表現B類I型清道夫受體(SRB1)，其促進細胞與成熟HDL之間膽固醇之雙向流動。此模型提供對HDL介導之膽固醇流出活性之特定分析。使

用由Mweva等人，2006，「Comparison of different cellular models measuring *in vitro* the whole human serum cholesterol efflux capacity」，Eur. J. Clin. Invest. 36, 552-559描述之方法進行分析。Fu5AH細胞用 ^3H -膽固醇標記24小時。製備各測試樣品(ApoA-I/DPPG/軟脂醯基SM、ApoA-I/DPPG/卵SM或ApoA-I/DPPG/植物SM，30、20及10 $\mu\text{g/ml}$ ，用經25 mM HEPES緩衝之MEM稀釋)及對照樣品(自人類血漿純化之ApoA-I(20 $\mu\text{g/mL}$)、HDL₃、2%人類血清、單獨培養基)之流出物受體培養基。將含有測試樣品或對照樣品之受體培養基添加至細胞中持續4小時且量測流出物培養基及單細胞層中之膽固醇以測定自Fu5AH細胞釋放之膽固醇百分比。計算測試樣品之生物活性且表示為相對於在與測試樣品中之脂蛋白複合物相同之濃度下的上述配方H之參考標準物(其充當陽性實驗對照)之流出膽固醇百分比。結果展示於下表7中且表明所測試之脂蛋白複合物具有顯著生物活性，如膽固醇流出分析法中量測。

表7-基於Fu5AH細胞之分析法中之生物活性(藉由誘導之膽固醇流出)

複合物	SR-BI介導之流出百分比(20 $\mu\text{g/ml}$)	佔參考標準物之百分比
ApoA-I/DPPG/軟脂醯基鞘磷脂	3.70 ± 0.09	92%
ApoA-I/DPPG/卵鞘磷脂	3.61 ± 0.05	89%
ApoA-I/DPPG/植物鞘磷脂	2.24 ± 0.04	56%

12. 實例6：兔中配方B及配方H複合物之單次低劑量投藥之藥效研究

正常兔接受以下單次注射：(a) 5 mg/kg劑量之配方B製劑

(含有 ApoA-I 及 SM 之中性脂蛋白複合物，脂蛋白元：磷脂重量比為 1:2.7)；(b) 5 mg/kg 劑量之配方 H 製劑(含有 ApoA-I、SM 及 DPPG 之帶負電荷之脂蛋白複合物，脂蛋白元：磷脂重量比為 1:2.7 且 SM:DPPG 重量比為 97:3)；或(c)含有用於脂蛋白複合物製劑之稀釋劑的對照製劑。對於配方 B、配方 H 及對照物，各測試四隻兔子。

隨時間推移之 VLDL 總膽固醇及三酸甘油酯之血漿含量展示於圖 24 及 25 中。與用配方 B(ApoA-I 及 SM 之脂蛋白複合物)處理之動物中之 VLDL 總膽固醇血漿含量相比，用配方 H(ApoA-I/DPPG/SM 複合物)(b)處理之動物中 VLDL 總膽固醇血漿含量增加較少且較快變回至基線。對於三酸甘油酯含量觀測到類似作用。此研究表明在 ApoA-I/DPPG/SM 複合物情況下該等含量之短暫升高之持續時間與中性脂蛋白複合物相比較短。此結果與人類個體中配方 H 之脂蛋白複合物之 I 期研究結果(以下實例 8 中描述)一致。

13. 實例 7：卵 SM 與合成軟脂醯基 SM 之比較性藥效研究

研究靜脈內注射至兔中之脂蛋白元 A-I(ApoA-I)/卵 SM 及 ApoA-I/合成軟脂醯基 SM 脂蛋白複合物之藥效作用。在注射脂蛋白複合物後，量測血漿脂質及脂蛋白含量變化。

藉由以 1 mL/min 之速率靜脈內輸注至耳靜脈中來向兔投與 5 mg/kg 或 20 mg/kg 劑量之 ApoA-I/卵 SM 或 ApoA-I/合成 SM 之脂蛋白複合物。每組研究 4 隻動物。在給藥前、輸注結束後立即以及開始輸注後 30 分鐘、45 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、8 小時、10 小時及 30 小時獲取血漿樣

品。接著使用市售酶套組分析血漿樣品之總膽固醇、未酯化膽固醇、磷脂及總三酸甘油酯。使用市售ELISA套組分析血漿樣品中之ApoA1。藉由GPC分析血漿樣品以測定總膽固醇及未酯化膽固醇概況。對於5 mg/kg劑量處理，基於層析圖跡線之曲線下總面積的百分比定量結果。

圖26A-26D展示輸注5 mg/kg及20 mg/kg ApoA-I/卵SM或ApoA-I/合成SM之兔中隨時間推移之膽固醇、三酸甘油酯、磷脂及ApoA-I之血漿含量。在投與之兩種劑量下，均在輸注開始後30分鐘內觀測到快速及顯著的膽固醇移動：對於5 mg/kg劑量，膽固醇移動在投藥後30分鐘達到最大值，且在20 mg/kg劑量下觀測到膽固醇移動大幅增加。在各測試劑量下，調配物具有類似的血漿三酸甘油酯、血漿磷脂及血漿重組人類ApoA-I概況。

圖27A-27C展示血漿HDL-總膽固醇含量、血漿LDL-總膽固醇含量及血漿VLDL-總膽固醇含量。ApoA-I/卵SM與ApoA-I/合成SM之HDL-總膽固醇增量類似(圖27A)。血漿LDL-C及VLDL-C含量之變化極小，且注射任一種調配物之脂蛋白複合物均不能實質上改變該等含量(圖27B-27C)。

此研究結果表明ApoA-I/卵SM及ApoA-I/合成SM脂蛋白複合物在活體內引起類似反應。

14. 實例8：健康脂質異常個體中ApoA-I/DPPG/SM複合物之I期研究

14.1 材料及方法

用配方H之脂蛋白複合物於LDL/HDL比大於3.0之健康志願者中以隨機化、雙盲、安慰劑對照、交叉、漸增單劑量研究形式進行I期臨床試驗。此I期研究之目標為評估以單次劑量投與時帶負電荷之脂蛋白複合物之安全性、耐受性、藥物動力學及藥效學。研究0.25、0.75、2.0、5.0、10.0、15.0、30.0及45.0 mg/kg之漸增劑量。個體以輸注方式接受含有ApoA-I(如實例1中所描述製備)、SM及DPPG(蛋白質：脂質重量比為1:2.7且脂質組成為97% SM/3% DPPG(w/w))之脂蛋白複合物(其係藉由蛋白質及脂質組分之共均質化製備)的無菌溶液。無菌溶液為除脂蛋白複合物外亦含有甘露醇及蔗糖(4% (w/w)蔗糖、2% (w/w)甘露醇)之10 mM磷酸鹽緩衝溶液(pH 8.0)。

14.2 結果

以下概述此I期研究之臨床發現。

總膽固醇：各時間點之平均血漿總膽固醇濃度呈現於下表8中：

表8-單次靜脈內投藥後不同時間之平均血漿總膽固醇濃度

劑量	給藥後小時數 [血漿濃度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	178.8	176.5	171.3	175.0	180.0	181.8	182.8	172.8	176.8	181.0	168.0	186.3	189.3
0.75 mg/kg	199.5	193.5	192.3	193.8	210.5	200.3	196.5	190.5	189.8	184.0	189.8	205.0	196.3
2 mg/kg	208.0	201.8	209.8	207.8	211.3	217.3	216.0	209.5	198.0	191.5	189.0	196.0	194.8
5 mg/kg	180.8	175.5	178.5	185.5	191.5	192.5	181.5	187.0	190.8	191.8	181.3	189.8	194.3
10 mg/kg	180.3	176.3	181.8	190.5	195.8	189.3	186.8	182.0	191.5	192.8	198.0	193.5	185.8
15 mg/kg	183.5	187.0	197.0	207.3	214.8	217.8	197.0	185.5	194.8	189.8	200.5	188.8	186.0
30 mg/kg	185.0	190.3	205.8	227.5	234.0	224.3	201.5	187.5	170.8	167.3	177.0	182.5	198.3
45 mg/kg	208.5	208.3	220.5	244.3	269.0	278.5	262.3	273.8	233.3	231.8	228.0	213.3	223.8
安慰劑	192.1	184.5	182.6	188.0	192.7	196.0	189.8	192.1	187.2	186.3	189.9	192.6	195.3

總膽固醇中之VLDL、LDL及HDL：以下表9-11中概述

不同時間點及劑量之總膽固醇中 VLDL、LDL 及 HDL 之平均 值：

表 9-單次靜脈內投藥後總膽固醇中之平均 VLDL

劑量	給藥後小時數 [血漿濃度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	24.21	23.74	22.73	24.22	26.62	31.00	32.67	29.12	32.48	35.61	23.50	34.35	32.56
0.75 mg/kg	31.05	29.29	29.14	32.38	39.74	41.67	40.93	36.12	36.15	36.69	31.86	38.40	34.33
2 mg/kg	27.38	22.87	23.47	27.11	30.04	36.83	37.74	31.09	26.34	25.68	24.58	28.41	21.22
5 mg/kg	23.04	19.65	21.02	25.01	31.10	34.34	29.85	28.88	25.02	25.14	18.80	23.64	17.97
10 mg/kg	28.38	24.77	23.33	28.59	38.11	43.53	39.07	37.98	33.70	33.08	28.83	27.37	24.17
15 mg/kg	21.74	19.67	19.14	23.04	32.01	42.13	40.74	34.65	31.76	29.44	27.43	22.41	25.02
30 mg/kg	21.28	16.58	13.28	18.70	28.95	44.06	48.54	55.64	37.56	28.40	21.00	20.66	23.45
45 mg/kg	37.83	32.12	30.69	28.23	38.68	57.31	64.26	81.80	69.79	60.82	47.92	37.99	42.00
安慰劑	28.03	26.07	25.46	27.86	29.45	35.52	33.99	31.77	31.33	36.51	26.91	29.42	28.29

表 10-單次靜脈內投藥後總膽固醇中之平均 LDL

劑量	給藥後小時數 [血漿濃度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	112.65	111.83	109.38	111.44	114.16	112.18	112.08	107.74	107.68	107.79	105.48	111.69	110.26
0.75 mg/kg	129.52	126.39	125.37	124.40	131.92	121.88	120.06	118.66	117.25	110.64	117.03	125.19	122.05
2 mg/kg	131.94	130.18	135.08	131.64	133.43	133.42	131.74	132.63	128.20	122.92	119.23	121.89	124.59
5 mg/kg	110.67	108.14	107.32	111.83	113.90	113.99	109.25	114.09	121.08	121.28	113.18	115.33	123.03
10 mg/kg	106.56	102.15	102.83	105.92	106.73	102.29	104.74	103.52	115.08	117.14	123.52	121.62	116.29
15 mg/kg	116.42	113.70	114.80	118.08	120.51	119.67	108.28	106.08	117.27	116.84	122.43	120.18	114.27
30 mg/kg	121.08	114.75	111.66	118.46	116.37	104.48	91.34	82.22	92.19	100.90	112.18	115.92	126.04
45 mg/kg	127.94	124.70	126.10	132.06	136.32	133.79	125.62	126.61	115.32	124.94	133.93	130.10	136.17
安慰劑	119.77	115.96	114.93	116.55	119.00	117.02	113.91	118.22	115.28	112.96	118.17	116.60	119.54

表 11-單次靜脈內投藥後總膽固醇中之平均 HDL

劑量	給藥後小時數 [血漿濃度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	41.89	40.93	39.14	39.34	39.23	38.56	37.99	35.89	36.59	37.60	39.02	40.22	46.51
0.75 mg/kg	38.93	37.81	37.74	36.98	38.83	36.70	35.51	35.71	36.36	36.67	40.87	41.41	39.86
2 mg/kg	48.68	48.70	51.20	49.00	47.78	47.00	46.52	45.78	43.46	42.90	45.19	45.70	48.93
5 mg/kg	47.04	47.71	50.16	48.65	46.50	44.17	42.41	44.03	44.65	45.33	49.27	50.78	53.25
10 mg/kg	45.31	49.32	55.59	55.98	50.91	43.43	42.94	40.50	42.72	42.53	45.65	44.51	45.29
15 mg/kg	45.34	53.63	63.05	66.13	62.23	55.95	47.97	44.77	45.72	43.47	50.64	46.15	46.71
30 mg/kg	42.64	58.91	80.81	90.34	88.67	75.72	61.62	49.64	41.01	37.95	43.82	45.93	48.76
45 mg/kg	42.73	51.42	63.70	83.96	94.00	87.40	72.36	65.34	48.14	45.99	46.15	45.16	45.58
安慰劑	44.26	42.47	42.16	43.62	44.28	43.43	41.91	42.07	40.61	40.06	44.85	46.57	47.48

未酯化(游離)膽固醇：各時間點之平均血漿游離(未酯化)膽固醇濃度呈現於下表 12 中：

表 12-單次靜脈內投藥後不同時間之平均血漿游離膽固醇濃度

劑量	給藥後小時數 [血漿濃度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	48.8	46.0	44.8	46.0	46.5	49.0	51.0	46.0	48.0	50.8	44.0	49.0	49.0
0.75 mg/kg	54.0	52.8	51.8	54.0	58.3	56.5	55.8	52.8	51.0	50.5	51.0	56.5	52.0
2 mg/kg	51.8	51.5	54.0	54.5	56.5	60.0	59.8	55.0	52.0	50.8	50.8	50.8	49.8
5 mg/kg	46.5	45.8	48.5	52.3	55.5	56.8	53.0	52.5	49.5	49.8	45.0	47.3	48.0
10 mg/kg	47.0	47.3	52.3	58.3	62.0	60.0	59.3	54.8	52.8	50.8	51.5	48.0	46.8
15 mg/kg	46.5	50.5	57.8	67.3	74.0	75.0	69.0	58.8	55.8	51.8	51.5	48.0	49.0
30 mg/kg	48.0	55.5	69.0	87.0	95.3	94.5	86.0	74.0	54.0	47.8	47.0	47.0	51.5
45 mg/kg	54.3	57.5	66.5	87.3	110.0	122.0	119.5	124.0	92.3	79.5	61.5	57.0	59.8
安慰劑	49.6	47.5	47.3	48.6	49.7	52.3	50.5	49.8	48.5	48.7	49.2	50.8	50.7

游離膽固醇中之 VLDL、LDL 及 HDL：以下表 13-15 中概述不同時間點及劑量之游離膽固醇中 VLDL、LDL 及 HDL 之平均值：

表 13-單次靜脈內投藥後游離膽固醇中之平均 VLDL

劑量	給藥後小時數 [血漿濃度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	10.78	10.19	9.88	10.42	11.08	13.69	15.43	12.22	14.57	16.84	10.81	15.05	14.17
0.75 mg/kg	11.11	10.58	10.43	12.02	14.63	16.06	15.81	13.74	14.36	14.93	12.20	14.33	12.92
2 mg/kg	9.15	8.24	8.59	10.08	11.47	14.56	14.48	11.13	10.04	10.04	9.74	10.75	7.54
5 mg/kg	7.05	6.06	6.58	8.61	11.69	13.39	10.56	9.88	7.83	8.16	5.56	8.11	5.49
10 mg/kg	10.24	8.66	8.71	11.29	16.31	19.18	16.38	14.88	12.50	12.02	9.94	9.13	8.46
15 mg/kg	8.37	7.39	7.45	10.18	15.78	22.36	22.22	15.53	13.26	12.44	10.47	8.20	10.38
30 mg/kg	6.93	5.19	4.52	7.23	13.88	23.42	28.04	29.43	15.23	10.82	7.82	7.19	8.67
45 mg/kg	12.93	10.75	10.49	11.37	18.11	31.75	39.30	49.87	35.60	27.75	19.20	14.62	16.06
安慰劑	10.07	9.48	9.39	10.19	10.86	13.78	13.18	11.66	11.87	13.04	9.99	11.53	10.99

表 14-單次靜脈內投藥後游離膽固醇中之平均 LDL

劑量	給藥後小時數 [血漿濃度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	29.81	28.22	27.37	28.11	28.09	27.75	27.87	26.92	26.45	26.77	25.97	26.62	26.47
0.75 mg/kg	35.40	34.45	33.57	34.57	35.95	33.29	32.73	32.20	30.10	28.61	30.89	34.30	31.50
2 mg/kg	32.79	32.52	33.46	33.44	35.04	35.50	35.10	34.72	33.34	32.24	31.33	30.74	32.22
5 mg/kg	29.12	27.62	27.55	30.07	32.23	32.72	32.09	32.71	32.24	31.97	29.05	28.55	31.61
10 mg/kg	27.84	25.49	25.07	28.49	31.15	30.85	32.80	31.35	31.95	30.77	32.55	30.64	30.12
15 mg/kg	28.85	26.58	26.15	30.35	34.87	36.44	33.71	33.11	33.07	30.62	30.42	30.75	29.15
30 mg/kg	32.42	27.36	26.02	30.10	33.66	34.18	32.23	31.26	29.90	29.20	31.55	32.11	34.56
45 mg/kg	33.10	31.36	32.31	35.69	42.10	46.54	47.40	52.93	44.68	41.67	33.72	34.22	35.45
安慰劑	31.01	29.73	29.47	29.64	30.05	29.85	28.76	30.34	29.22	28.30	30.73	30.28	30.73

表 15-單次靜脈內投藥後游離膽固醇中之平均HDL

劑量	給藥後小時數 [血漿濃度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	8.16	7.59	7.50	7.47	7.33	7.56	7.70	6.86	6.97	7.14	7.21	7.33	8.36
0.75 mg/kg	7.49	7.73	7.75	7.41	7.67	7.14	7.22	6.80	6.54	6.96	7.92	7.87	7.59
2 mg/kg	9.82	10.74	11.95	10.97	9.99	9.93	10.17	9.16	8.62	8.47	9.68	9.26	9.99
5 mg/kg	10.32	12.07	14.36	13.57	11.59	10.64	10.35	9.91	9.43	9.62	10.38	10.59	10.90
10 mg/kg	8.92	13.10	18.47	18.47	14.54	9.96	10.07	8.52	8.30	7.96	9.01	8.23	8.17
15 mg/kg	9.27	16.53	24.15	26.71	23.35	16.20	13.07	10.11	9.42	8.70	10.61	9.06	9.47
30 mg/kg	8.65	22.95	38.46	49.67	47.70	36.89	25.73	13.31	8.87	7.73	7.64	7.70	8.27
45 mg/kg	8.21	15.39	23.70	40.19	49.79	43.71	32.80	21.20	11.97	10.09	8.58	8.16	8.24
安慰劑	8.49	8.30	8.39	8.76	8.75	8.71	8.53	7.82	7.41	7.38	8.51	8.94	8.94

三酸甘油酯：各時間點之平均血漿三酸甘油酯濃度呈現於下表 16 中：

表 16-單次靜脈內投藥後不同時間之平均血漿三酸甘油酯濃度

劑量	給藥後小時數 [血漿濃度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	124.5	123.5	123.5	120.8	123.8	224.8	273.0	144.5	185.8	203.3	136.00	214.3	168.0
0.75 mg/kg	125.5	127.3	131.5	133.5	138.0	191.8	205.0	148.8	163.3	184.0	177.5	180.8	180.8
2 mg/kg	103.3	103.8	114.0	122.0	130.8	204.0	216.0	120.5	117.0	113.8	122.5	135.8	102.8
5 mg/kg	90.0	84.0	90.3	108.5	127.0	194.0	132.0	105.5	89.0	93.0	88.5	122.8	70.0
10 mg/kg	130.8	122.8	129.5	154.8	193.8	248.8	229.0	171.8	158.0	159.5	127.5	120.8	107.3
15 mg/kg	109.3	113.5	129.0	168.3	236.8	382.3	364.5	180.5	170.8	157.3	124.8	88.8	132.0
30 mg/kg	88.5	88.8	101.8	141.3	226.8	391.0	456.5	320.5	175.3	138.5	94.8	72.8	96.3
45 mg/kg	156.5	159.0	169.0	212.0	328.3	592.8	745.3	705.8	491.5	408.5	236.0	181.3	216.5
安慰劑	120.8	115.5	115.8	119.3	123.0	215.9	199.0	130.7	138.3	160.3	125.8	156.2	139.2

ApoA-I：個體基線 ApoA-I(mg/dL)隨時間推移之變化展示於下表 17 中。各劑量之血漿 ApoA-I 之最大變化以黑體表示。

表 17-單次靜脈內投藥後不同時間之平均血漿 ApoA-I
變化

輸注開始後小時數							
劑量(mg/kg)	0.5	1	2	4	8	12	24
0.25	-1.8	-3.9	-1.5	-1.1	-1.8	-1.5	-5.4
0.75	-0.9	-3.8	-2.5	-1.9	-0.7	-5.2	-3.1
2	-2.3	-3.8	-2.1	-0.8	0.1	-3.7	-2.4
5	0.5	6.8	8.1	5.3	2.6	-2	-0.6
10	8.6	17.8	17.8	13.9	7	5	0.3
15	16.3	32.5	30.9	27.4	21.3	10.3	8.5
30	36.1	71.8	68.3	61.8	45.8	24	15.4
45	23.3	48.6	93.8	93	71.3	39.2	14.9

轉胺酶：肝丙胺酸轉胺酶或轉胺酶含量(其與毒性有關)之平均值呈現於下表 18 中。丙胺酸轉胺酶之正常範圍為 9 至 60 IU/L。

表 18-不同處理及時間點之所選丙胺酸轉胺酶平均值的
概述

時間點	安慰劑	劑量(mg/kg)							
		0.25	0.75	2.0	5.0	10.0	15.0	30.0	45.0
基線	26.97	40.0	24.8	27.0	34.3	25.8	25.3	29.75	24.50
12小時	25.84	40.8	21.0	25.0	33.5	26.5	25.3	35.25	33.25
24小時	26.47	39.3	19.8	23.8	34.5	25.3	26.5	37.75	32.00
48小時	26.16	39.5	21.8	22.3	35.8	23.5	29.0	36.25	28.50
72小時	27.22	39.5	23.8	22.5	35.5	22.8	31.5	36.50	29.00
7天	27.97	40.3	25.3	24.8	33.5	20.0	43.3	35.75	27.00
14天	30.72	41.8	26.3	25.5	37.5	21.5	25.8	32.00	24.00
21天	29.13	49.7	25.0	27.0	32.3	22.3	34.3	28.50	23.25

不良事件：總共 7 個 (22%) 個體發生不良事件。所有個體均未發生被研究者認為至少可能與研究藥物有關之不良事件。不良事件之發生似乎不存在任何與劑量有關之趨勢。所有個體均無嚴重不良事件且無個體因不良事件而退出研究。下表 19 提供不同身體系統之不良事件的概述：

表 19-不同身體系統之不良事件的概述 [個體數目 (%)]

身體系統 不良事件	複合物劑量								
	安慰劑 (N=32)	0.25 mg/kg (N=4)	0.75 mg/kg (N=4)	2.0 mg/kg (N=4)	5.0 mg/kg (N=4)	10 mg/kg (N=4)	15 mg/kg (N=4)	30 mg/kg (N=4)	45 mg/kg (N=4)
胃腸系統									
腹瀉	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
腹痛/痛痙	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)
肌肉骨骼系統									
腳趾損傷	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
感染及傳染									
麥粒腫	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
感冒症狀	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
神經系統									
血管迷走性暈厥	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
呼吸系統									
咳嗽	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
喉嚨痛	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

14.3 結論

此 I 期研究 (其以 0.25、0.75、2.0、5.0、10.0、15.0、30.0 及 45.0 mg/kg 之單次靜脈內劑量投與包含配方 H 之帶負電荷之脂蛋白複合物之無菌溶液之製劑) 得到以下結論。

製劑在所有個體中在所有劑量下均良好耐受，其不良事件概況與在安慰劑情況下所觀測類似。複合物對臨床化學、血液學或凝血參數之影響似乎與安慰劑相同。未觀測到對 ECG 之不良反應。在單次劑量投藥後未偵測到針對 ApoA-I 之抗體。

ApoA-I 及鞘磷脂之血漿濃度隨劑量而增加：對於不超過 10 mg/kg 之劑量，ApoA-I 含量在給藥後 24 小時變回至基線且對於超過 10 mg/kg 之劑量，ApoA-I 含量在給藥後 72 小時變回至基線。對於不超過 5 mg/kg 之劑量，鞘磷脂含量在給藥後 24 小時變回至基線，對於 10 至 30 mg/kg 劑量，鞘磷脂含量在給藥後 72 小時變回至基線，且對於投與 45 mg/kg

之個體，鞘磷脂含量在給藥後7天變回至基線。

膽固醇移動隨劑量增加而增加：在低至2.0 mg/kg之劑量下發現游離膽固醇之HDL部分移動(相較於基線平均增加23%)且隨劑量而增加。在15 mg/kg及15 mg/kg以上之劑量下，三酸甘油酯含量短暫增至高於安慰劑情況下發現之含量。

此外，投與複合物未顯著提高肝轉胺酶含量且在所有情況下，含量良好保持在正常範圍內。此與CSL-111(與大豆磷脂醯膽鹼複合之自血漿純化之重組人類ApoA-I)形成對比，已發現當CSL-111以80 mg/kg患者體重之劑量投與時，其使得一些患者中丙胺酸胺基轉移酶含量升高直至超過正常上限的100倍。Tardif等人，2007, JAMA 297:1675-1682。

因此，本發明複合物可以比關於其他模擬HDL之製劑所報導之劑量低的劑量投與且仍可使脂質參數發生臨床上有意義的改良且無不良副作用。

15. 實例9：APOA-I/SM/DPPG複合物治療罹患急性冠狀動脈症候群之個體之II期臨床研究

進行臨床試驗以進一步確認低劑量之配方H之帶負電荷之脂蛋白複合物(ApoA-I、卵鞘磷脂(卵-SM)及DPPG，脂蛋白元：磷脂重量比為1:2.7且卵-SM與DPPG重量比為97:3)在治療心血管疾病方面之治療效益。如以上實例1中所描述藉由在CHO細胞中表現來製備ApoA-I且藉由實例4之熱循環方法產生複合物。

呈現ACS症狀之個體適合參與篩選以進行此研究。在基線導管插入術時，個體需對用於血管內超音波(IVUS)之一個「目標」動脈進行適當IVUS評估，該「目標」動脈不受先前或當前PCI影響，且目標動脈之近端4 cm應具有介於0與50%之間的直徑狹窄(藉由視覺血管造影評估)，參考直徑 ≥ 2.5 mm且不含提示為血栓之充盈缺陷。在由IVUS核心實驗室(IVUS Core Laboratory)評估基線IVUS之整體品質(存在合適目標血管及不存在會妨礙精確讀取IVUS影像之技術因素)後，使個體隨機接受安慰劑或三種複合物劑量(3、6或12 mg/kg)之一之靜脈內輸注(經1小時給予)。隨機化個體每隔一週(亦即每7至11天)返回進行另外5次輸注。在末次輸注後1週(5至9天)抽取治療結束時實驗室檢查樣本。在末次輸注後約3週(14至35天)進行追蹤IVUS。在末次輸注後約6個月(+/- 2週)進行追蹤訪問以收集抗ApoA1抗體測試樣品及監測嚴重心臟不良事件(MACE)終點。

主要終點為由三維IVUS評估之目標冠狀動脈之30 mm區段中總斑塊體積之標稱變化。其他功效量測包括三維IVUS上目標30 mm區段中斑塊體積變化百分比及動脈粥樣瘤體積變化百分比；目標30 mm區段中總血管體積變化；以及以基線時具有最小斑塊負荷及基線時具有最大斑塊負荷之位點為中心的解剖學上相當之5 mm區段中斑塊、內腔及總血管體積自基線至追蹤IVUS時之變化。藉由將標稱變化除以基線值接著乘以100來計算斑塊體積變化百分比。藉由將斑塊體積除以彈性外膜(EEM)體積接著乘以100

來計算動脈粥樣瘤(阻塞性)體積百分比。

16. 特定實施例，參考文獻之引用

以下編號段落中闡述之實施例描述本發明之多種態樣。

1. 一種包含脂蛋白元部分及脂質部分之脂蛋白複合物，其中該脂質部分基本上由95至99重量%中性磷脂及1至5重量%帶負電荷之磷脂組成，其中脂蛋白元部分與磷脂部分重量比在約1:2.7至約1:3範圍內。
2. 如實施例1之脂蛋白複合物，其中該脂蛋白元係選自前原脂蛋白元、preproApoA-I、proApoA I、ApoA-I、preproApoA-II、proApoA II、ApoA II、preproApoA-IV、proApoA-IV、ApoA-IV、ApoA-V、preproApoE、proApoE、ApoE、preproApoA I_{米蘭}、proApoA-I_{米蘭}、ApoA-I_{米蘭}、preproApoA-I_{巴黎}、proApoA-I_{巴黎}及ApoA-I_{巴黎}，及其混合物。
3. 如實施例2之脂蛋白複合物，其中該脂蛋白元基本上由與對應於SEQ ID NO:1之胺基酸25至267之蛋白質具有至少90%或至少95%序列一致性的ApoA I組成。
4. 如實施例3之脂蛋白複合物，其中該脂蛋白元包含單體、二聚體及/或四聚體。
5. 如實施例1至4中任一項之脂蛋白複合物，其中該脂蛋白元包含ApoA-I肽模擬劑。
6. 如實施例1至5中任一項之脂蛋白複合物，其中該脂蛋白元部分與磷脂部分重量比為1:2.7。
7. 如實施例1至6中任一項之脂蛋白複合物，其中脂質:脂蛋白元莫耳比在約1:105至約110範圍內，其中脂蛋白元值

係以 ApoA-I 當量表示。

8. 如實施例 7 之脂蛋白複合物，其中該脂質:脂蛋白元莫耳比為 1:108。

9. 如實施例 1 至 8 中任一項之脂蛋白複合物，其中該中性脂質為天然鞘磷脂或合成鞘磷脂。

10. 如實施例 9 之脂蛋白複合物，其中該鞘磷脂為卵鞘磷脂。

11. 如實施例 9 之脂蛋白複合物，其係由純度為至少 95% 之鞘磷脂製得。

12. 如實施例 1 至 11 中任一項之脂蛋白複合物，其中該脂質部分基本上由 96 至 98 重量% 中性磷脂及 2 至 4 重量% 帶負電荷之磷脂組成。

13. 如實施例 12 之脂蛋白複合物，其中該脂質部分基本上由 97 重量% 中性磷脂及 3 重量% 帶負電荷之磷脂組成。

14. 如實施例 13 之脂蛋白複合物，其中該帶負電荷之磷脂包含磷脂醯甘油。

15. 如實施例 14 之脂蛋白複合物，其中該帶負電荷之磷脂包含 1,2- 二軟脂醯基 -sn- 甘油 -3-[磷醯基 -rac-(1- 甘油)](DPPG) 之鹽或由該鹽組成。

16. 如實施例 15 之脂蛋白複合物，其中該鹽為鈉鹽或鉀鹽。

17. 如實施例 1 至 16 中任一項之脂蛋白複合物，其中該中性及/或帶負電荷之磷脂之醯基鏈各自彼此獨立地選自含有 12 至 26 個、14 至 26 個或 16 至 26 個碳原子之飽和或單不飽

和煙。

18. 如實施例17之脂蛋白複合物，其中該中性及/或帶負電荷之磷脂之各醯基鏈相同。

19. 如實施例17之脂蛋白複合物，其中該中性及/或帶負電荷之磷脂之各醯基鏈不同。

20. 如實施例17之脂蛋白複合物，其中該中性及帶負電荷之磷脂之醯基鏈含有相同數目碳原子。

21. 如實施例17之脂蛋白複合物，其中該中性及帶負電荷之磷脂之醯基鏈具有不同飽和度。

22. 如實施例17之脂蛋白複合物，其中該中性及帶負電荷之磷脂之醯基鏈含有16個碳原子。

23. 一種如實施例1至22中任一項之脂蛋白複合物之群體。

24. 一種脂蛋白複合物群體，該等脂蛋白複合物各包含脂質部分及脂蛋白元部分，該脂蛋白元部分基本上由脂蛋白元A-I(「ApoA-I」)組成，其中該群體之特徵為一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或所有十個以下特徵：

(a) 該群體中至少80重量%、至少85重量%、至少90重量%或至少95重量%之ApoA-I係呈成熟形式；

(b) 該群體中不超過20重量%、不超過15重量%、不超過10重量%或不超過5重量%之ApoA-I係呈未成熟形式；

(c) 該群體含有不超過100微微克、不超過50微微克、

- 不超過25微微克、不超過10微微克或不超過5微微克宿主細胞DNA/毫克ApoA-I；
- (d) 該群體含有不超過500奈克、不超過200奈克、不超過100奈克、不超過50奈克或不超過20奈克宿主細胞蛋白質/毫克ApoA-I；
- (e) 該群體中不超過20重量%、不超過15重量%、不超過10重量%或不超過5重量%之ApoA-I係呈截短形式；
- (f) 該群體中之該ApoA-I中不超過20%、不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過3%、不超過2%或不超過1%之甲硫胺酸112及不超過20%、不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過3%、不超過2%或不超過1%之甲硫胺酸148經氧化；
- (g) 至少80%、至少85%、至少90%或至少90%之該等脂蛋白複合物係呈尺寸為4 nm至15 nm或6 nm至15 nm之粒子形式，如由凝膠滲透層析(「GPC」)或動態光散射(「DLS」)量測；
- (h) 該群體含有不超過1 EU、不超過0.5 EU、不超過0.3 EU或不超過0.1 EU內毒素/毫克ApoA-I；及
- (i) 該群體中之該ApoA-I中不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%之胺基酸經脫鹽胺化。

25. 如實施例24之群體，其中該等複合物中之該脂質部分中不超過15重量%、不超過10重量%、不超過5重量%或不

超過2重量%之該脂質為膽固醇。

26. 如實施例25之群體，其不含膽固醇。

27. 如實施例24至26中任一項之群體，其中至少85%、至少90%或至少95%之該蛋白質為成熟ApoA-I蛋白質。

28. 如實施例27之群體，其中小於15%、小於10%或小於10%之該蛋白質為氧化、脫醯胺化及/或截短物質。

29. 如實施例24至28中任一項之群體，其中該等脂蛋白複合物之純度為至少90%、至少92.5%、至少95%、至少96%、至少97%或至少98%。

30. 如實施例24至29中任一項之群體，其中該等脂蛋白複合物之均質度為至少80%、至少85%、至少90%或至少95%，如由凝膠滲透層析中之單峰反映。

31. 如實施例30之群體，其中至少80%、至少85%、至少90%或至少95%之該等脂蛋白複合物之尺寸在4 nm至12 nm、6 nm至12 nm或8 nm至12 nm範圍內，如由GPC或DLS量測。

32. 如實施例24至31中任一項之群體，其中至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之該蛋白質係處於複合物中。

33. 如實施例24至32中任一項之群體，其不含膽酸鹽。

34. 如實施例24至33中任一項之群體，其不含任何清潔劑。

35. 如實施例24至34中任一項之群體，其含有小於200 ppm、小於100 ppm或小於50 ppm非水性溶劑。

36. 如實施例 24 至 35 中任一項之群體，其中該 ApoA-I 為人類 ApoA-I 蛋白質。

37. 如實施例 24 至 36 中任一項之群體，其中該 ApoA-I 為重組 ApoA-I。

38. 如實施例 24 至 37 中任一項之群體，其中該 ApoA-I 之胺基酸序列與對應於 SEQ ID NO:1 之胺基酸 25 至 267 之蛋白質具有至少 90% 或至少 95% 序列一致性。

39. 如實施例 24 至 38 中任一項之群體，其中該脂質部分基本上由 95 至 99 重量%中性磷脂及 1 至 5 重量%帶負電荷之磷脂組成。

40. 如實施例 39 之群體，其中該脂質部分基本上由 96 至 98 重量%中性磷脂及 2 至 4 重量%帶負電荷之磷脂組成。

41. 如實施例 24 至 40 中任一項之群體，其中該脂質部分基本上由 97 重量%中性磷脂及 3 重量%帶負電荷之磷脂組成。

42. 如實施例 41 之群體，其中該中性脂質為天然鞘磷脂或合成鞘磷脂，視情況其中該脂質之過氧化值小於 5 毫當量氧/公斤、小於 4 毫當量氧/公斤、小於 3 毫當量氧/公斤或小於 2 毫當量氧/公斤。

43. 如實施例 42 之群體，其中該鞘磷脂為卵鞘磷脂。

44. 如實施例 42 之群體，其係由純度為至少 95% 之鞘磷脂製得。

45. 如實施例 41 至 44 中任一項之群體，其中該帶負電荷之磷脂包含磷脂醯甘油。

46. 如實施例 45 之群體，其中該帶負電荷之磷脂包含 1,2-

二軟脂醯基-sn-甘油-3-[磷醯基-rac-(1-甘油)](DPPG)之鹽或由該鹽組成。

47. 如實施例46之群體，其中該鹽為鈉鹽或鉀鹽。

48. 如實施例24至47中任一項之群體，其中該中性及/或帶負電荷之磷脂之醯基鏈各自彼此獨立地選自含有12至26個、14至26個或16至26個碳原子之飽和或單不飽和烴。

49. 如實施例48之群體，其中該中性及/或帶負電荷之磷脂之各醯基鏈相同。

50. 如實施例48之群體，其中該中性及/或帶負電荷之磷脂之各醯基鏈不同。

51. 如實施例48之群體，其中該中性及帶負電荷之磷脂之醯基鏈含有相同數目之碳原子。

52. 如實施例48之群體，其中該中性及帶負電荷之磷脂之醯基鏈具有不同飽和度。

53. 如實施例48之群體，其中該中性及帶負電荷之磷脂之醯基鏈含有16個碳原子。

54. 如實施例24至41中任一項之群體，其脂蛋白元部分:脂質部分莫耳比在1:80至120、1:85至1:110或1:100至1:115範圍內，其中脂蛋白元值係以ApoA-I當量表示。

55. 如實施例54之群體，其脂蛋白元部分:脂質部分莫耳比在1:80至1:90、1:90至1:100、1:100至1:110或1:105至1:110範圍內，其中脂蛋白元值係以ApoA-I當量表示。

56. 如實施例24至55中任一項之群體，其脂蛋白元部分與磷脂部分重量比在1:2至約1:3範圍內。

57. 如實施例24至40中任一項之群體，其中該脂蛋白元部分與磷脂部分重量比在1:2.1至1:2.7範圍內。

58. 如實施例57之群體，其中該脂蛋白元部分與磷脂部分重量比為1:2.7。

59. 一種醫藥組合物，其包含如實施例1至22中任一項之脂蛋白複合物或如實施例23至58中任一項之脂蛋白複合物群體以及一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑，或基本上由如實施例1至22中任一項之脂蛋白複合物或如實施例23至58中任一項之脂蛋白複合物群體以及一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑組成。

60. 一種哺乳動物宿主細胞，其經工程改造以表現ApoA-I蛋白質，該ApoA-I蛋白質之胺基酸序列與SEQ ID NO:1之位置25至267具有至少95%一致性。

61. 如實施例60之哺乳動物宿主細胞，其中該蛋白質在培養該宿主細胞時分泌至培養基中。

62. 如實施例60或實施例61之哺乳動物宿主細胞，其中該蛋白質進一步包含信號序列MKAAVLTLAVLFLTGSQA。

63. 如實施例60至62中任一項之哺乳動物宿主細胞，其中該蛋白質進一步包含前肽序列RHFQQ。

64. 如實施例60至63中任一項之哺乳動物宿主細胞，其為中國倉鼠卵巢(CHO)、CHO-S、CHO-K1、VERO、BHK、BHK 570、HeLa、COS-1、COS-7、MDCK細胞、293、3T3、骨髓瘤、PC12及W138。

65. 如實施例64之哺乳動物宿主細胞，其為CHO細胞。
66. 如實施例65之哺乳動物宿主細胞，其為CHO-S細胞或CHO-K1細胞。
67. 如實施例60至66中任一項之哺乳動物宿主細胞，其在每公升培養物中能夠產生至少0.5、1、2、3或4 g該ApoA-I蛋白質。
68. 如實施例67之哺乳動物宿主細胞，其在每公升培養物中能夠產生多達4、5、6、7、8、9、10、12、15或20 g該ApoA-I蛋白質。
69. 如實施例67或實施例68之哺乳動物宿主細胞，其中該培養物為大規模培養物。
70. 如實施例69之哺乳動物宿主細胞，其中該大規模培養物為至少15公升、至少20公升、至少25公升或至少30公升。
71. 如實施例70之哺乳動物宿主細胞，其中該大規模培養物為約50公升、約100公升、約200公升或約300公升。
72. 如實施例60至71中任一項之哺乳動物宿主細胞，其包含至少約5個編碼該ApoA-I蛋白質之核苷酸序列之複本。
73. 如實施例72之哺乳動物宿主細胞，其中各核苷酸序列可操作地連接於啟動子。
74. 如實施例73之哺乳動物宿主細胞，其中該啟動子為細胞巨大病毒啟動子。
75. 如實施例74之哺乳動物宿主細胞，其中該啟動子為即刻早期猿細胞巨大病毒啟動子。

76. 如實施例60至75中任一項之哺乳動物宿主細胞，其分泌成熟ApoA-I蛋白質，該成熟ApoA-I蛋白質包含對應於SEQ ID NO:1之胺基酸25至267的胺基酸序列或由對應於SEQ ID NO:1之胺基酸25至267的胺基酸序列組成。

77. 一種哺乳動物細胞培養物，其包含複數個如實施例60至76中任一項之哺乳動物宿主細胞。

78. 如實施例77之哺乳動物細胞培養物，其每公升包含至少約0.5 g成熟ApoA-I蛋白質，該成熟ApoA-I蛋白質包含對應於SEQ ID NO:1之胺基酸25至267的胺基酸序列或由對應於SEQ ID NO:1之胺基酸25至267的胺基酸序列組成。

79. 如實施例78之哺乳動物細胞培養物，其中至少80%、至少85%或至少90%之該成熟ApoA-I蛋白質缺乏信號序列。

80. 如實施例78之哺乳動物細胞培養物，其中至少80%、至少85%或至少90%之該成熟ApoA-I蛋白質缺乏信號序列及前肽序列。

81. 如實施例78至80中任一項之哺乳動物細胞培養物，其中至少80%、至少85%或至少90%之該成熟ApoA-I蛋白質未經截短、氧化或脫醯胺化。

82. 一種產生具生物學活性之成熟ApoA-I蛋白質之方法，其包含在表現及分泌該ApoA-I蛋白質之條件下培養如實施例60至76中任一項之哺乳動物宿主細胞。

83. 如實施例82之方法，其進一步包含自該培養之哺乳動物宿主細胞之上清液回收該具生物學活性之成熟ApoA-I蛋

白質。

84. 如實施例 82 或實施例 83 之方法，其進一步包含純化 ApoA-I 蛋白質。

85. 一種醫藥組合物，其包含治療有效量之由或可由如實施例 84 之方法獲得之 ApoA-I 蛋白質。

86. 如實施例 85 之醫藥組合物，其中該 ApoA-I 蛋白質係與脂質複合。

87. 一種使包含 ApoA-I 之醫藥組合物中之氧化產物最少之方法，其包含在惰性氣體下製備該醫藥組合物。

88. 如實施例 87 之方法，其中該惰性氣體為氮氣、氬氣或氦氣。

89. 如實施例 87 或實施例 88 之方法，其中該醫藥組合物為包含 ApoA-I 之脂蛋白複合物之醫藥組合物。

90. 一種製備脂蛋白複合物之方法，其包含：

- (a) 使包含脂質組分及蛋白質組分之起始懸浮液自第一溫度範圍內之溫度冷卻至第二溫度範圍內之溫度，其中該脂質組分基本上由脂質粒子組成且其中該蛋白質組分基本上由脂質結合肽及/或脂質結合蛋白質組成；
- (b) 將(a)之該冷卻之懸浮液自該第二溫度範圍內之溫度加熱至該第一溫度範圍內之溫度；
- (c) 使(b)之該加熱之懸浮液自該第一溫度範圍內之溫度冷卻至該第二溫度範圍內之溫度；及
- (d) 重複步驟(b)及(c)至少一次，

藉此形成脂蛋白複合物。

91. 如實施例90之方法，其中步驟(c)包含重複步驟(a)及(b)直至至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%之該脂質組分及/或該蛋白質組分係呈複合形式。

92. 如實施例90或實施例91之方法，其中步驟(c)包含重複步驟(a)及(b)直至所得脂蛋白複合物之均質度為至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%。

93. 如實施例90至92中任一項之方法，其中步驟(d)包含重複步驟(b)及(c)至少3次、至少4次或至少5次。

94. 如實施例90至93中任一項之方法，其中步驟(c)包含重複步驟(b)及(c)多達6次、多達8次或多達10次。

95. 如實施例90至94中任一項之方法，其中在步驟(a)後，將該懸浮液保持在該第二溫度範圍內至少1分鐘、至少2分鐘、至少3分鐘、至少4分鐘或至少5分鐘，隨後進行該加熱步驟(b)。

96. 如實施例90至95中任一項之方法，其中在步驟(a)後，將該懸浮液保持在該第二溫度範圍內長達6分鐘、長達8分鐘、長達10分鐘、長達20分鐘、長達30分鐘或長達1小時，隨後進行該加熱步驟(b)。

97. 如實施例90至96中任一項之方法，其中在步驟(b)後，將該懸浮液保持在該第一溫度範圍內至少1分鐘、至少2分鐘、至少3分鐘、至少4分鐘或至少5分鐘，隨後進行該冷

卻步驟(c)。

98. 如實施例90至97中任一項之方法，其中在步驟(b)後，將該懸浮液保持在該第一溫度範圍內長達6分鐘、長達8分鐘、長達10分鐘、長達20分鐘、長達30分鐘或長達1小時，隨後進行該冷卻步驟(c)。

99. 如實施例90至98中任一項之方法，其中所得脂蛋白複合物不進行離心。

100. 如實施例90至99中任一項之方法，其中該脂質組分及該蛋白質組分分別佔步驟(a)之該起始懸浮液中之脂質以及蛋白質及肽之大部分。

101. 如實施例90至100中任一項之方法，其中該脂質組分佔步驟(a)之該起始懸浮液中之脂質之至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

102. 如實施例90至101中任一項之方法，其中該蛋白質組分佔步驟(a)之該起始懸浮液中之蛋白質及肽之至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

103. 如實施例90至102中任一項之方法，其中該懸浮液中至多5%、至多10%、至多15%或至多20%脂質與步驟(a)之該起始懸浮液中之蛋白質組分預複合。

104. 如實施例90至103中任一項之方法，其中該第一溫度範圍包括低於該蛋白質組分之轉移溫度不超過10度及高於該蛋白質組分之轉移溫度不超過15度、不超過10度或不超過5度之溫度。

105. 如實施例90至104中任一項之方法，其中該第二溫度

範圍包括低於該脂質組分之轉移溫度不超過5度或不超過10度及高於該脂質組分之轉移溫度不超過5度之溫度。

106.如實施例90至105中任一項之方法，其中該等第一溫度範圍跨度不超過1°C、2°C、3°C、4°C、5°C、7°C或10°C。

107.如實施例90至106中任一項之方法，其中該等第二溫度範圍跨度不超過1°C、2°C、3°C、4°C、5°C、7°C或10°C。

108.如實施例90至107中任一項之方法，其進一步包含形成該起始懸浮液之步驟。

109.如實施例108之方法，其中形成該懸浮液包含組合脂質粒子之懸浮液與該等脂質結合肽及/或脂質結合蛋白質之溶液的步驟，該脂質粒子懸浮液及該等脂質結合肽及/或脂質結合蛋白質之溶液各在該第一溫度範圍內之溫度下預加熱。

110.如實施例108之方法，其中形成該懸浮液包含混合脂質粒子群體及與脂質預複合之該等脂質結合肽及/或脂質結合蛋白質之步驟，該脂質粒子群體及該等脂質結合肽及/或脂質結合蛋白質各在該第一溫度範圍內之溫度下預加熱。

111.如實施例110之方法，其中與脂質結合肽及/或脂質結合蛋白質預複合之脂質佔該起始懸浮液中總脂質之不超過5%、不超過10%、不超過15%或不超過20%。

112.如實施例109至111中任一項之方法，其中該脂質溶液

為均質化脂質溶液。

113. 如實施例 112 之方法，其在該組合步驟前進一步包含使用高壓均質化形成均質化脂質溶液之步驟。

114. 如實施例 113 之方法，其中該高壓均質化係在超過 1500 巴、超過 1800 巴或超過 2000 巴之壓力下進行。

115. 如實施例 114 之方法，其中該高壓均質化係在 1900 至 2500 巴之壓力下進行。

116. 如實施例 90 至 115 中任一項之方法，其中該脂質組分基本上由脂質粒子組成，該等脂質粒子具有以下特徵：

(i) 尺寸為至少 45 nm、至少 50 nm、至少 55 nm 或至少 60 nm，如由 DLS 量測；及

(ii) 尺寸為至多 65 nm、至多 70 nm、至多 75 nm、至多 80 nm、至多 100 nm、至多 120 nm、至多 150 nm、至多 200 nm、至多 250 nm、至多 300 nm 或至多 500 nm，如由 DLS 量測。

117. 如實施例 116 之方法，該等脂質粒子之尺寸為至多 65 nm、至多 70 nm、至多 75 nm 或至多 80 nm，如由 DLS 量測。

118. 如實施例 116 之方法，該等脂質粒子之尺寸為至多 100 nm、至多 120 nm、至多 150 nm、至多 200 nm、至多 250 nm、至多 300 nm、至多 500 nm，如由 DLS 量測。

119. 如實施例 90 至 116 中任一項之方法，其中重複步驟 (b) 及 (c) 直至獲得尺寸為 4 nm 至 15 nm、5 nm 至 15 nm、6 nm 至 15 nm 或 8 nm 至 15 nm 之脂蛋白複合物。

120. 如實施例 90 至 116 中任一項之方法，其中重複步驟(b)及(c)直至獲得尺寸為 5 nm 至 12 nm、6 nm 至 12 nm 或 8 nm 至 12 nm 之脂蛋白複合物。

121. 如實施例 90 至 120 中任一項之方法，其中 1 個、1 個以上或所有步驟係在惰性氣體下進行。

122. 如實施例 121 之方法，其中該惰性氣體為氮氣。

123. 如實施例 90 至 122 中任一項之方法，其中該蛋白質組分包含脂質結合蛋白質或由脂質結合蛋白質組成。

124. 如實施例 123 之方法，其中該等脂質結合蛋白質為 ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoC-I、ApoC-II、ApoC-III、ApoE 或其混合物。

125. 如實施例 90 至 122 中任一項之方法，其中該蛋白質組分包含脂質結合肽或由脂質結合肽組成。

126. 如實施例 125 之方法，其中該等脂質結合肽為 ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoC-I、ApoC-II、ApoC-III、ApoE 之類似物或其混合物。

127. 如實施例 90 至 126 中任一項之方法，其中該脂質組分包含天然脂質、合成脂質或其混合物或由天然脂質、合成脂質或其混合物組成。

128. 如實施例 127 之方法，其中該脂質組分包含醚磷脂、短鏈磷脂、膽固醇、膽固醇衍生物、磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、鞘脂、磷脂醯甘油、神經節苷脂及/或腦苷脂。

129. 如實施例 128 之方法，其中該脂質組分包含卵磷脂醯

膽鹼、大豆磷脂醯膽鹼、二軟脂醯基磷脂醯膽鹼、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼、1-肉豆蔻醯基-2-軟脂醯基磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯基-2-肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯基-2-硬脂醯基磷脂醯膽鹼、1-硬脂醯基-2-軟脂醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯乙醇胺、二月桂醯基磷脂醯甘油、二磷脂醯甘油、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油、二軟脂醯基磷脂醯甘油、二硬脂醯基磷脂醯甘油、二油醯基磷脂醯甘油、二肉豆蔻醯基磷脂酸、二軟脂醯基磷脂酸、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺、二軟脂醯基磷脂醯乙醇胺、二肉豆蔻醯基磷脂醯絲胺酸、二軟脂醯基磷脂醯絲胺酸、鞘磷脂、二軟脂醯基鞘磷脂、二硬脂醯基鞘磷脂、二軟脂醯基磷脂醯甘油鹽、磷脂酸、半乳糖腦苷脂、二月桂基磷脂醯膽鹼、(1,3)-D-甘露糖基-(1,3)二甘油酯、胺基苯基糖苷及/或3-膽固醇基-6'-(糖硫基)己基醚糖脂。

130. 如實施例 90 至 126 中任一項之方法，其中該脂質組分包含中性脂質。

131. 如實施例 130 之方法，其中該脂質組分主要為中性脂質。

132. 如實施例 130 或實施例 131 之方法，其中該等中性脂質包含鞘磷脂。

133. 如實施例 132 之方法，其中該等中性脂質主要為鞘磷脂。

134. 如實施例 132 或實施例 133 之方法，其中該等鞘磷脂包

含D-赤藻糖-鞘磷脂及/或D-赤藻糖-二氫鞘磷脂或由D-赤藻糖-鞘磷脂及/或D-赤藻糖-二氫鞘磷脂組成。

135.如實施例130至135中任一項之方法，其中該起始懸浮液進一步包含帶負電荷之磷脂。

136.如實施例135之方法，其中該等帶負電荷之磷脂包含磷脂醯甘油或由磷脂醯甘油組成。

137.如實施例136之方法，其中該等磷脂醯甘油具有C16:0醯基鏈。

138.如實施例136或實施例137之方法，其中該等磷脂醯甘油包含1,2-二-十六醯基-sn-甘油-3-磷醯基-(1'-rac-甘油)之鹽或由1,2-二-十六醯基-sn-甘油-3-磷醯基-(1'-rac-甘油)之鹽組成。

139.如實施例138之方法，其中該鹽為鈉鹽。

140.如實施例90至139中任一項之方法，其中該起始懸浮液中脂質:蛋白質莫耳比為約2:1至約200:1。

141.如實施例140之方法，其中該起始懸浮液中脂質:蛋白質莫耳比為約10:1至約125:1。

142.如實施例140之方法，其中該起始懸浮液中脂質:蛋白質莫耳比為約10:1至約150:1。

143.如實施例140之方法，其中該起始懸浮液中脂質:蛋白質莫耳比為約75:1至約125:1。

144.如實施例90至143中任一項之方法，其中該起始懸浮液含有帶負電荷之脂質、中性脂質及脂質結合肽，其莫耳比在2-6(帶負電荷之脂質):90-120(中性脂質):1(脂質結合

肽、脂質結合蛋白質或其混合物)範圍內。

145. 如實施例 90 至 144 中任一項之方法，其中該第一溫度範圍為 55°C 至 60°C。

146. 如實施例 90 至 145 中任一項之方法，其中該第二溫度範圍介於 35°C 與 40°C 之間。

147. 如實施例 90 至 146 中任一項之方法，其進一步包含凍乾所得脂蛋白複合物之步驟。

148. 如實施例 147 之方法，其進一步包含在凍乾前添加等滲劑之步驟。

149. 一種醫藥組合物，其包含脂蛋白複合物群體，其中該等脂蛋白複合物具有以下特徵：

(a) 尺寸為 4 nm 至 15 nm 或尺寸為 6 nm 至 15 nm，或尺寸介於 5 nm 與 12 nm 之間，或尺寸介於 8 nm 與 10 nm 之間，如由 GPC 或 DLS 量測；及

(b) 均質度為至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99%，如由凝膠滲透層析中之單峰反映。

150. 一種製備醫藥組合物之方法，其包含：

(a) 根據如實施例 90 至 146 中任一項之方法製備脂蛋白複合物群體；及

(b) 組合該脂蛋白複合物群體與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。

151. 如實施例 150 之方法，其中該醫藥組合物係在惰性氣體下製備。

152. 如實施例 151 之方法，其中該惰性氣體為氮氣、氬氣或氫氣。

153. 如實施例 150 至 152 中任一項之方法，其進一步包含凍乾該醫藥組合物之步驟。

154. 如實施例 150 至 152 中任一項之方法，其進一步包含將該醫藥組合物等分為個別單位劑量之步驟。

155. 如實施例 154 之方法，其進一步包含凍乾該等個別單位劑量之步驟。

156. 一種製備醫藥組合物之方法，其包含復原如實施例 147 之方法或由如實施例 153 或實施例 155 之方法製得之凍乾之脂蛋白複合物製劑。

157. 如實施例 156 之方法，其進一步包含組合復原之脂蛋白複合物與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。

158. 如實施例 156 或實施例 157 之方法，其進一步包含將該醫藥組合物等分為個別單位劑量之步驟。

159. 一種液體醫藥組合物，其係由如實施例 150 或實施例 156 之方法製得。

160. 一種凍乾醫藥組合物，其係由如實施例 153 之方法製得。

161. 一種液體單位劑型，其係由如實施例 158 之方法製得。

162. 一種液體單位劑型，其包含治療有效量之如實施例 149 之醫藥組合物。

163. 一種乾燥單位劑型，其係由如實施例 155 之方法製

得。

164. 一種治療脂質異常性病徵之方法，其包含向有需要之個體投與治療有效量之以下物質：

- (a) 如實施例1至22中任一項之脂蛋白複合物；
- (b) 如實施例23至58中任一項之脂蛋白複合物群體；
- (c) 如實施例59、149及159中任一項之醫藥組合物；
- (d) 治療有效量之由如實施例90至148中任一項之方法製得之脂蛋白複合物；
- (e) 如實施例161或實施例162之單位劑型；
- (f) 在以多達45 mg/kg劑量單次投與健康志願者後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；
- (g) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；
- (h) 在以1 mg/kg至20 mg/kg劑量單次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；
- (i) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物，每次以1 mg/kg至20 mg/kg劑量投與；
- (j) 在以多達20 mg/kg劑量單次投與健康志願者後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；
- (k) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；
- (l) 在以1 mg/kg至20 mg/kg劑量單次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合

物；或

- (m) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物，每次以1 mg/kg至20 mg/kg劑量投與。

165. 如實施例164之方法，其進一步包含重複該投藥。

166. 如實施例165之方法，其中以6天至12天之時間間隔重複該投藥。

167. 如實施例166之方法，其中該投藥為每週一次。

168. 如實施例165至167中任一項之方法，其中該投藥經1個月、5週、6週、2個月、3個月、6個月、1年、2年、3年或更長時間進行。

169. 如實施例165至167中任一項之方法，其中該投藥進行1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次或12次。

170. 如實施例164至169中任一項之方法，其中該投藥為靜脈內投藥。

171. 如實施例170之方法，其中該投藥係藉由輸注進行。

172. 如實施例171之方法，其中該輸注經1至4小時進行。

173. 如實施例171之方法，其中該輸注經長達24小時進行。

174. 如實施例170至173中任一項之方法，其中每次投藥之脂蛋白複合物量在約0.25 mg/kg ApoA-I當量至約30 mg/kg ApoA-I當量範圍內。

175. 如實施例174之方法，其中每次投藥之脂蛋白複合物

量在約 1 mg/kg ApoA-I當量至約 15 mg/kg ApoA-I當量範圍內。

176. 如實施例 175 之方法，其中每次投藥之脂蛋白複合物量在約 2 mg/kg ApoA-I當量至約 12 mg/kg ApoA-I當量範圍內。

177. 如實施例 176 之方法，其中每次投藥之脂蛋白複合物量為約 3 mg/kg ApoA-I當量。

178. 如實施例 176 之方法，其中每次投藥之脂蛋白複合物量為約 6 mg/kg ApoA-I當量。

179. 如實施例 176 之方法，其中每次投藥之脂蛋白複合物量為約 12 mg/kg ApoA-I當量。

180. 一種治療脂質異常性病徵之方法，其包含：

(a) 向個體投與 1 mg/kg至 12 mg/kg初始劑量之以下物質：

- (i) 如實施例 1 至 22 中任一項之脂蛋白複合物；
- (ii) 如實施例 23 至 58 中任一項之脂蛋白複合物群體；
- (iii) 如實施例 59、149 及 159 中任一項之醫藥組合物；
- (iv) 治療有效量之由如實施例 90 至 148 中任一項之方法製得之脂蛋白複合物；
- (v) 如實施例 161 或實施例 162 之單位劑型；
- (vi) 在以多達 45 mg/kg劑量單次投與健康志願者後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；

- (vii) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；
 - (viii) 在以1 mg/kg至20 mg/kg劑量單次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；
 - (ix) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物，每次以1 mg/kg至20 mg/kg劑量投與；
 - (x) 在以多達20 mg/kg劑量單次投與健康志願者後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；
 - (xi) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；
 - (xii) 在以1 mg/kg至20 mg/kg劑量單次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；或
 - (xiii) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物，每次以1 mg/kg至20 mg/kg劑量投與；
- (b) 判定在該投藥後4、8、12、24、48、72、168、336或504小時該個體之三酸甘油酯、VLDL-膽固醇及/或VLDL-三酸甘油酯是否升高超過兩倍；及
- (c) 若該個體之三酸甘油酯、VLDL-膽固醇及/或VLDL-

三酸甘油酯升高至超過給藥前含量的兩倍，則以較低劑量重複該投藥，且若該個體之三酸甘油酯、VLDL-膽固醇及/或VLDL-三酸甘油酯未升高至超過給藥前含量的兩倍，則以相等或更大劑量重複該投藥。

181. 如實施例165至180中任一項之方法，其中該個體患有高脂質血症或心血管疾病或易患高脂質血症或心血管疾病。

182. 如實施例181之方法，其中該患者患有高脂質血症或易患高脂質血症敏感且該高脂質血症為高膽固醇血症。

183. 如實施例181之方法，其中該患者患有心血管疾病或易患心血管疾病且其中該心血管疾病為動脈粥樣硬化、中風、心肌梗塞、急性冠狀動脈症候群、心絞痛、間歇性跛行、嚴重肢體缺血、主動脈瓣硬化或再狹窄。

184. 如實施例165至183中任一項之方法，其進一步包含伴隨投與膽汁酸樹脂、菸酸、消炎劑、士他汀、纖維酸酯、CETP抑制劑、血小板凝集抑制劑、抗凝血劑、PCSK9促效劑及/或膽固醇吸收抑制劑。

185. 如實施例181之方法，其進一步包含投與選自阿托伐他汀、羅素他汀(rosuvastatin)、普伐他汀或洛伐他汀之士他汀。

186. 如實施例181之方法，其進一步包含投與纖維酸酯非諾貝特。

187. 如實施例181之方法，其進一步包含投與膽固醇吸收

抑制劑澤迪亞(zetia)。

188.如實施例181之方法，其進一步包含投與選自安特普及達特普之CETP抑制劑。

189.如實施例181之方法，其進一步包含投與PCSK9之抗體促效劑或PCSK9之配位體促效劑。

190.如實施例181之方法，其進一步包含投與膽固醇吸收抑制劑硫酸氫氯吡格雷(clopidogrel bisulfate)。

191.如實施例181之方法，其進一步包含投與抗凝血劑華法林(warfarin)。

192.如實施例181之方法，其進一步包含投與消炎劑阿斯匹林(aspirin)。

193.一種組合物，其包含1個、2個或3個均質脂蛋白複合物群體。

194.如實施例193之組合物，其中該等均質群體中之至少一者中之脂蛋白複合物具有如實施例1至22中任一項之複合物之特徵。

195.如實施例193或實施例194之組合物，其中該等群體中之至少一者、兩者或三者具有如實施例23至58中任一項之群體之特徵。

本文中引用之所有參考文獻均以全文引用的方式併入本文中且達成所有目的，其引用程度就如同已特定地及個別地將各個公開案、專利或專利申請案以全文引用的方式併入本文中以達成所有目的一般。

如熟習此項技術者將顯而易見，可在不偏離本發明之精

神及範疇下對本發明做出多種修改及變化。本文中所描述之特定實施例僅作為實例提供，且本發明將僅受隨附申請專利範圍以及授予該等請求項之等效物之全部範疇限制。

【圖式簡單說明】

圖 1：人類前原脂蛋白元 A-I 之胺基酸序列 (SEQ ID NO:1；GenBank 寄存編號 AAB59514.1)。胺基酸 1-18 (粗體) 對應於 ApoA-I 之信號順序且胺基酸 19-24 對應於前肽序列 (加下劃線)。信號順序及前肽均於細胞中裂解以產生全長成熟人類 ApoA-I (胺基酸 25-267)。

圖 2：表現 ApoA-I 之重組 S-CHO 細胞之 12 天分批補料培養中之 ApoA-I 效價。藉由自第 0 代連續繼代至第 43 代來連續培養細胞。藉由逆相 HPLC 監測第 4、8、14、19、25、21、36 及 43 代中之 ApoA-I 產生。培養基中之 ApoA-I 的量為 1259 mg/L 至 1400 mg/L。

圖 3A-3B：圖 3A 展示表現 ApoA-I 之重組 S-CHO 細胞之 200 L 13 天培養物中之活細胞密度。活細胞密度在第 9 天達到最大值，為 33.20×10^5 個細胞/毫升，且生存率為 92.5%。圖 3B 展示 13 天培養之培養基中 ApoA-I 之濃度。培養基中之 ApoA-I 濃度在第 12 天達到最大值，為約 2 mg/mL。

圖 4：由本文中所描述之方法純化之 ApoA-I 之 SDS 聚丙稀醯胺凝膠。左側泳道展示分子量標記。右側泳道展示分子量為約 28 kD 之經純化 ApoA-I。

圖 5A-5D：蛋白質：脂質重量比為 1:2.5 (配方 A；圖 5A)、1:2.7 (配方 B；圖 5B)、1:3.1 (配方 C；圖 5C) 之

proApoA-I/SM複合物及蛋白質：脂質重量比為1:2.7(配方D；圖5D)之proApoA-I/SM/DPPC複合物之HPLC層析圖。

圖6A-6D：配方D之脂蛋白複合物分別在10、20、30及60分鐘之HPLC層析圖。

圖7A-7D：配方B之脂蛋白複合物分別在10、20、30及50分鐘之HPLC層析圖。

圖8A-8D：配方F之脂蛋白複合物分別在20、40、60及120分鐘之HPLC層析圖。

圖9：隨時間推移之前- β HDL複合物形成之圖表，其說明在1:2.7脂蛋白:總磷脂重量比下包含以下物質之脂蛋白複合物的形成：proApoA-I及SM(配方B)；proApoA-I、SM、DPPC及DPPG，其中SM:DPPC:DPPG重量比為48:48:4(配方F)；及proApoA-I、SM、DPPC及DPPG，其中SM:DPPC:DPPG重量比為73:23:4(配方G)。

圖10A-10D：分別為配方E、H、I及J之HPLC層析圖。

圖11：用於製備脂蛋白複合物之例示性方法之示意圖。

圖12：用於非商業化規模熱循環操作之例示性熱循環設備。

圖13A-13E：SM/DPPG/ApoA-I蛋白質複合物在遞增熱循環次數下之凝膠滲透層析圖。使組分在57°C與37°C之間熱循環，各溫度下5分鐘，總共30分鐘(圖13A)、60分鐘(圖13B)、120分鐘(圖13C)、180分鐘(圖13D)或210分鐘(圖13E)。

圖14：SM/ApoA-I複合物之凝膠滲透層析圖。

圖 15：N-軟脂醯基-4-羥基二氫鞘胺醇-1-磷酸膽鹼(一種形式之植物SM或植物鞘磷脂)/DPPG/ApoA-I複合物之凝膠滲透層析圖。

圖 16：合成軟脂醯基 SM/DPPG/ApoA-I複合物之凝膠滲透層析圖。

圖 17：植物鞘磷脂/DPPG/ApoA-I複合物之凝膠滲透層析圖。

圖 18：SM/DPPC/DPPG/ApoA-I肽複合物之凝膠滲透層析圖。

圖 19A-19D：使用 Malvern Instruments Zetasizer(Malvern Instruments Inc.)藉由動態光散射系統表徵脂質粒子。在圖 19A 中，Z 平均值為 84.49 nm(「84 nm 粒子」)；在圖 19B 中，Z 平均值為 76.76 nm(「77 nm 粒子」)；在圖 19C 中，Z 平均值為 66.21 nm(「66 nm 粒子」)；且在圖 19D 中，Z 平均值為 59.50 nm(「60 nm 粒子」)。

圖 20A-20D：以 84 nm(圖 20A)、77 nm(圖 20B)、66 nm(圖 20C)及 60 nm(圖 20D)脂質粒子為起始物質，5 次熱循環後複合物之凝膠滲透層析圖。

圖 21A-21B：以 450 nm(圖 21A)及 40 nm(圖 21B)脂質粒子為起始物質，6 次熱循環後複合物之凝膠滲透層析圖。

圖 22：以 65 nm 脂質粒子為起始物質，在 37℃「低溫」下開始第一循環，6 次熱循環後複合物之凝膠滲透層析圖。

圖 23：用於製備包含脂蛋白複合物之醫藥組合物之例示

性實施例之示意圖，其包括藉由本發明之方法將脂蛋白複合物調配為商業上適用之醫藥組合物。

圖 24：輸注配方 B 及配方 H 之脂蛋白複合物後血漿 VLDL-總膽固醇含量之增加。配方 H 之脂蛋白複合物(■)及配方 B 之脂蛋白複合物(▼)以 5 mg/kg 劑量注入空腹兔中。減去基線值(對於 3 個組在 0.03 至 0.3 g/L 範圍內)以測定血漿 VLDL-總膽固醇含量之增加。

圖 25：輸注配方 B 及配方 H 之脂蛋白複合物後血漿三酸甘油酯含量之增加。配方 H 之脂蛋白複合物(■)及配方 B 之脂蛋白複合物(▲)以 5 mg/kg 劑量注入空腹兔中。減去基線值(對於 3 個組在 0.31 至 0.71 g/L 範圍內)以測定血漿三酸甘油酯含量之增加。

圖 26A-26D：與稀釋劑(■)相比，向兔中輸注 5 mg/kg 或 20 mg/kg 及 20 mg/kg ApoA-I/卵 SM 複合物(●，▲)或 ApoA-I/合成 SM 複合物(◆，▼)後血漿總膽固醇(圖 26A)、三酸甘油酯(圖 26B)、磷脂(圖 26C)及 ApoA-I(圖 26D)之增加。所量測之不同血漿脂質之基線值範圍如下：血漿膽固醇，0.28 至 0.4 g/L；血漿三酸甘油酯，0.23 至 0.29 g/L；及血漿磷脂，0.45 至 0.61 g/L。

圖 27A-27C：與稀釋劑(■)相比，向兔中輸注 5 mg/kg ApoA-I/卵 SM 複合物(●)及 ApoA-I/合成 SM 複合物(◆)後血漿 HDL-總膽固醇(圖 27A)、LDL-總膽固醇(圖 27B)及 VLDL-總膽固醇(圖 27C)之增加。基線值範圍如下：血漿 HDL-總膽固醇，0.20 至 0.31 g/L；血漿 LDL-總膽固醇，0.06 至 0.09 g/L；及血漿 VLDL-總膽固醇，0.007 至 0.011 g/L。

序列表

<110> 法商塞勒尼斯醫療控股公司
<120> 脂蛋白複合物及其製備及用途
<130> 376201-015TW
<140> 101103979
<141> 2012/02/07
<150> 61/440,371
<151> 2011-02-07

<150> 61/452,630
<151> 2011-03-14

<150> 61/487,263
<151> 2011-05-17

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 267
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1
Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu
145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala
165 170 175

Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn
195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu
210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln
225 230 235 240

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala
245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
260 265

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 信號
<222> (1)..(18)
<400> 2

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

Gln Ala

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 前肽
<222> (1)..(6)
<400> 3

Arg His Phe Trp Gln Gln
1 5

<210> 4
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> Inp為異哌啶甲酸
<400> 4

Lys Leu Lys Gln Lys Leu Ala Glu Leu Leu Glu Asn Leu Leu Glu Arg
1 5 10 15

Phe Leu Asp Leu Val Inp
20

•

-
•
-
•

-
•
-
•

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 101103919

A61K 38/00 (2006.01)

※ 申請日： 101.2.9

※IPC 分類：

C07K 14/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

脂蛋白複合物及其製備及用途

LIPOPROTEIN COMPLEXES AND MANUFACTURING AND USES
THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明係關於脂蛋白複合物及脂蛋白群體，及其於治療及/或預防脂質異常性疾病、病症及/或病狀中之用途。本發明另外係關於脂蛋白元之重組表現、脂蛋白元之純化及使用基於熱循環之方法產生脂蛋白複合物。

三、英文發明摘要：

The present disclosure relates to lipoprotein complexes and lipoprotein populations and their use in the treatment and/or prevention of dyslipidemic diseases, disorders, and/or conditions. The disclosure further relates to recombinant expression of apolipoproteins, purification of apolipoproteins, and production of lipoprotein complexes using thermal cycling-based methods.

七、申請專利範圍：

1. 一種脂蛋白複合物群體，各脂蛋白複合物包含脂質部分及脂蛋白元部分，該脂蛋白元部分基本上由脂蛋白元 A-I(「ApoA-I」)組成，其中該等脂蛋白複合物之均質度為至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%，其係如凝膠滲透層析中之單峰所反映。
2. 如請求項 1 之群體，其進一步具有一個、兩個、三個或四個以下特徵：
 - (a) 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%之該等脂蛋白複合物係呈尺寸為 4 nm至 15 nm、尺寸為 6 nm至 15 nm、尺寸為 4 nm至 12 nm、尺寸為 6 nm至 12 nm或尺寸為 8 nm至 12 nm之粒子形式，如凝膠滲透層析(「GPC」)或動態光散射(「DLS」)所量測；
 - (b) 該群體中至少 80重量%、至少 85重量%、至少 90重量%或至少 95重量%之 ApoA-I係呈成熟形式；
 - (c) 該群體中不超過 20重量%、不超過 15重量%、不超過 10重量%或不超過 5重量%之 ApoA-I係呈未成熟形式；及
 - (d) 該群體中不超過 20重量%、不超過 15重量%、不超過 10重量%或不超過 5重量%之 ApoA-I係呈截短形式。
3. 如請求項 1 或 2 之群體，其進一步具有一個、兩個、三個、四個或五個以下特徵：
 - (a) 該群體中之該 ApoA-I中不超過 20%、不超過 15%、

不超過10%、不超過5%、不超過3%、不超過2%或不超過1%之甲硫胺酸112及不超過20%、不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過3%、不超過2%或不超過1%之甲硫胺酸148經氧化；

- (b) 該群體中之該ApoA-I中不超過15%、不超過10%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%之胺基酸經脫醯胺化；
- (c) 該群體含有不超過1 EU、不超過0.5 EU、不超過0.3 EU或不超過0.1 EU內毒素/毫克ApoA-I；
- (d) 該群體含有不超過100微微克、不超過50微微克、不超過25微微克、不超過10微微克或不超過5微微克宿主細胞DNA/毫克ApoA-I；及
- (e) 該群體含有不超過500奈克、不超過200奈克、不超過100奈克、不超過50奈克或不超過20奈克宿主細胞蛋白質/毫克ApoA-I。

4. 如請求項1或2之群體，其中該等複合物中之該脂質部分中不超過15重量%、或不超過10重量%、不超過5重量%或不超過2重量%之該脂質為膽固醇。
5. 如請求項1或2之群體，其中該ApoA-I為人類ApoA-I蛋白質。
6. 如請求項1或2之群體，其中該ApoA-I為重組ApoA-I。
7. 如請求項1或2之群體，其中該脂質部分基本上由95至99重量%中性磷脂及1至5重量%帶負電荷之磷脂組成。
8. 如請求項7之群體，其中該脂質部分基本上由96至98重

量%中性磷脂及2至4重量%帶負電荷之磷脂組成。

9. 如請求項1或2之群體，其中該脂質部分基本上由97重量%中性磷脂及3重量%帶負電荷之磷脂組成。
10. 如請求項9之群體，其中該中性脂質為天然鞘磷脂或合成鞘磷脂，視情況其中該脂質之過氧化值小於5毫當量氧/公斤、小於4毫當量氧/公斤、小於3毫當量氧/公斤或小於2毫當量氧/公斤。
11. 如請求項10之群體，其中該鞘磷脂為卵鞘磷脂。
12. 如請求項9之群體，其中該帶負電荷之磷脂包含磷脂醯甘油。
13. 如請求項12之群體，其中該帶負電荷之磷脂包含1,2-二軟脂醯基-sn-甘油-3-[磷醯基-rac-(1-甘油)](DPPG)之鹽或由1,2-二軟脂醯基-sn-甘油-3-[磷醯基-rac-(1-甘油)]之鹽組成。
14. 如請求項1或2之群體，其脂蛋白元部分與磷脂部分之重量比在1:2至約1:3範圍內。
15. 一種組合物，其包含兩個、三個或四個如請求項1至14中任一項之群體。
16. 如請求項15之組合物，該組合物中不超過15%、不超過12%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%、不超過1%之該脂蛋白係呈未複合形式。
17. 如請求項15或16之組合物，該組合物中不超過15%、不超過12%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過

7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%、不超過1%之該脂質係呈未複合形式。

18. 如請求項15或16之組合物，其包含第一群體，該第一群體包含每個脂蛋白複合物具有2個ApoA-I分子或ApoA-I當量的脂蛋白複合物。
19. 如請求項17之組合物，其包含第一群體，該第一群體包含每個脂蛋白複合物具有2個ApoA-I分子或ApoA-I當量的脂蛋白複合物。
20. 如請求項18之組合物，其包含第二群體及視情況選用之第三群體，該第二群體包含每個脂蛋白複合物具有3個或4個ApoA-I分子或ApoA-I當量的脂蛋白複合物，且該第三群體包含每個脂蛋白複合物具有4個或3個ApoA-I分子或ApoA-I當量的脂蛋白複合物。
21. 如請求項19之組合物，其包含第二群體及視情況選用之第三群體，該第二群體包含每個脂蛋白複合物具有3個或4個ApoA-I分子或ApoA-I當量的脂蛋白複合物，且該第三群體包含每個脂蛋白複合物具有4個或3個ApoA-I分子或ApoA-I當量的脂蛋白複合物。
22. 如請求項15或16之組合物，其進一步包含一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑。
23. 如請求項17之組合物，其進一步包含一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑。
24. 如請求項18之組合物，其進一步包含一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑。

25. 如請求項19之組合物，其進一步包含一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑。
26. 如請求項20之組合物，其進一步包含一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑。
27. 如請求項21之組合物，其進一步包含一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑。
28. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至14中任一項之脂蛋白複合物群體及一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑，或基本上由如請求項1至14中任一項之脂蛋白複合物群體及一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑組成。
29. 一種單位劑型，其包含治療有效量之如請求項28之醫藥組合物。
30. 一種哺乳動物宿主細胞，其經工程改造以表現ApoA-I蛋白質，該ApoA-I蛋白質之胺基酸序列與SEQ ID NO:1之位置25至267具有至少95%一致性。
31. 一種哺乳動物細胞培養物，其包含複數個如請求項30之哺乳動物宿主細胞。
32. 一種產生具生物學活性之成熟ApoA-I蛋白質之方法，其包括在表現及分泌該ApoA-I蛋白質之條件下培養如請求項30之哺乳動物宿主細胞。
33. 一種製備脂蛋白複合物之方法，其包含：
 - (a) 使包含脂質組分及蛋白質組分之起始懸浮液自第一溫度範圍內之溫度冷卻至第二溫度範圍內之溫度，

其中該脂質組分基本上由脂質粒子組成，且其中該蛋白質組分基本上由脂質結合肽及/或脂質結合蛋白質組成；

(b) 將(a)之該冷卻之懸浮液自該第二溫度範圍內之溫度加熱至該第一溫度範圍內之溫度；

(c) 使(b)之該加熱之懸浮液自該第一溫度範圍內之溫度冷卻至該第二溫度範圍內之溫度；及

(d) 重複步驟(b)及(c)至少一次，藉此形成脂蛋白複合物。

34. 一種製備醫藥組合物之方法，其包括：

(a) 根據如請求項33之方法製備脂蛋白複合物群體；及

(b) 組合該脂蛋白複合物群體與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。

35. 一種治療脂質異常性病徵之方法，其包括向有需要之個體投與治療有效量之以下物質：

(a) 如請求項1至14中任一項之脂蛋白複合物群體；

(b) 如請求項15至27中任一項之組合物；

(c) 如請求項28之醫藥組合物；

(d) 治療有效量之由如請求項33之方法製得之脂蛋白複合物；

(e) 如請求項29之單位劑型；

(f) 在以高達45 mg/kg劑量單次投與健康志願者後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；

(g) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；

- (h) 在以 1 mg/kg 至 20 mg/kg 劑量單次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；
- (i) 在 2 次、3 次、4 次、5 次或 6 次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物，每次以 1 mg/kg 至 20 mg/kg 劑量投與；
- (j) 在以高達 20 mg/kg 劑量單次投與健康志願者後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；
- (k) 在 2 次、3 次、4 次、5 次或 6 次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；
- (l) 在以 1 mg/kg 至 20 mg/kg 劑量單次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；或
- (m) 在 2 次、3 次、4 次、5 次或 6 次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物，每次以 1 mg/kg 至 20 mg/kg 劑量投與。

36. 一種治療脂質異常性病徵之方法，其包括：

- (a) 向個體投與 1 mg/kg 至 12 mg/kg 初始劑量之以下物質：
 - (i) 如請求項 1 至 14 中任一項之脂蛋白複合物群體；
 - (ii) 如請求項 15 至 27 中任一項之組合物；
 - (iii) 如請求項 28 之醫藥組合物；
 - (iv) 治療有效量之由如請求項 33 之方法製得之脂蛋白複合物；
 - (v) 如請求項 29 之單位劑型；

- (vi) 在以高達45 mg/kg劑量單次投與健康志願者後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；
 - (vii) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；
 - (viii) 在以1 mg/kg至20 mg/kg劑量單次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物；
 - (ix) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起肝酶升高之脂蛋白複合物，每次以1 mg/kg至20 mg/kg劑量投與；
 - (x) 在以高達20 mg/kg劑量單次投與健康志願者後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；
 - (xi) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；
 - (xii) 在以1 mg/kg至20 mg/kg劑量單次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物；或
 - (xiii) 在2次、3次、4次、5次或6次投與人類個體後不引起三酸甘油酯增加超過兩倍之脂蛋白複合物，每次以1 mg/kg至20 mg/kg劑量投與；
- (b) 在該投藥後4、8、12、24、48、72、168、336或504小時判定該個體之三酸甘油酯、VLDL-膽固醇

及/或VLDL-三酸甘油酯是否升高超過兩倍；及

- (c) 若該個體之三酸甘油酯、VLDL-膽固醇及/或VLDL-三酸甘油酯升高至超過給藥前含量的兩倍，則以較低劑量重複該投藥，且若該個體之三酸甘油酯、VLDL-膽固醇及/或VLDL-三酸甘油酯未升高至超過給藥前含量的兩倍，則以相等或更大劑量重複該投藥。

八、圖式：

1	2	3	4
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
MKAAVLT LAV	LFLTGSQARH	<u>FWQQ</u> DEPPQS	PWDRVKDLAT
5	6	7	8
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
VYVDVLKDSG	RDYVSQFEGS	ALGKQLNLKL	LDNWDSVTST
	1	1	1
9	0	1	2
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
FSKLREQ LGP	VTQEFWDNLE	KETEG LRQEM	SKDLEEVKAK
1	1	1	1
3	4	5	6
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
VQPYLDDFQK	KWQEEMEL YR	QKVEPLRAEL	QEGARQKLHE
1	1	1	2
7	8	9	0
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
LQEKL SPLGE	EMRDRARAHV	DALRTHLAPY	SDELRQRLAA
2	2	2	2
1	2	3	4
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
RLEALKENG G	ARLA EYHAKA	TEHLSTLSEK	AKPALEDLRQ
2	2		
5	6		
1234567890	1234567890	1234567	
GLLPVLESFK	VSFLSALE EY	TKKLNTQ	

圖 1

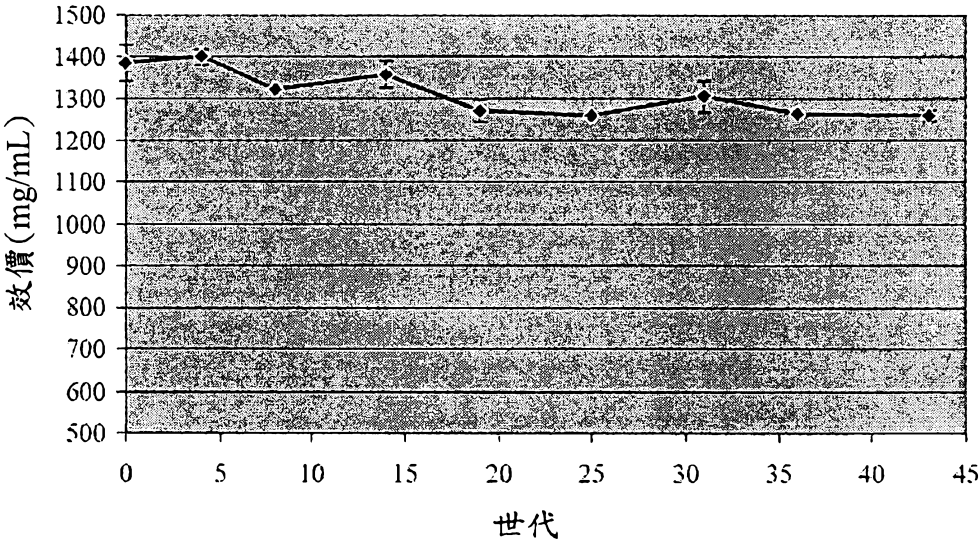


圖2

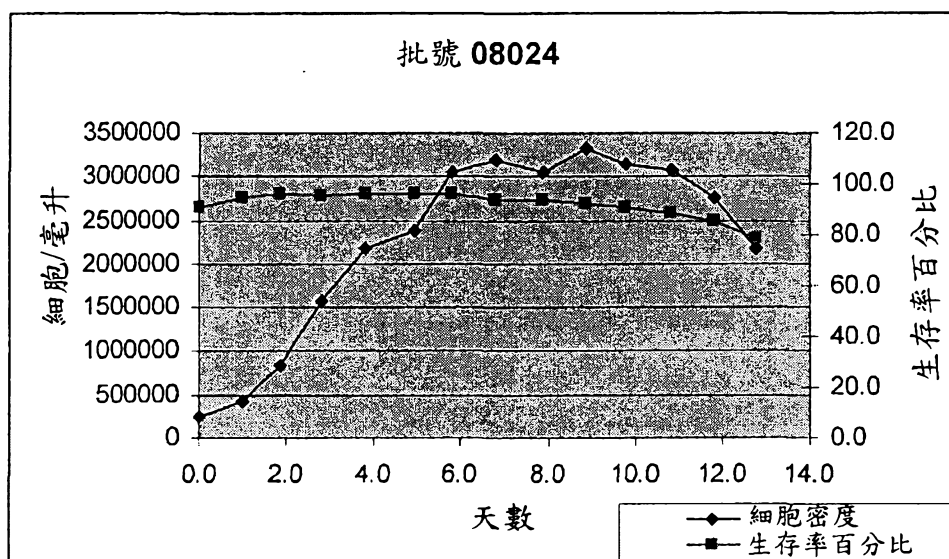


圖3A

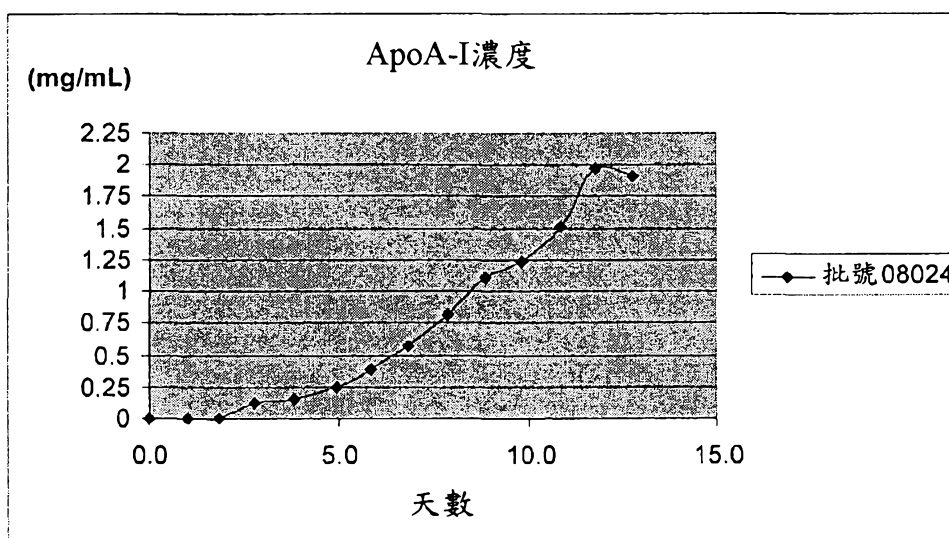


圖3B

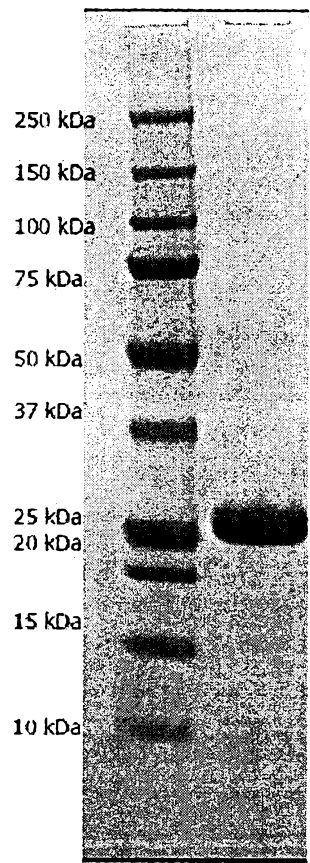


圖 4

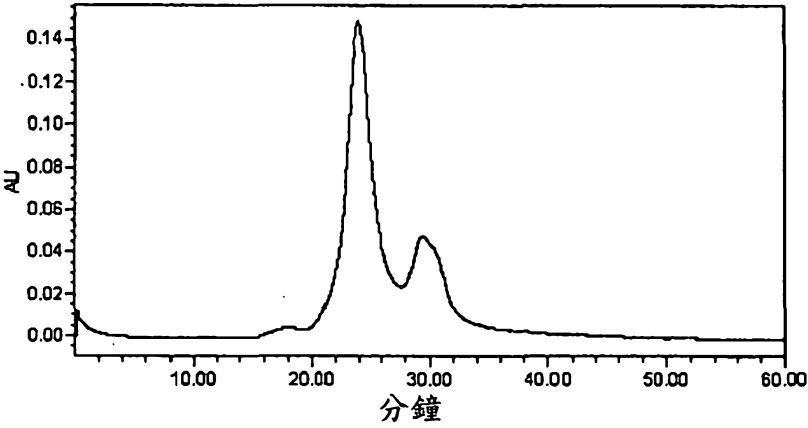


圖 5A

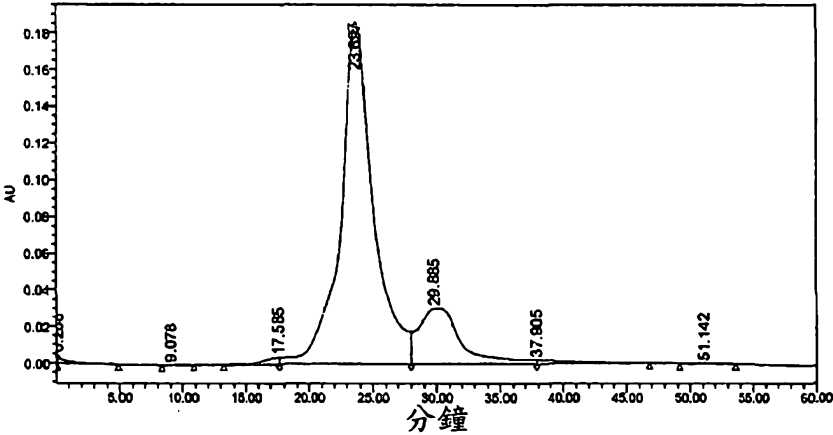


圖 5B

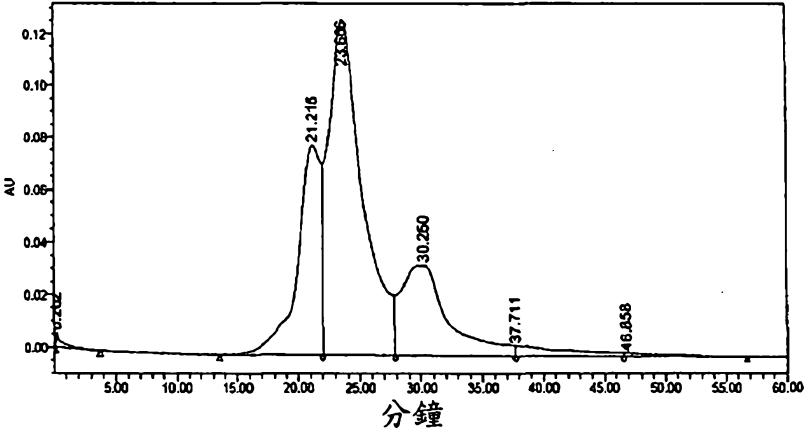


圖 5C

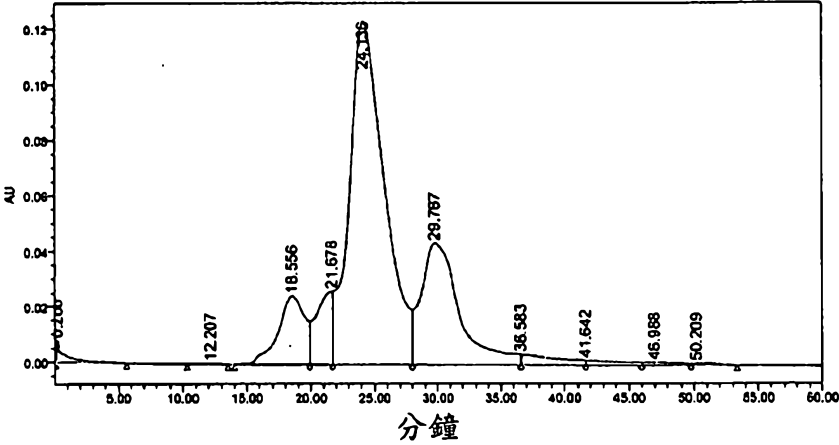


圖 5D

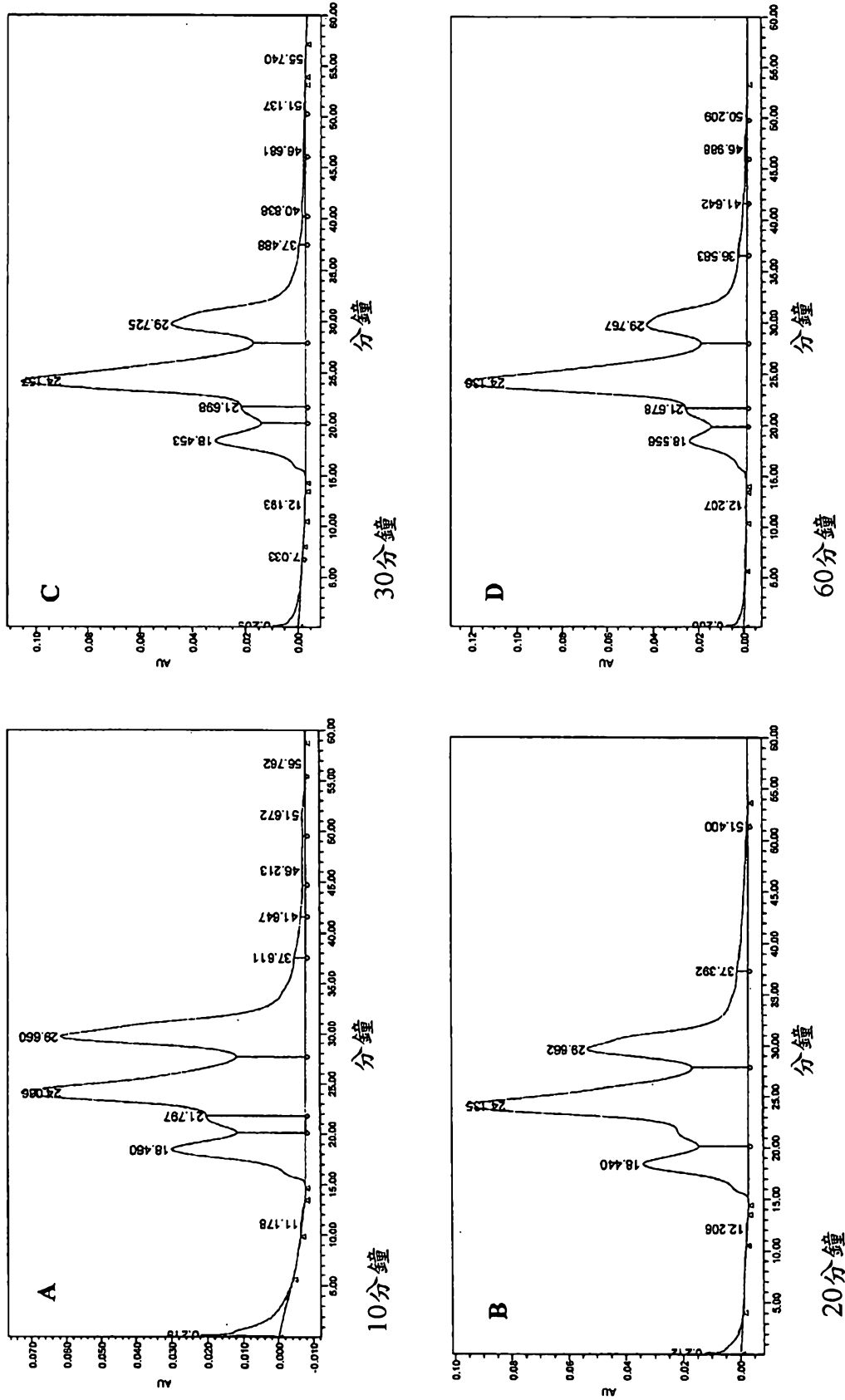


圖6

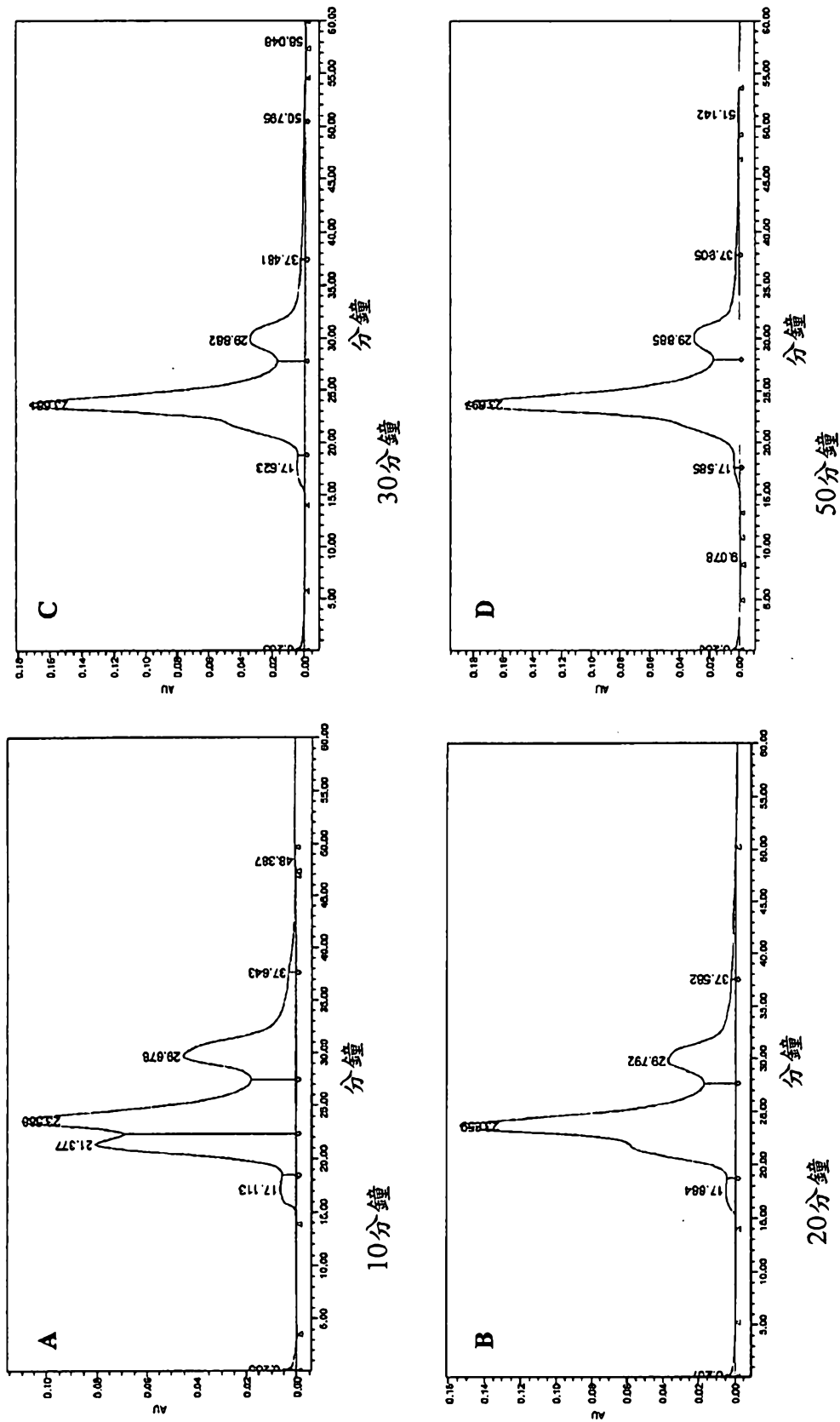


圖7

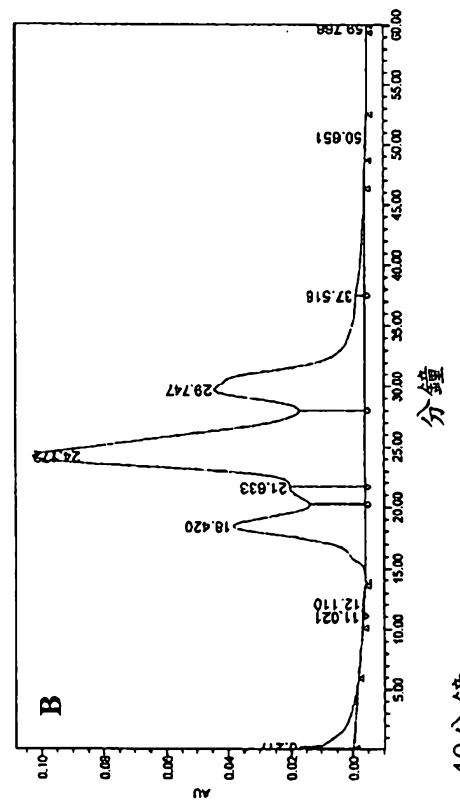
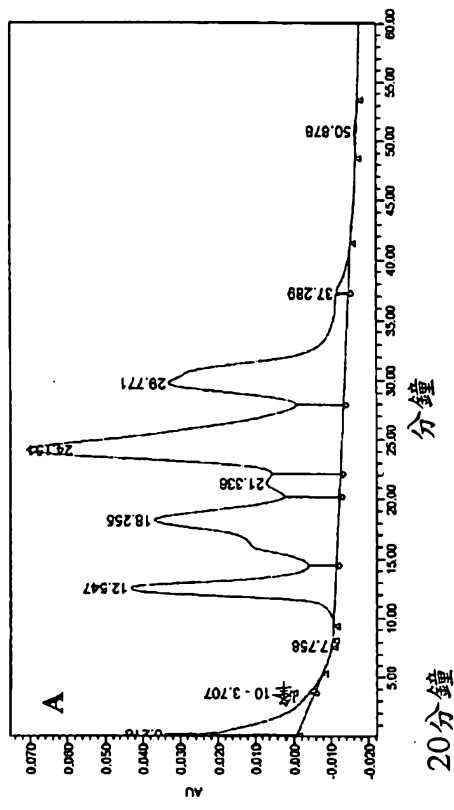
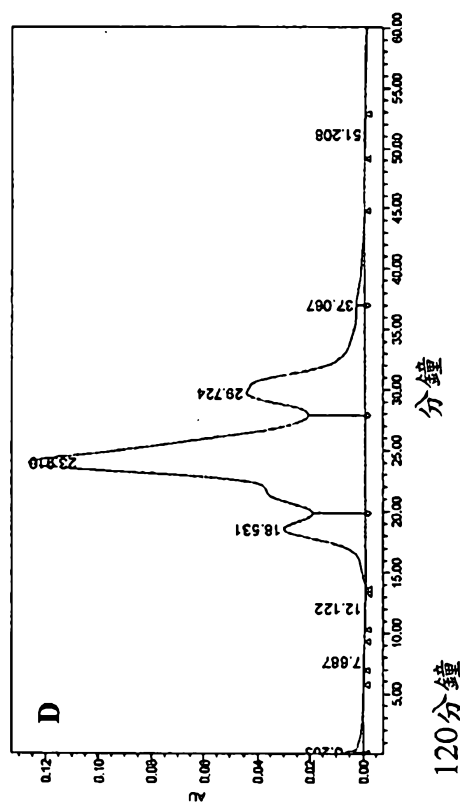
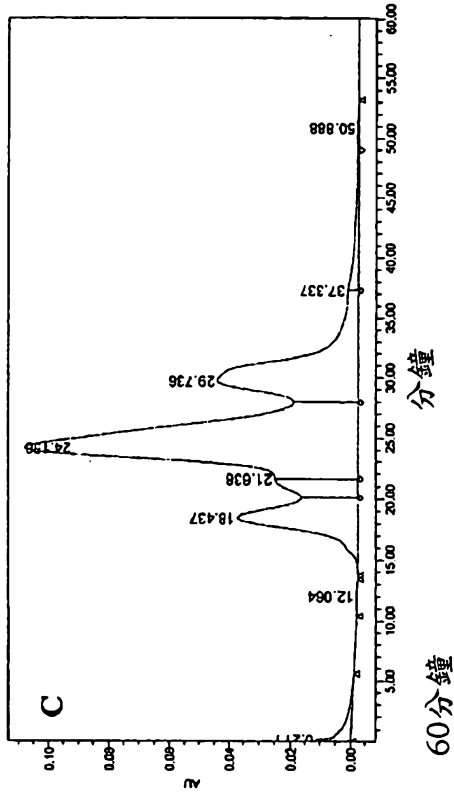


圖8

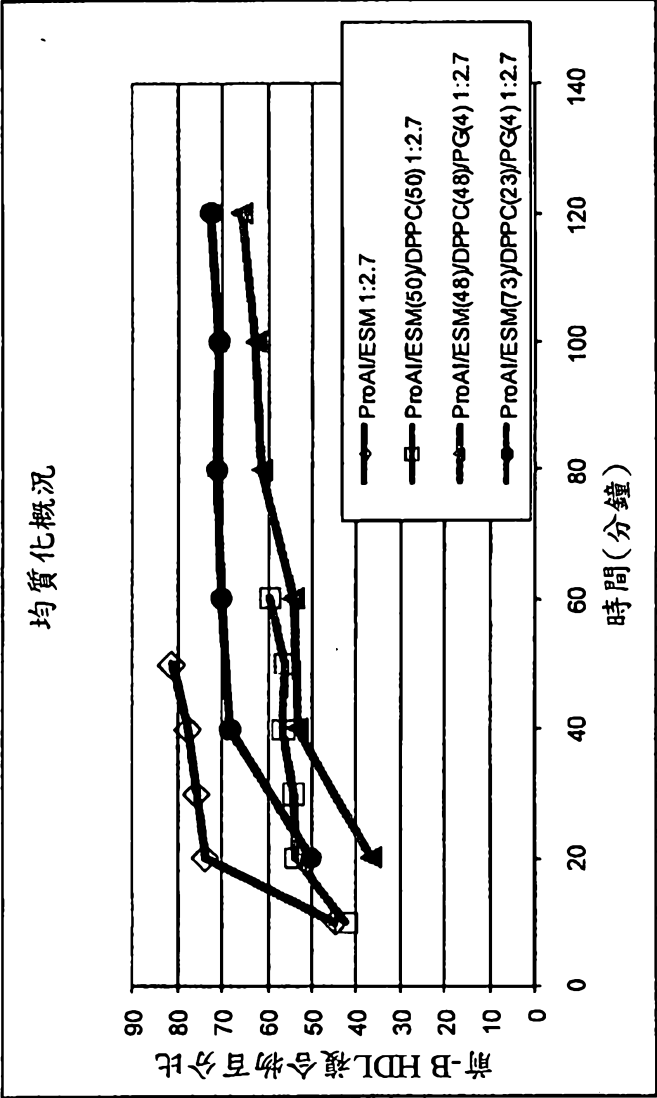


圖9

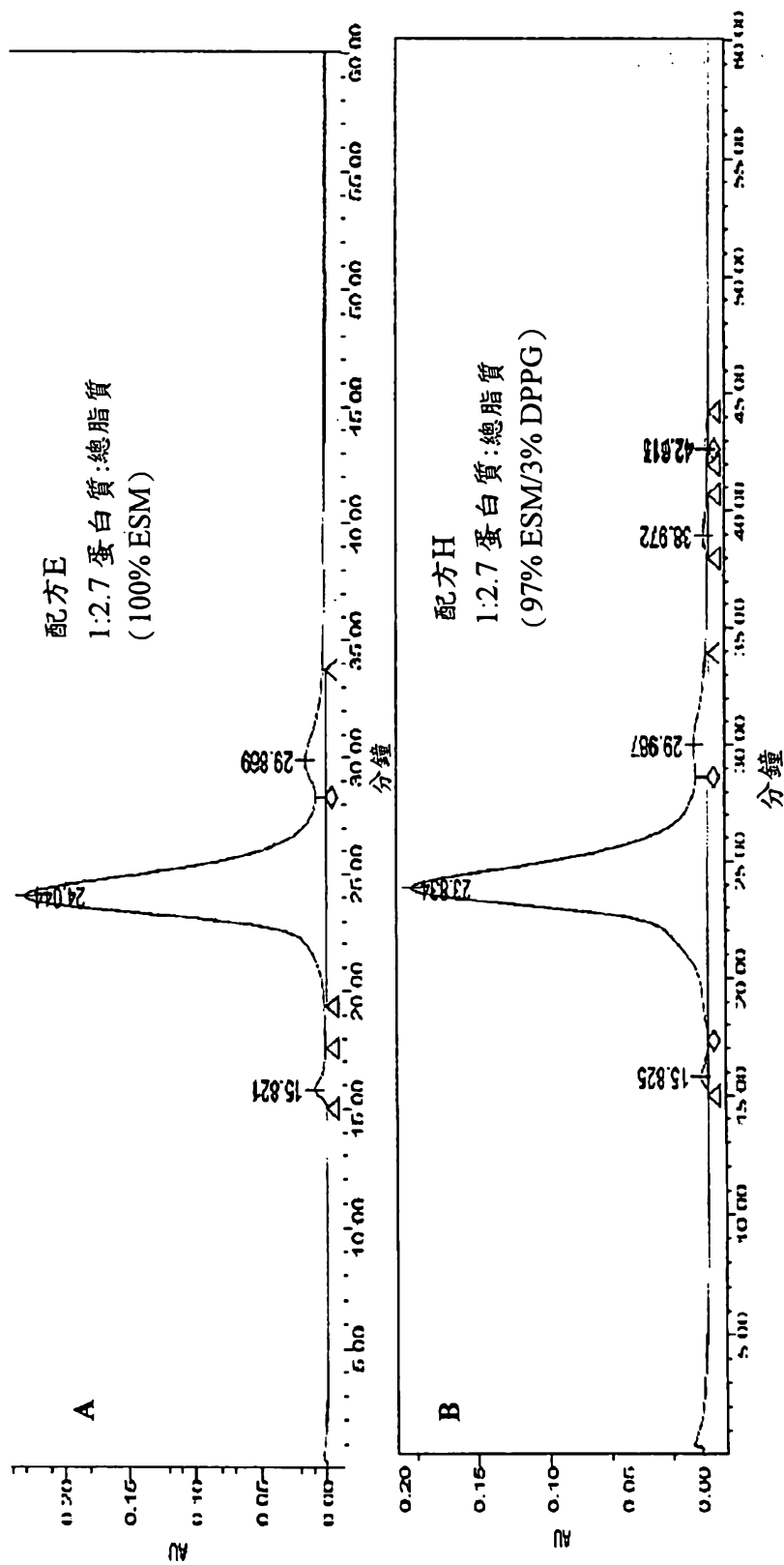


圖10

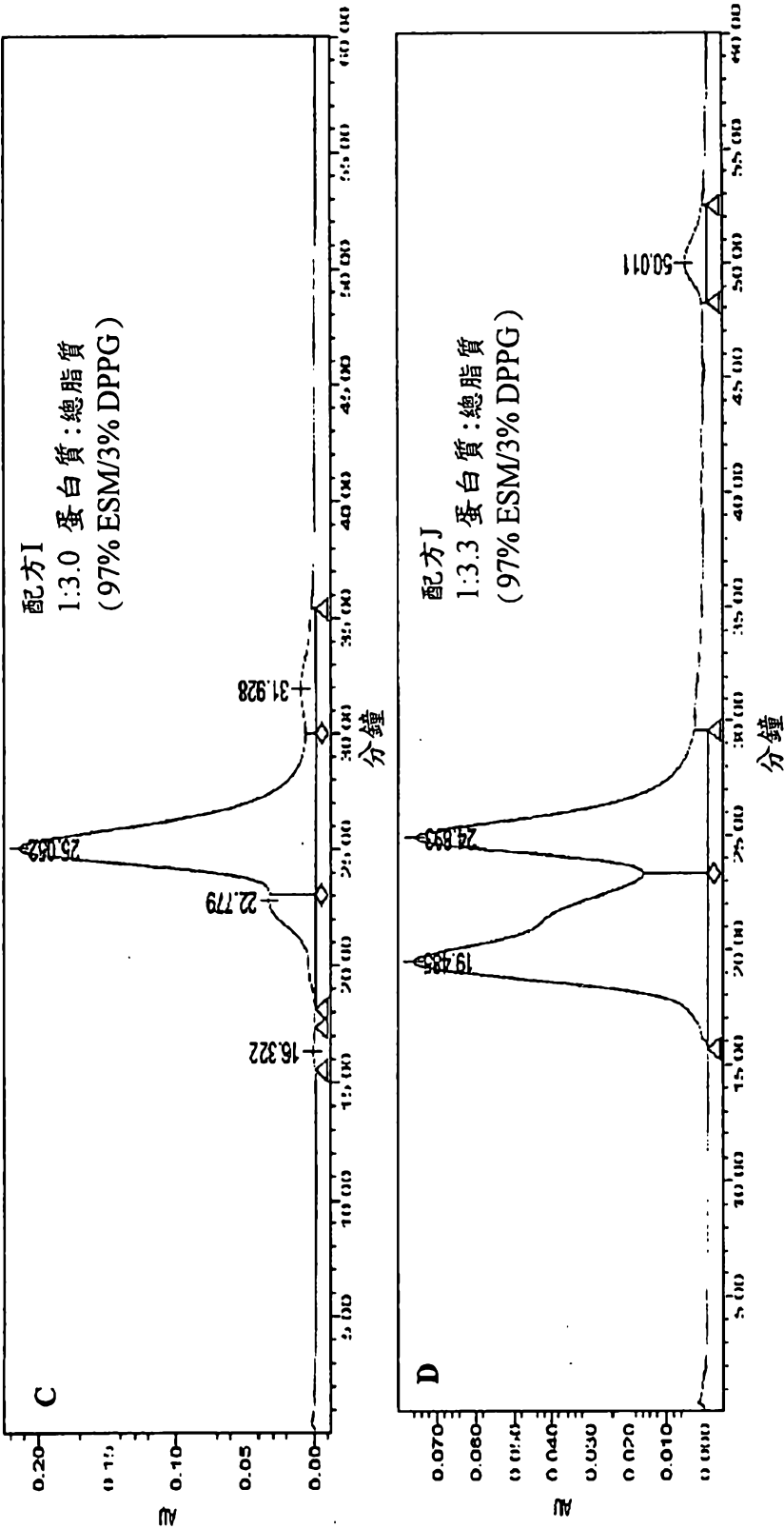


圖10(續)

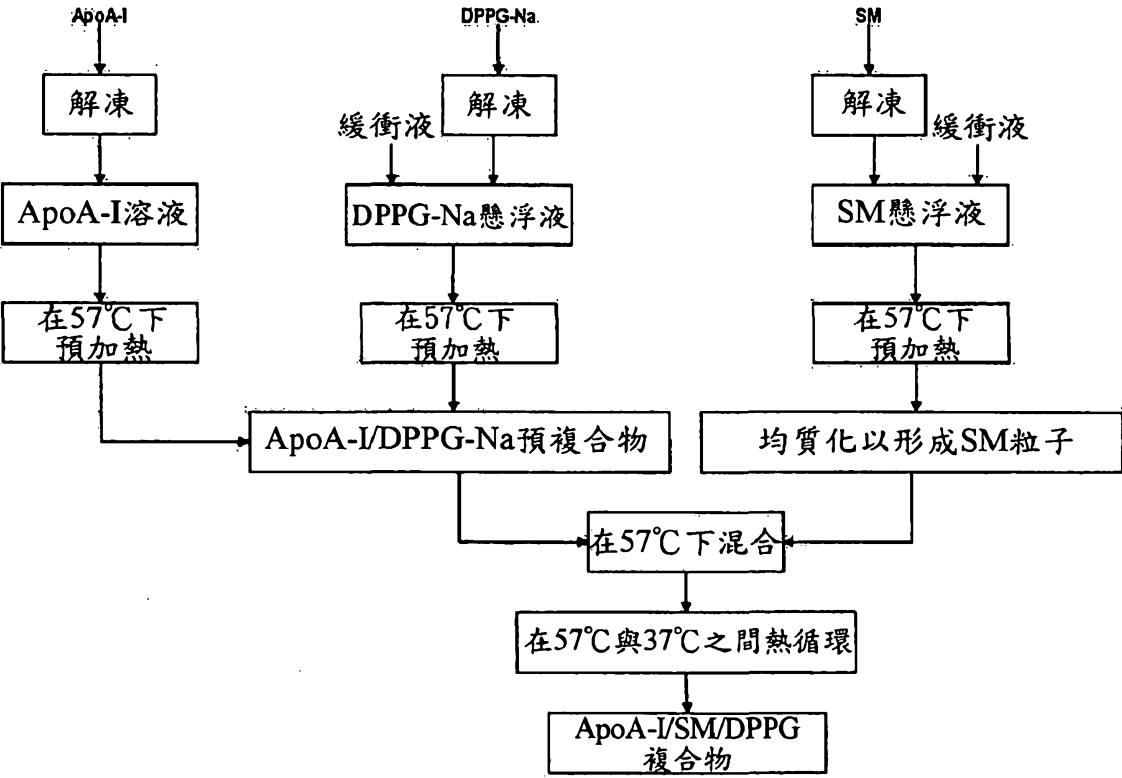


圖11

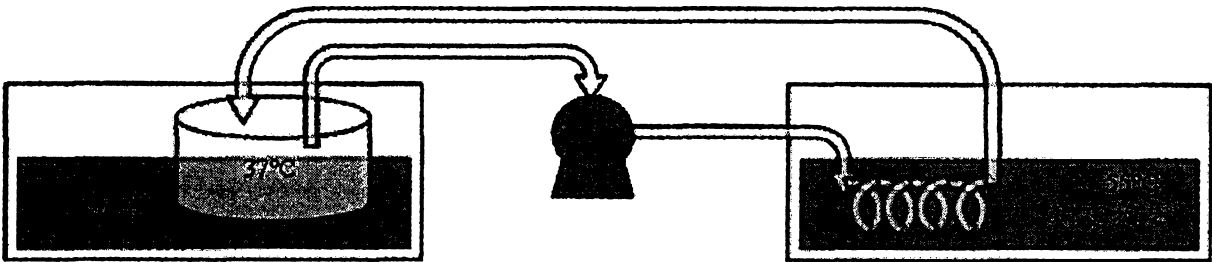


圖12

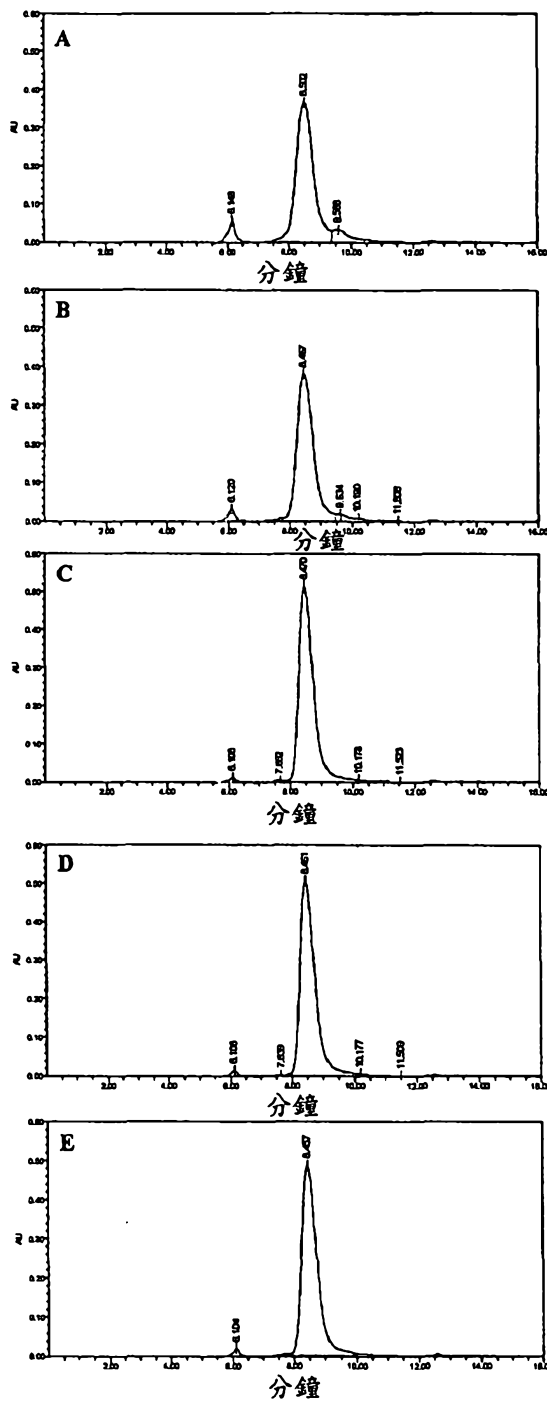


圖13A-13E

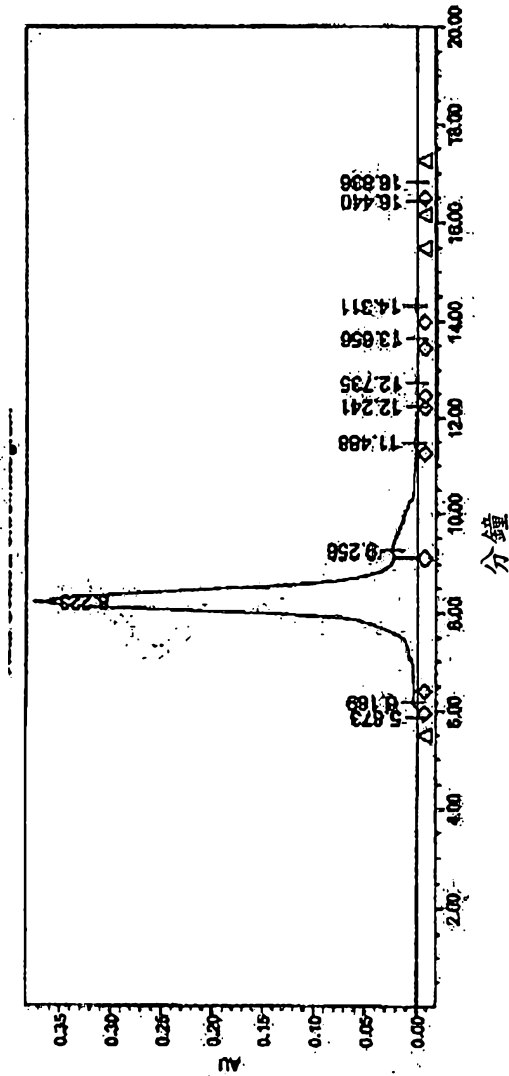


圖14

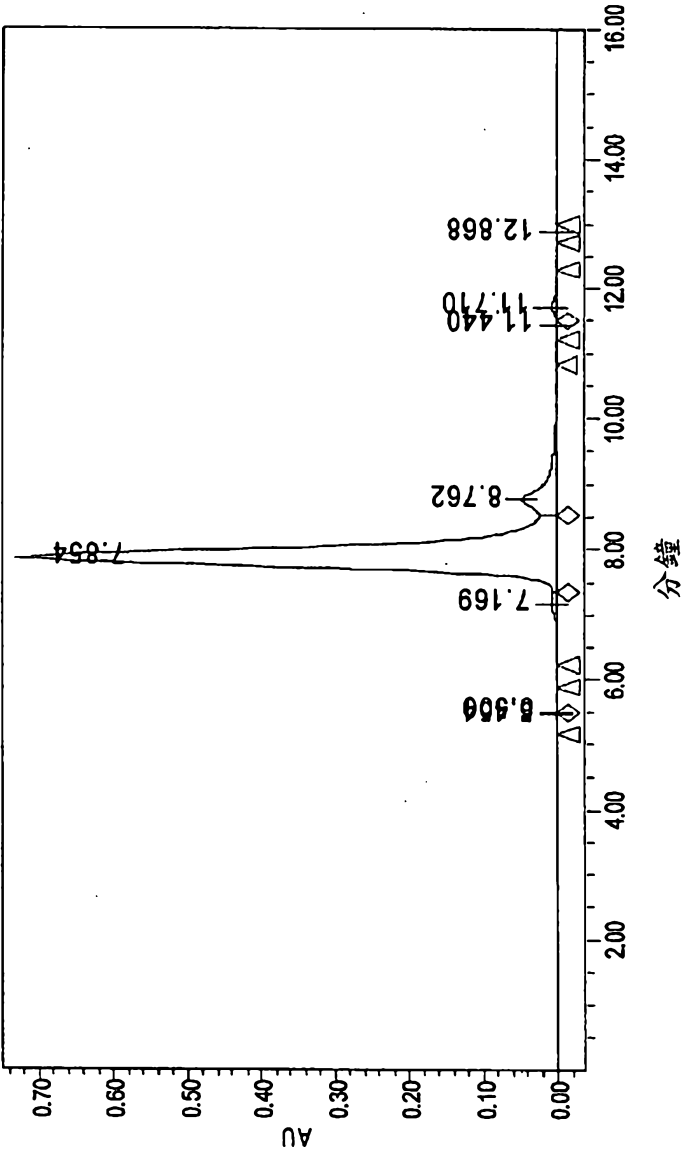


圖15

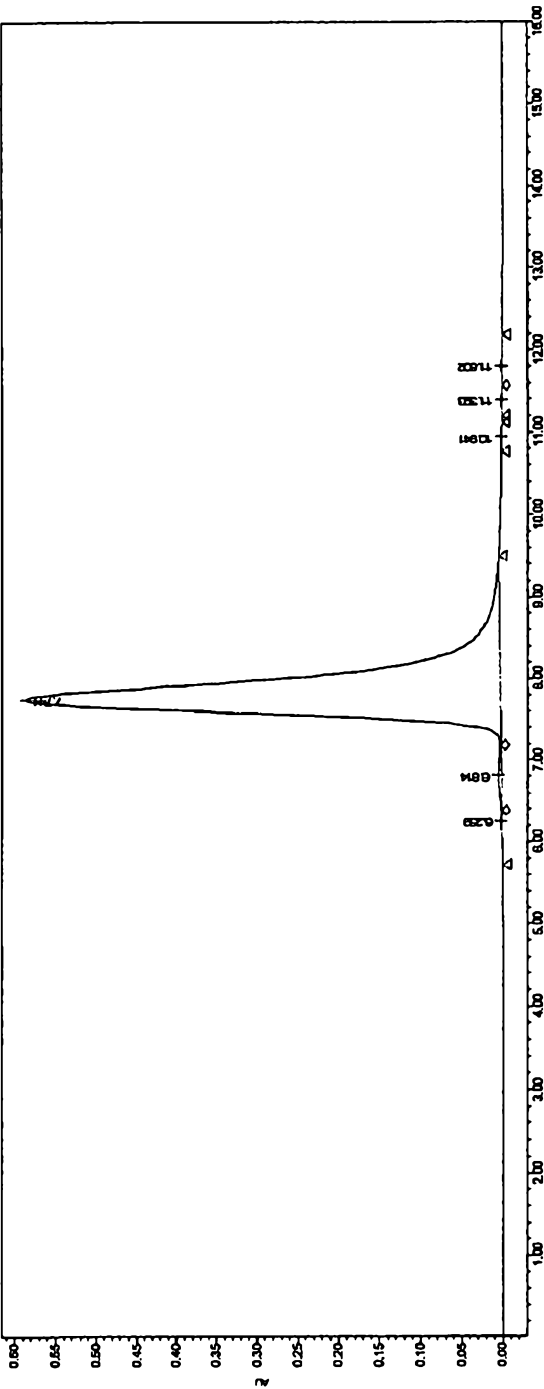


圖16

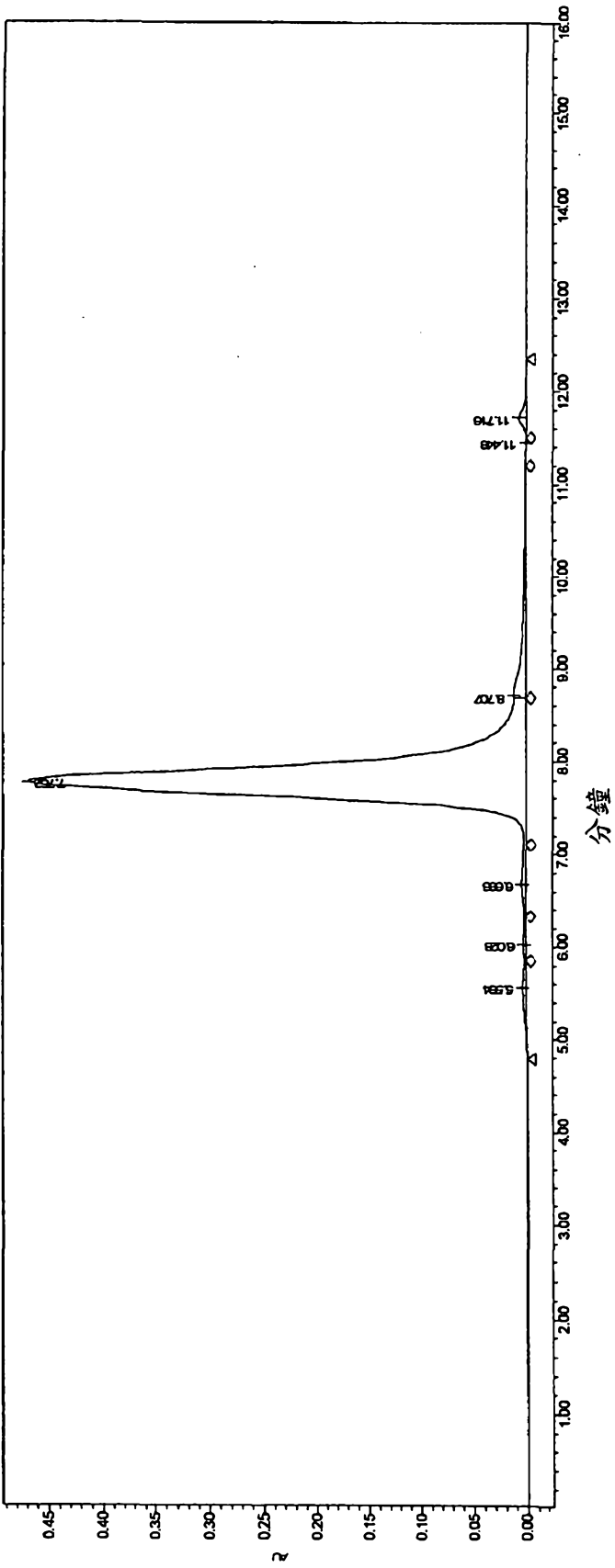


圖17

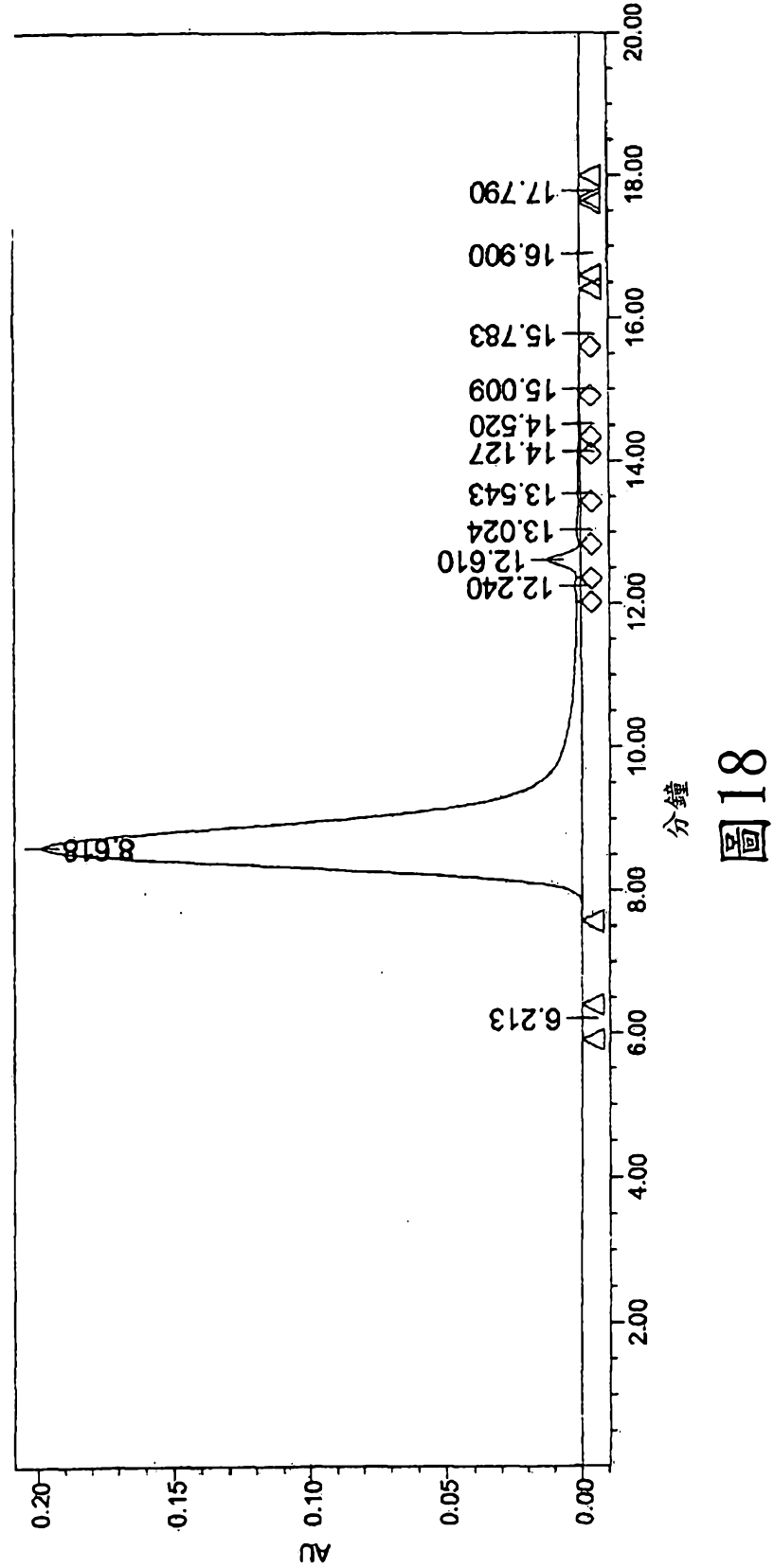


圖18

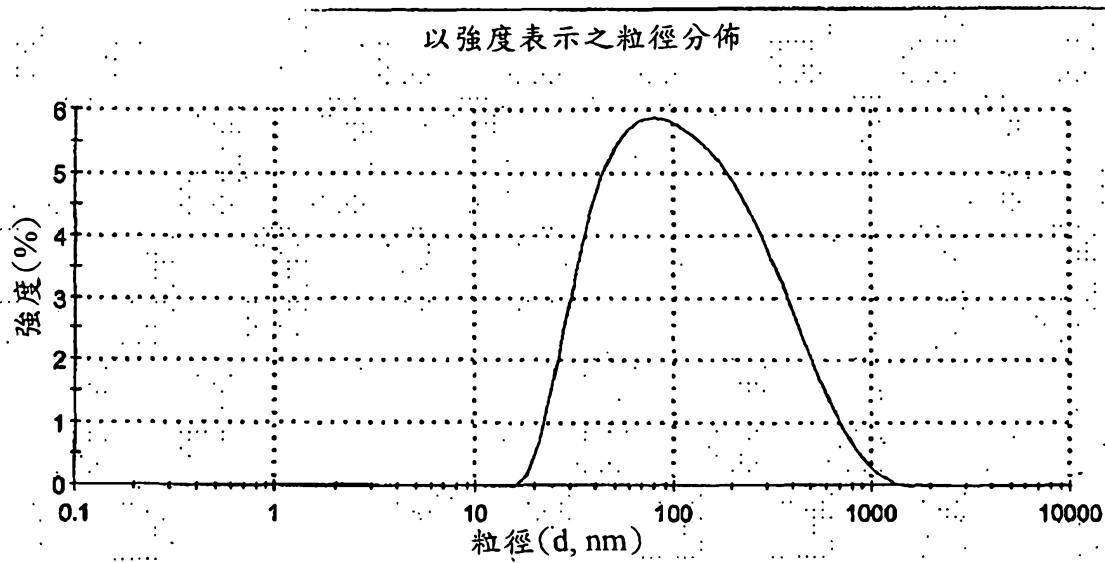


圖 19A

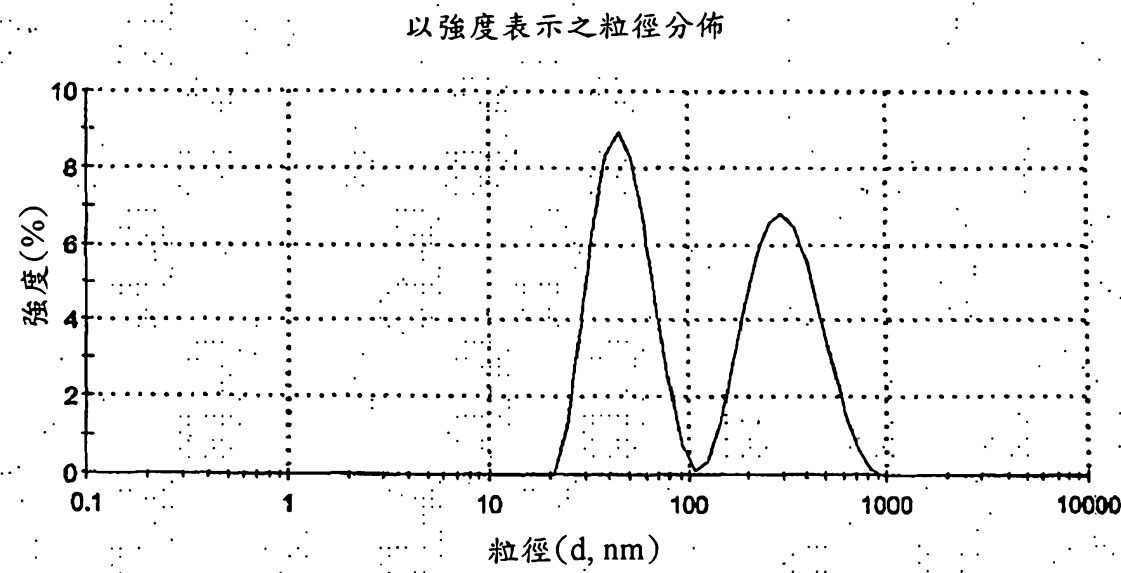


圖 19B

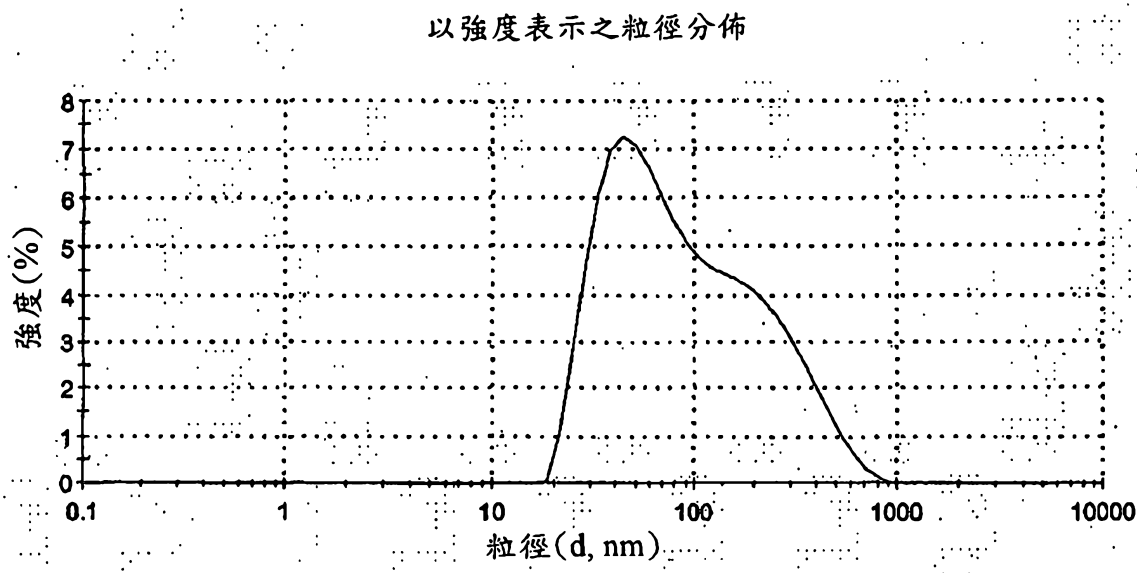


圖 19C

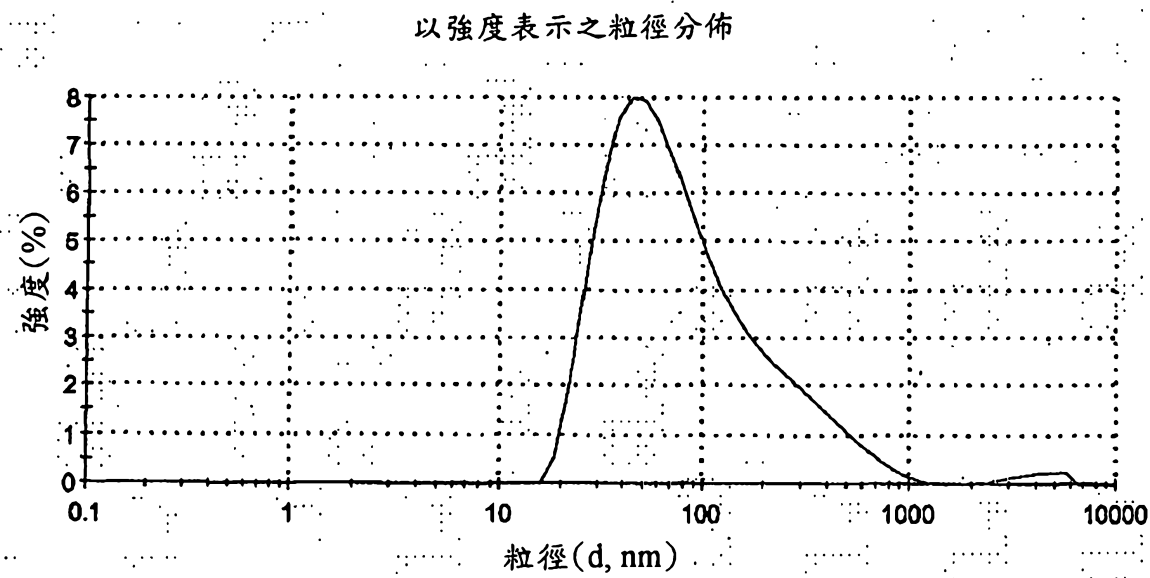


圖 19D

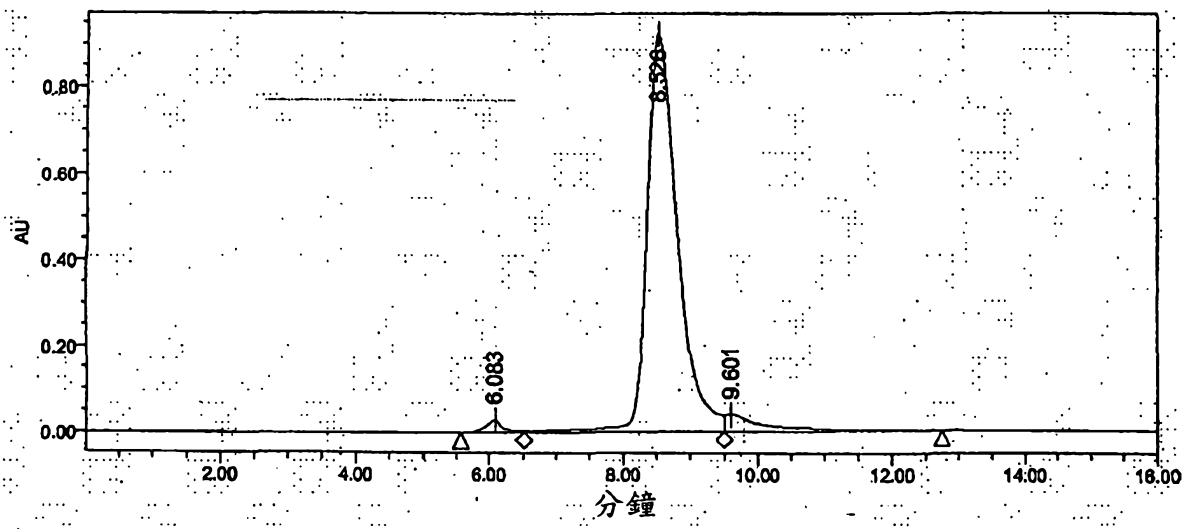


圖 20A

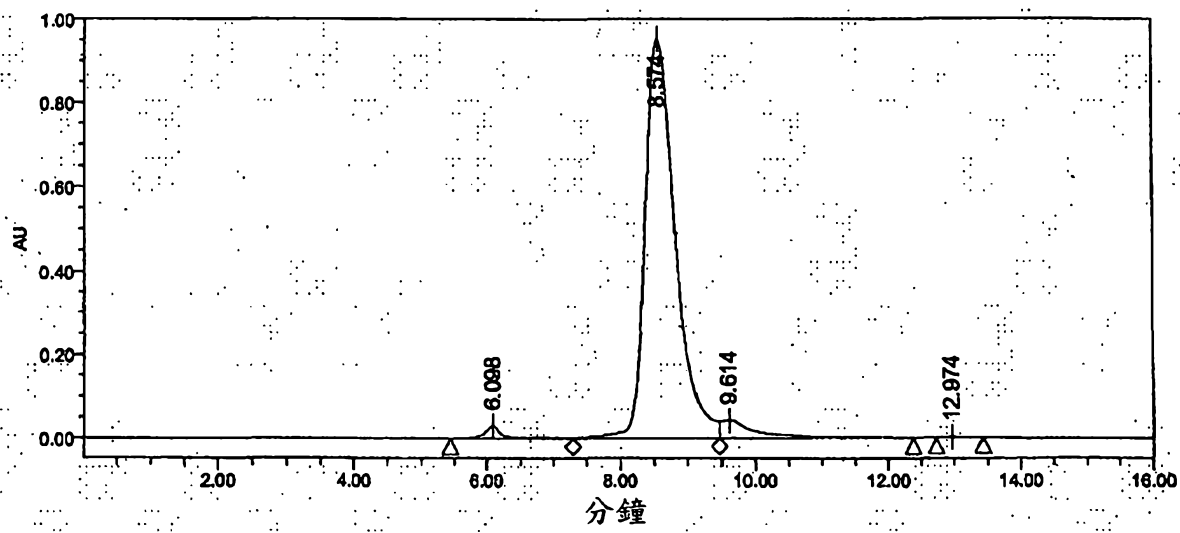


圖 20B

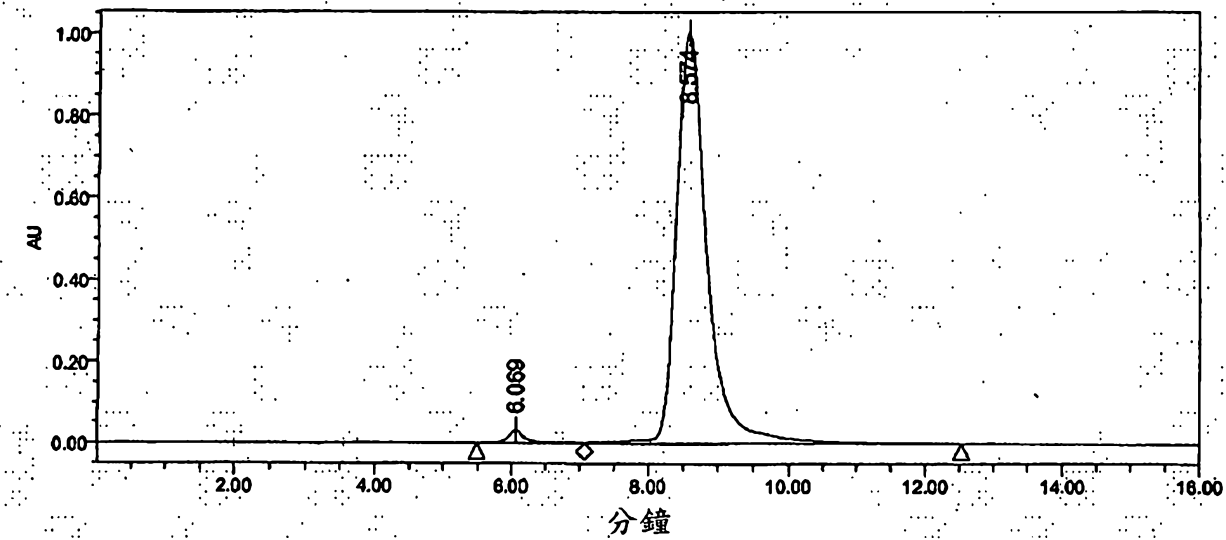


圖 20C

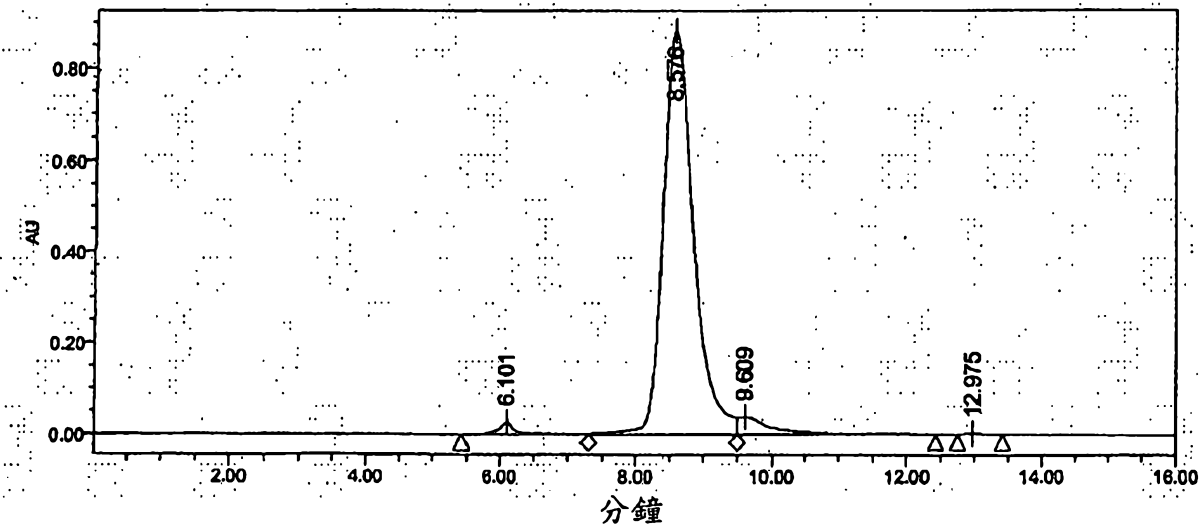


圖 20D

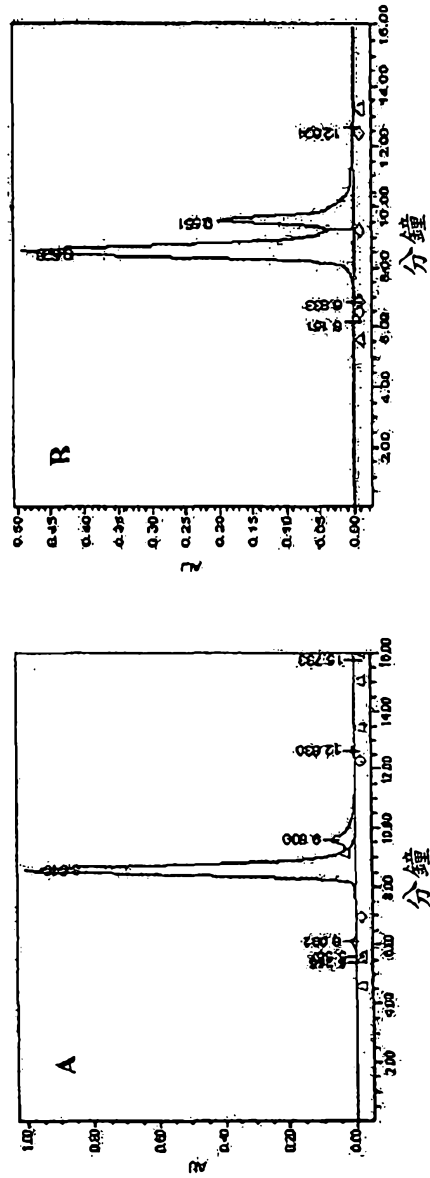


圖21

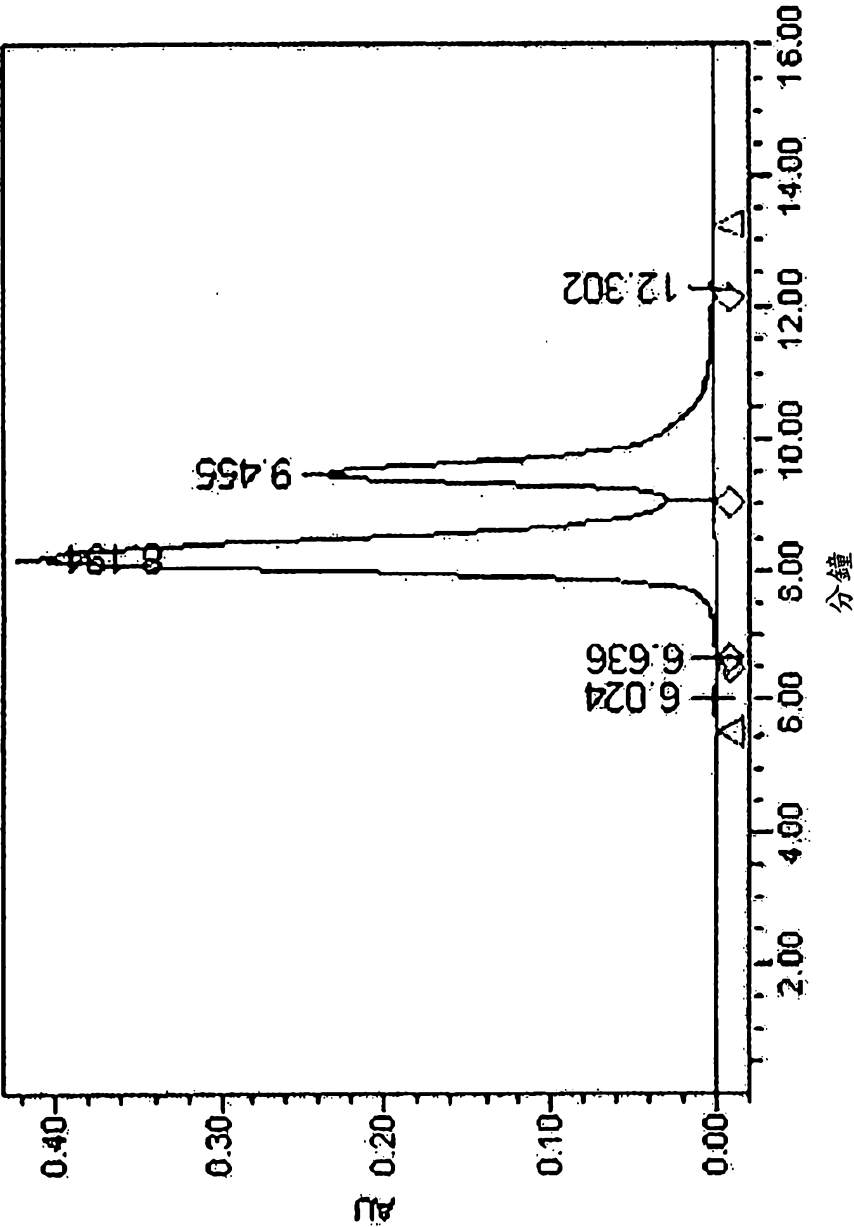


圖22

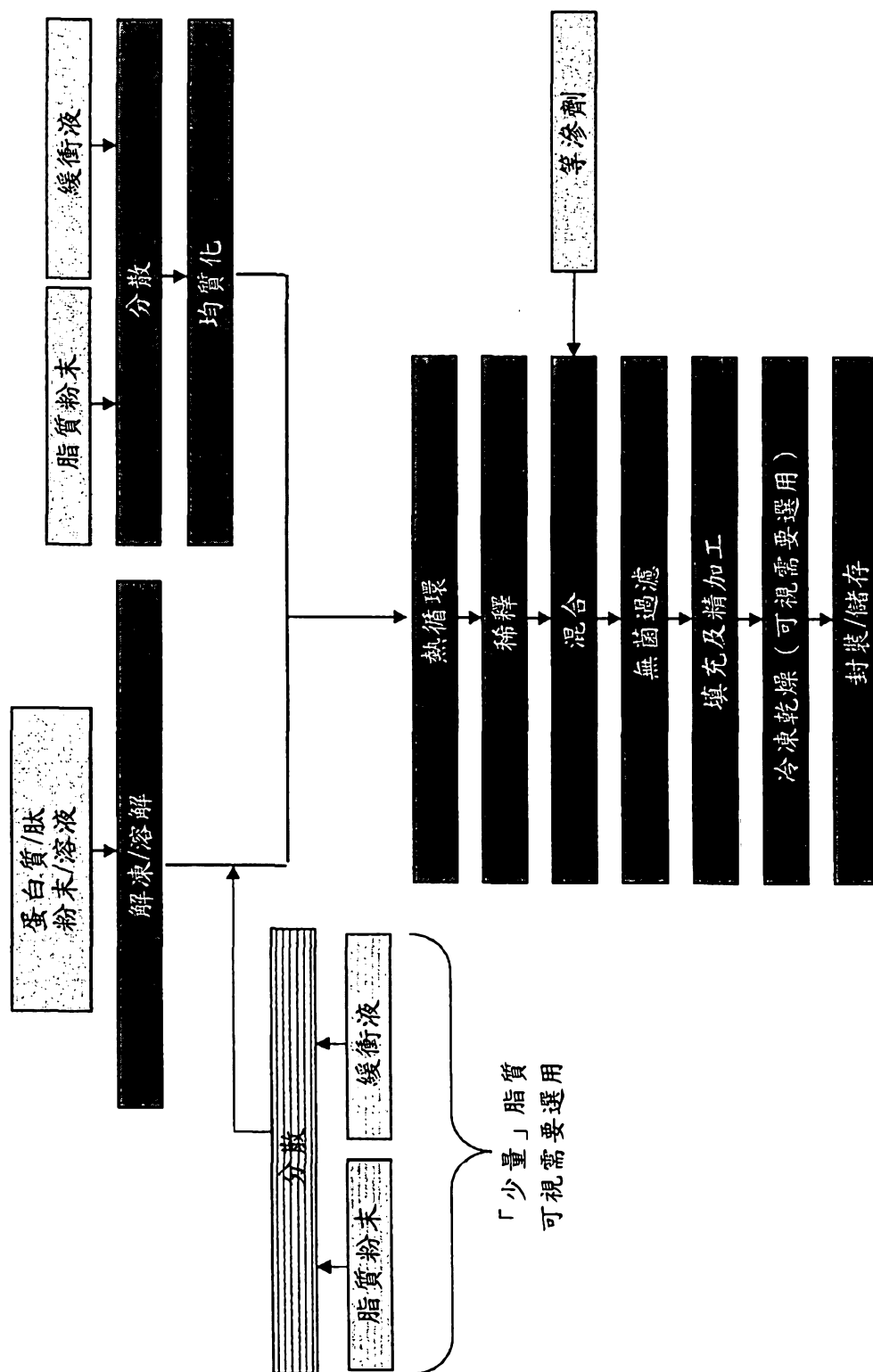


圖23

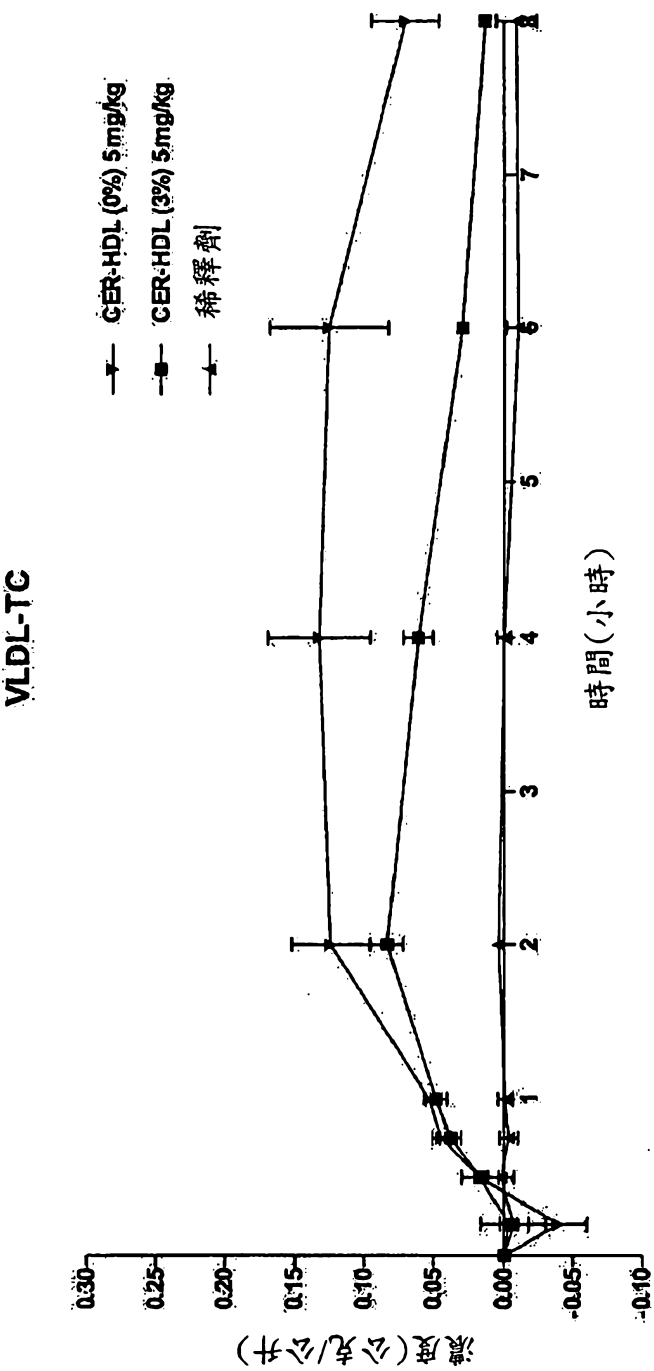


圖24

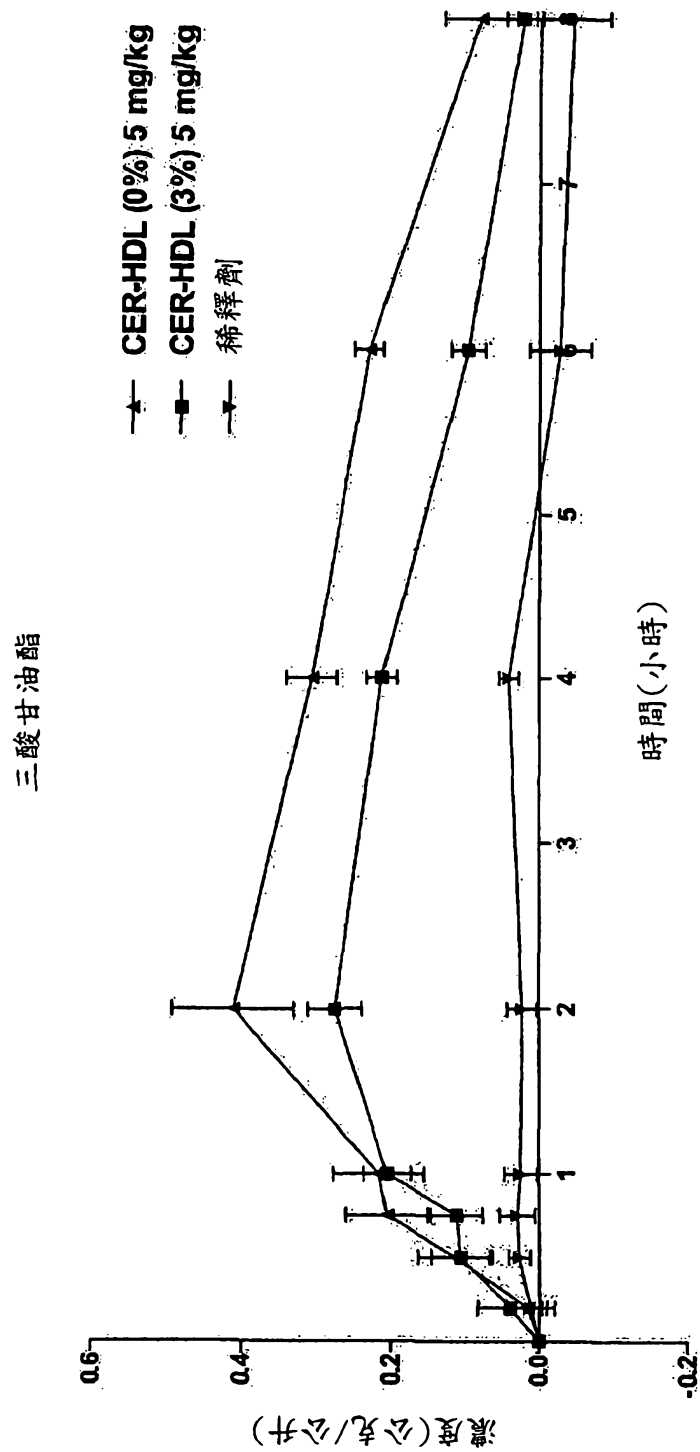


圖25

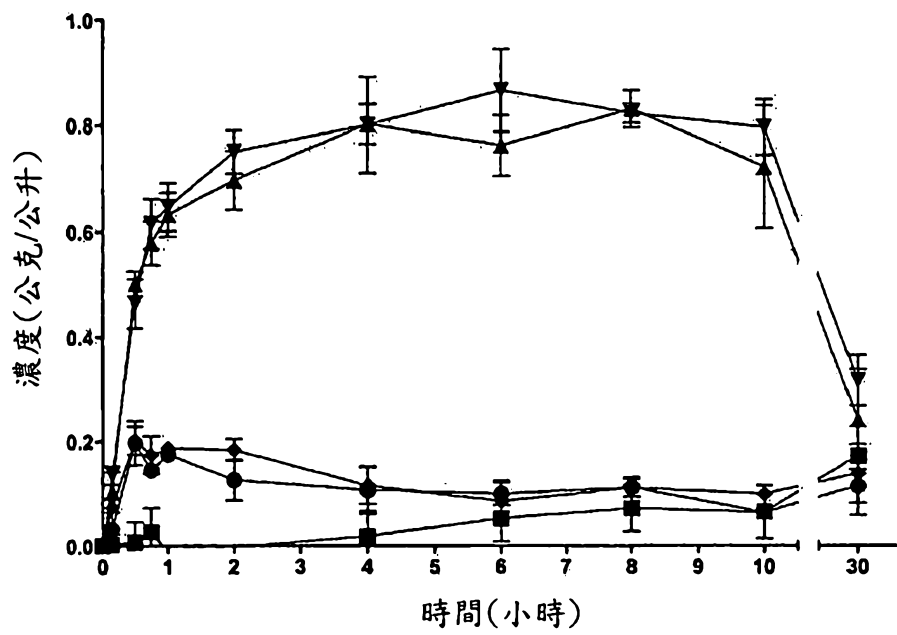


圖 26A

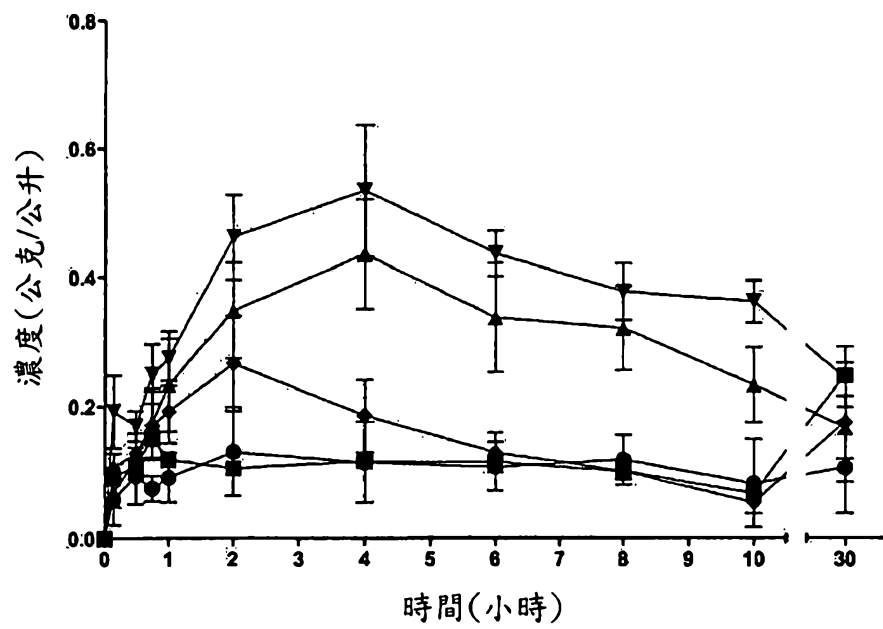


圖 26B

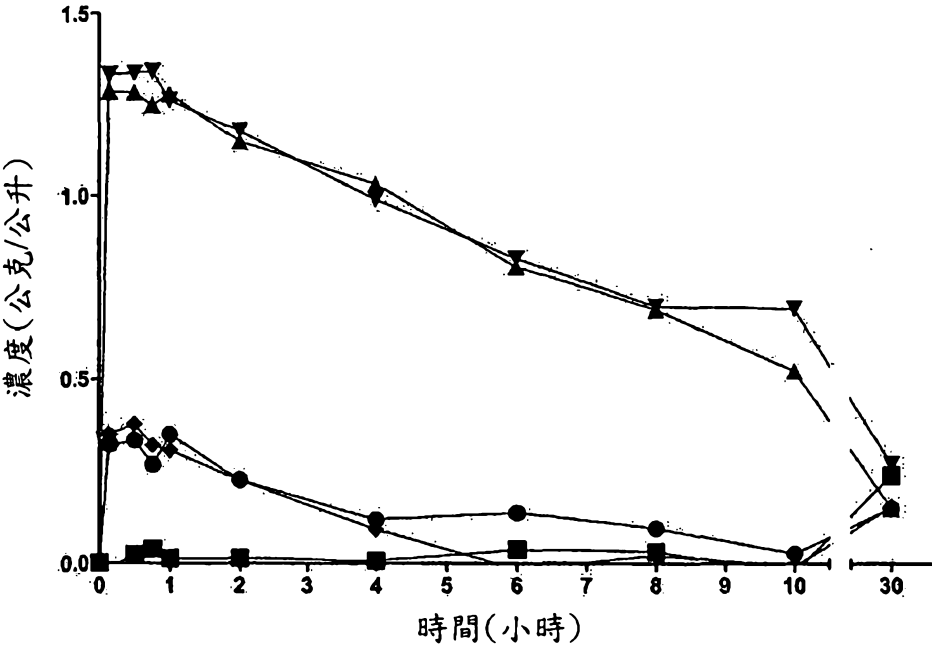


圖 26C

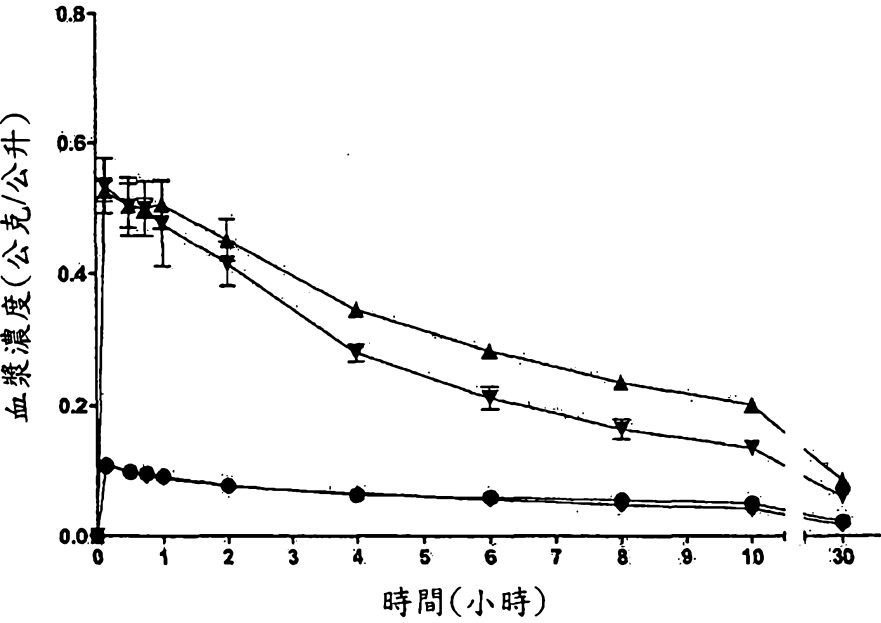


圖 26D

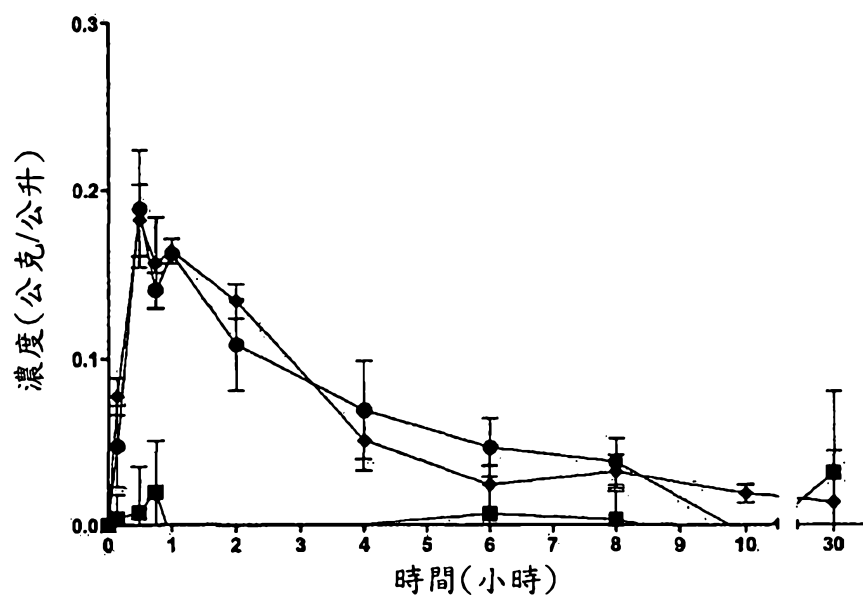


圖27A

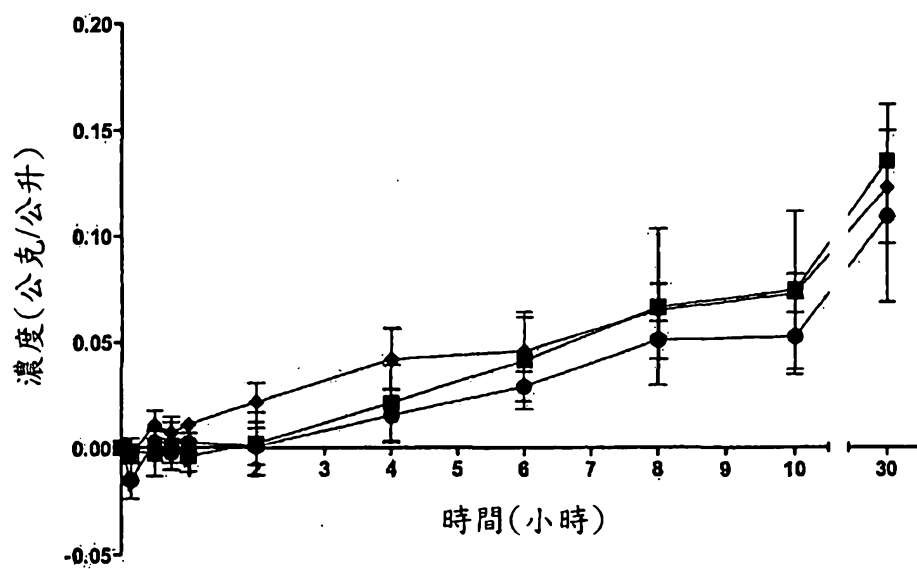


圖27B

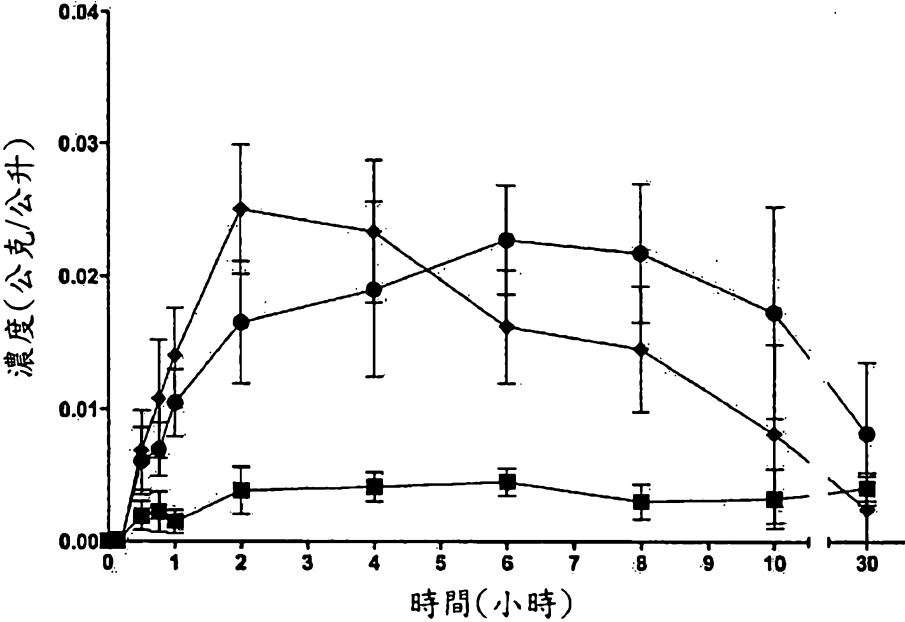


圖27C

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(13A-13E)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)