



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101170994 B

(45) 授权公告日 2013.01.02

(21) 申请号 200680015137.8

(22) 申请日 2006.03.23

(30) 优先权数据

60/665,180 2005.03.24 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.11.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2006/000635 2006.03.23

(87) PCT申请的公布数据

W02006/100567 EN 2006.09.28

(73) 专利权人 塞勒尼斯医疗控股公司

地址 法国拉贝若

(72) 发明人 吉恩-路易斯·H·达索伊克斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

A61K 38/10 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/775 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 03029294 A, 2003.04.10, 说明书第11-12页.

Daniel L. Sparks 等人. Effect of the surface lipid composition of reconstituted LPA-Ion apolipoprotein A-I structure and lecithin:cholesterolacyltransferase activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1390. 1998, 第160-164页.

审查员 梁敬臣

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 4 页

(54) 发明名称

荷电的脂蛋白络合物及其用途

(57) 摘要

本公开提供了荷电的脂蛋白络合物,其包括作为一种组分的负电荷磷脂,预期所述负电荷磷脂可使所述络合物具有改善的治疗性能。

1. 一种脂蛋白络合物,其包括 ApoA-I 载脂蛋白和脂质成分,其中所述脂质成分基本上由鞘磷脂和 3wt% 的负电荷磷脂组成,并且所述脂质成分与所述 ApoA-I 载脂蛋白的摩尔比范围为约 2 : 1 至 200 : 1。

2. 根据权利要求 1 所述的脂蛋白络合物,其中所述负电荷磷脂选自磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酸及其混合物。

3. 根据权利要求 1 所述的脂蛋白络合物,其中所述负电荷磷脂是磷脂酰甘油。

4. 根据权利要求 1 所述的脂蛋白络合物,其中所述鞘磷脂包括 D- 赤藓糖 - 鞘磷脂和 / 或 D- 赤藓糖 - 二氢鞘磷脂。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的脂蛋白络合物,其中所述鞘磷脂或所述负电荷磷脂的酰基链彼此相互独立地选自含有 6 至 24 个碳原子的、饱和、单不饱和以及多不饱和烃。

6. 根据权利要求 5 所述的脂蛋白络合物,其中所述鞘磷脂和 / 或所述负电荷磷脂的每条酰基链相同。

7. 根据权利要求 5 所述的脂蛋白络合物,其中所述鞘磷脂和所述负电荷磷脂的所述酰基链含有相同数目的碳原子。

8. 根据权利要求 5 所述的脂蛋白络合物,其中所述鞘磷脂和所述负电荷磷脂的所述酰基链具有不同的饱和度。

9. 根据权利要求 1 所述的脂蛋白络合物,其中所述 ApoA-I 载脂蛋白选自人成熟 ApoA-I、成熟 ApoA-I<sub>米兰</sub>、成熟 ApoA-I<sub>巴黎</sub>及其混合物。

10. 根据权利要求 1 所述的脂蛋白络合物,其中所述 ApoA-I 载脂蛋白是单体形式。

11. 根据权利要求 1 所述的脂蛋白络合物,其中所述 ApoA-I 载脂蛋白是人成熟 ApoA-I 载脂蛋白,并且所述负电荷磷脂是磷脂酰甘油。

12. 根据权利要求 1 所述的脂蛋白络合物,其中所述脂质成分与所述 ApoA-I 载脂蛋白的摩尔比范围为约 200 : 1 至 100 : 1。

13. 根据权利要求 1 所述的脂蛋白络合物,其中所述脂质成分与所述 ApoA-I 载脂蛋白的摩尔比范围为约 100 : 1 至 30 : 1。

14. 根据权利要求 1 所述的脂蛋白络合物,其中所述 ApoA-I 载脂蛋白是人成熟 ApoA-I 载脂蛋白,所述鞘磷脂是蛋鞘磷脂,所述负电荷磷脂是磷脂酰甘油,并且所述脂质成分与所述 ApoA-I 载脂蛋白的摩尔比范围为约 200 : 1 至 100 : 1。

15. 根据权利要求 1 所述的脂蛋白络合物,其中所述 ApoA-I 载脂蛋白是人成熟 ApoA-I 载脂蛋白,所述鞘磷脂是蛋鞘磷脂,所述负电荷磷脂是磷脂酰甘油,并且所述脂质成分与所述 ApoA-I 载脂蛋白的摩尔比范围为约 100 : 1 至 30 : 1。

16. 一种药物组合物,其包括根据权利要求 1-15 任一所述的脂蛋白络合物以及药学上可接受的载体、稀释剂和 / 或赋形剂。

17. 根据权利要求 1-15 任一所述的脂蛋白络合物在制备用于治疗受试者中血脂异常或与血脂异常相关的疾病的药物中的用途,其中所述血脂异常或与血脂异常相关的疾病为外周血管病、高血压、炎症、阿尔茨海默病、再狭窄、动脉粥样硬化以及动脉粥样硬化的多种临床表现;或者为冠心病、冠状动脉疾病、急性冠状动脉综合征、心血管疾病、高血压、再狭窄、血管或外周血管疾病、脂质代谢紊乱、异常脂蛋白血症、高浓度的低密度脂蛋白胆固醇、高浓度的极低密度脂蛋白胆固醇、低浓度的高密度脂蛋白、高浓度的脂蛋白 Lp(a) 胆固醇、

高浓度的载脂蛋白 B、动脉粥样硬化、高脂血症、高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、家族性复合高脂血症、脂蛋白脂肪酶缺乏、 $\alpha$  低脂蛋白血症或高胆固醇脂蛋白血症。

18. 根据权利要求 17 的用途,其中所述动脉粥样硬化的多种临床表现为休克、失血性休克、短暂性脑缺血发作、心肌梗死、急性冠状动脉综合征、心绞痛、肾血管性高血压、肾血管机能不全、间歇性跛行、严重的肢体缺血、静止痛和坏疽。

19. 根据权利要求 17 或 18 所述的用途,其中所述脂蛋白络合物以一定量使用,所述量使受试者中游离或络合的 ApoA-I 蛋白的血清水平与基线水平相比升高约 10-300mg/dL。

20. 根据权利要求 17 或 18 所述的用途,其中所述脂蛋白络合物的施用量足以递送约 1 至 100mg/kg 的 ApoA-I 载脂蛋白。

21. 根据权利要求 17 或 18 所述的用途,其中所述脂蛋白络合物被配制为用于静脉内施用。

22. 根据权利要求 17 或 18 所述的用途,其中所述药物用于治疗血脂异常。

23. 根据权利要求 17 或 18 所述的用途,其中所述药物用于治疗与血脂异常相关的疾病。

24. 根据权利要求 17 或 18 所述的用途,其中所述脂蛋白络合物被配制为用于与胆汁酸树脂、烟酸、抑制素、贝特类药物和 / 或胆固醇吸收抑制剂一起辅助地施用。

25. 根据权利要求 17 或 18 所述的用途,其中所述脂蛋白络合物被配制为用于以药物组合物的形式施用,所述药物组合物包括脂蛋白络合物以及药学上可接受的载体、稀释剂和 / 或赋形剂。

## 荷电的脂蛋白络合物及其用途

[0001] 1. 相关申请的交叉参照

[0002] 本申请按照 35 U. S. C. § 119(e) 要求享有 2005 年 3 月 24 日提交的、美国临时申请第 60/665, 180 号的权益, 通过引用将其全部内容并入本文。

### 2. 技术领域

[0003] 本公开提供了荷电的脂蛋白络合物、包括该络合物的药物组合物以及使用该络合物治疗或预防多种病症和失调的方法, 所述病症和失调包括血脂异常和 / 或与其相关的疾病、失调和 / 或病症。

### 3. 背景技术

[0004] 循环的胆固醇经由血液中转运脂质的、脂质与蛋白质组成的血浆脂蛋白络合物颗粒运送。血浆中循环的脂蛋白颗粒具有以下四种主要类别并且均包括在脂肪转运系统中: 乳糜微粒、极低密度脂蛋白 (VLDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 和高密度脂蛋白 (HDL)。乳糜微粒构成了肠内脂肪吸收的短寿命产物。VLDL 尤其是 LDL 负责将胆固醇由肝 (胆固醇在肝中合成或由饮食来源获得) 递送至肝外的组织——包括动脉壁。相反, HDL 介导胆固醇的逆转运 (RCT) 和胆固醇脂质的去除, 特别是介导由肝外组织至肝 (胆固醇在肝中储存、代谢、消除或再循环) 的胆固醇的逆转运 (RCT) 和胆固醇脂质的去除。HDL 在炎症、转运氧化的脂质和白细胞介素中也起到了关键性作用。

[0005] 脂蛋白颗粒具有包括胆固醇 (通常为胆固醇酯的形式) 和甘油三酯的疏水核。该核为包括磷脂、未酯化的胆固醇和载脂蛋白的表层所围绕。载脂蛋白介导脂质转运, 并且载脂蛋白中的一部分可与脂质代谢中涉及的酶相互作用。已经鉴别了至少十种载脂蛋白, 其包括: ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoA-V、ApoB、ApoC-I、ApoC-II、ApoC-III、ApoD、ApoE、ApoJ 和 ApoH。还发现了与脂蛋白缔合的其他蛋白质, 如 LCAT (卵磷脂:胆固醇酰基转移酶)、CETP (胆固醇脂转移蛋白)、PLTP (磷脂转移蛋白) 和 PON (对氧磷酶)。

[0006] 心血管疾病, 如冠心病、冠状动脉疾病和动脉粥样硬化在极大程度上与血清中升高的胆固醇浓度有关。例如, 动脉粥样硬化是一种缓慢进展型疾病, 其经由动脉壁内胆固醇的蓄积而表征。证明脂质在动脉粥样硬化病变中沉积理论的、令人瞩目的证据主要来自于血浆 LDL; 因此, LDL 已被普遍地认为是“有害的”胆固醇, 相反, HDL 血清浓度与冠心病成反比。事实上, HDL 较高的血清浓度被认为是负向的风险因素。据假设, 较高浓度的血浆 HDL 不仅保护性地对抗冠状动脉疾病, 而且实际上可以诱导动脉粥样硬化斑块的消退 (参见, 如, Badimon 等人, 1992, *Circulation* 86 (Suppl. III) :86-94; Dansky 和 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. Vase. Biol.* 15(11) :1882-88 ;Mezdour 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*(还翻译为:Zhonghua Bing LiXue Za Zhi)18(4) :257-61 ;Quezado 等人,1995, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272(2) :604-11 ;Duverger 等人,1996, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 16(12) :1424-29 ;Kopfter 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). 作为结论, HDL 已被普遍认为是“有利的”胆固醇(参见,如, Zhang, 等人,2003 *Circulation* 108 :661-663)。

[0007] HDL 的“保护性”作用在大量研究中得以证实(如, Miller 等人,1977, *Lancet* 1(8019) :965-68 ;Whayne 等人,1981, *Atherosclerosis* 39 :411-19)。在这些研究中, LDL 升高的浓度似乎与增加的心血管风险相关,而较高的 HDL 浓度好像具有心血管保护作用。体内研究已经进一步证明了 HDL 的保护作用,其显示注入兔中的 HDL 可以阻碍胆固醇诱发的动脉病变的形成(Badimon 等人,1989, *Lab. Invest.* 60 :455-61) 和 / 或可以诱导所述动脉病变消退(Badimon 等人,1990, *J. Clin. Invest.* 85 :1234-41)。

### [0008] 3.1 胆固醇逆转运、HDL 和载脂蛋白 A-I

[0009] 胆固醇逆转运(RCT) 通路起消除来自肝外大部分组织的胆固醇的作用并且对于维持机体内大部分细胞的结构和功能至关重要。RCT 主要由以下三个步骤组成:(a) 胆固醇外流,即,胆固醇最初由不同的外周细胞池的去除;(b) 胆固醇酯化,其经由卵磷脂:胆固醇酰基转移酶(LCAT) 的作用而防止外流的胆固醇再次进入细胞中;以及(c) 将 HDL 胆固醇和胆固醇酯摄取至肝细胞进行水解,然后进行再循环、贮存、在胆汁中分泌或代谢成胆酸。

[0010] LCAT(RCT 中的关键酶) 由肝产生并在与 HDL 成分缔合的血浆中进行循环。LCAT 将源自细胞的胆固醇转化为胆固醇酯,所述胆固醇酯在指定去除的 HDL 中被隔离(参见 Jonas 2000, *Biochim. Biophys. Acta*1529(1-3) :245-56)。胆固醇酯转移蛋白(CETP) 与磷脂转移蛋白(PLTP) 致力于循环的 HDL 群的进一步改造。CETP 将 LCAT 生成的胆固醇酯运至其他的脂蛋白,特别是包括 ApoB 的脂蛋白,如 VLDL 和 LDL。PLTP 向 HDL 供应卵磷脂。HDL 甘油三酯通过细胞外的肝甘油三酯脂肪酶进行代谢,并且脂蛋白胆固醇在肝中经由几种机制而除去。

[0011] HDL 颗粒的功能特征主要通过它们的主要载脂蛋白组分,如 ApoA-I 和 ApoA-II 而确定。还观察到与 HDL 缔合的微量 ApoC-I、ApoC-II、ApoC-III、ApoD、ApoA-IV、ApoE、ApoJ。HDL 根据 RCT 代谢级联或通路过程的重构状态而以多种不同的尺寸以及上述成分的不同混合物存在。

[0012] 每个 HDL 颗粒通常包括至少 1 个分子的,并且通常包括 2 至 4 个分子的 ApoA-I。如 Prof. Gerd Assmann 所描述的, HDL 颗粒也可以只包括 ApoE ( $\gamma$ -LpE 颗粒), 其还被认为负责胆固醇外流(参见,如, von Eckardstein 等人,1994, *Curr Opin Lipidol.* 5(6) :404-16)。ApoA-I 作为前原载脂蛋白 A-I(preproapolipoprotein A-I) 由肝和小肠合成,并作为原

载脂蛋白 A-I (proapolipoprotein A-I) (proApoA-I) 分泌且快速地发生裂解从而产生血浆形式的 ApoA-I——一种 243 个氨基酸的多肽链 (Brewer 等人, 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 :623-30)。在实验中直接注射入血流的前原 ApoA-I 也可以裂解为血浆形式的 ApoA-I (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)。

[0013] ApoA-I 包括 6 至 8 个不同的 22-氨基酸  $\alpha$ -单环或者包括经常为脯氨酸连接体部分间隔开的功能性重复。该重复单元以两亲的螺旋形构型存在 (Segrest 等人, 1974, *FEBS Lett.* 38 :247-53) 并具有 ApoA-I 的主要生物学活性, 即具有脂质结合和卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 活性。

[0014] ApoA-I 与脂质形成以下三种类型的稳定络合物: 称为前- $\beta$ -1 HDL 的、不含脂质的小络合物; 称为前- $\beta$ -2 HDL 的、包括极性脂质 (磷脂和胆固醇) 的平盘状颗粒; 以及称为球状或成熟 HDL (HDL<sub>3</sub> 和 HDL<sub>2</sub>) 的、包括极性和非极性脂质的球状颗粒。循环群中的大部分 HDL 包括 ApoA-I 和 ApoA-II (“AI/AII-HDL 成分”)。然而, 只包括 ApoA-I 的 HDL 成分 (“AI-HDL 成分”) 在 RCT 中表现更有效。一些流行病学研究证明了 Apo-AI-HDL 成分抗动脉粥样硬化的假设 (Parra 等人, 1992, *Arterioscler. Thromb.* 12 :701-07; Decossin 等人, 1997, *Eur. J. Clin. Invest.* 27 :299-307)。

[0015] HDL 由几种具有不同尺寸、不同脂质组成和载脂蛋白组成的颗粒群制成。可以根据它们的性能而进行分离, 所述性能包括其水合密度、载脂蛋白组成和荷电性能。例如, 前- $\beta$ -HDL 的特征为具有比成熟  $\alpha$ -HDL 更少的表面电荷。由于这种电荷差异, 而使得前- $\beta$ -HDL 和成熟  $\alpha$ -HDL 在琼脂糖凝胶中具有不同的电泳迁移率 (David 等人, 1994, *J. Biol. Chem.* 269(12) :8959-8965)。

[0016] 前- $\beta$ -HDL 与成熟  $\alpha$ -HDL 的代谢也不同。前- $\beta$ -HDL 具有以下两种代谢归宿: 由血浆除去以及通过肾代谢或者是重构成优先通过肝降解的中等尺寸 HDL (Lee 等人, 2004, *J. Lipid Res.* 45(4) :716-728)。

[0017] 尽管由细胞表面转移胆固醇的机制 (即, 胆固醇外流) 是未知的, 但是仍认为不含脂质的络合物、前- $\beta$ -1 HDL 是 RCT 中涉及的外周组织所转移的胆固醇的优选受体 (参见 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; 以及 Kawano 等人, 1993, *Biochemistry* 32 :5025-28; Kawano 等人, 1997, *Biochemistry* 36 :9816-25)。在胆固醇由细胞表面募集的这种过程中, 前- $\beta$ -1 HDL 快速地转化为前- $\beta$ -2 HDL。PLTP 可以增加前- $\beta$ -2 HDL 盘 (disc) 形成的速率, 但缺少表明 PLTP 在 RCT 中的作用的数据。LCAT 优先与盘状的小 (前- $\beta$ ) HDL 和球状的 (即成熟) HDL 反应, 而将卵磷脂或其他磷脂的 2-酰基转移至胆固醇的游离羟基残基以形成胆固醇酯 (保留在 HDL 中) 和溶血卵磷脂。LCAT 反应需要 ApoA-I 作为活化剂; 即, ApoA-I 是 LCAT 的天然辅因子。HDL 中隔离的胆固醇至其酯的转化防止了胆固醇重新进入细胞中, 且净结果为胆固醇由细胞除去。

[0018] ApoAI-HDL 成分 (即, 包括 ApoA-I 而无 ApoA-II) 中成熟 HDL 颗粒中的胆固醇酯经由肝除去并比源自包括 ApoA-I 和 ApoA-II 的 HDL (AI/AII-HDL 成分) 的那些更有效地加工入胆汁中。这可部分地归因于 ApoAI-HDL 至肝细胞膜的更有效的结合。已经假定存在 HDL 受体, 并且已将 B 类 I 型清除剂受体 (SR-BI) 鉴别为 HDL 受体 (Acton 等人, 1996, *Science*

271 :518-20 ;Xu 等人,1997,Lipid Res. 38 :1289-98)。SR-BI 在生成类固醇的组织(如,肾上腺)及肝中大量表达(Landschulz 等人,1996, J. Clin. Invest. 98 :984-95 ;Rigotti 等人,1996, J. Biol. Chem. 271 :33545-49)。对于 HDL 受体的综述,参见 Broutin 等人的 1988, Anal. Biol. Chem. 46 :16-23。

[0019] 最初经由 ATP- 结合盒转运子 AI 的脂化对于血浆 HDL 的形成以及对于前- $\beta$ -HDL 颗粒的胆固醇外流能力而言是至关重要的(Lee 和 Parks,2005, Curr. Opin. Lipidol. 16(1) :19-25)。根据这些作者,这种最初的脂化使得前- $\beta$ -HDL 更有效地起胆固醇受体的作用并且防止了 ApoA-I 与预存在的血浆 HDL 颗粒快速缔合,从而得到前- $\beta$ -HDL 颗粒更强的胆固醇外流能力。

[0020] CETP 还可在 RCT 中起重要作用。CETP 活性或其受体 VLDL 和 LDL 的变化在 HDL 群的“重构”中起重要作用。例如,在 CETP 不存在下, HDL 变成不可清除的大颗粒。(对于 RCT 和 HDL 的综述,参见 Fielding 和 Fielding,1995, J. Lipid Res. 36 :211-28 ;Barrans 等人,1996, Biochem. Biophys. Acta 1300 :73-85 ;Hirano 等人,1997, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 17(6) :1053-59)。

[0021] HDL 也可在其他脂质和非极性分子的逆转运以及解毒作用中起重要作用,即将脂质由细胞、器官和组织转运至肝进行代谢和排泄。此类脂质包括鞘磷脂(SM)、氧化的脂质和溶血磷脂酰胆碱。例如,Robins 和 Fasulo(1997, J. Clin. Invest. 99 :380-84) 已经证明了 HDL 刺激植物甾醇经由肝转运入胆汁分泌物。

[0022] HDL 的主要组分 ApoA-I 可以与 SM 于体外缔合。当使用牛脑 SM(BBSM) 对 ApoA-I 进行体外重构(reconstituted)时,在临近 BBSM 相变温度的温度 28°C 下产生最大的重构率(Swaney,1983, J. Biol. Chem. 258(2), 1254-59)。在 BBSM : ApoA-I 比值为 7.5 : 1 或更低(wt/wt)时,形成了一种重构的均质 HDL 颗粒,每个颗粒包括三分子 ApoA-I 并且具有 360 : 1 的 BBSM : ApoA-I 摩尔比。该 HDL 颗粒在电子显微镜下为盘状的络合物,其类似于通过在磷脂/蛋白质升高的比值下将 ApoA-I 与磷脂酰胆碱进行重组而获得的络合物。然而, BBSM : ApoA-I 比值为 15 : 1(wt/wt)时,形成了具有较高磷脂:蛋白质摩尔比(535 : 1)的、较大直径的盘状络合物。这些络合物与使用磷脂酰胆碱形成的 ApoA-I 络合物相比,明显更大、更稳定并且对于变性更具抵抗力。

[0023] 初期胆固醇受体(前- $\beta$ -HDL 以及包括 ApoE 的  $\gamma$ -迁移脂蛋白)中鞘磷脂(SM)的增多表明 SM 可以增强这些颗粒促进胆固醇外流的能力(Dass 和 Lessup,2000, J. Pharm. Pharmacol. 52 :731-61 ;Huang 等人,1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :1834-38 ;Fielding 和 Fielding 1995, J. Lipid Res. 36 :211-28)。

[0024] 3.2 HDL 和 ApoA-I 的保护机制

[0025] 近来对于 HDL 保护机制的研究焦点在于载脂蛋白 A-I(ApoA-I)——HDL 的主要组分。较高血浆浓度的 ApoA-I 与冠状病变的缺失或减少有关(Maciejko 等人,1983, N. Engl. J. Med. 309 :385-89 ;Sedlis 等人,1986, 发行 73 :978-84)。

[0026] 在实验动物中注入 ApoA-I 或 HDL 可产生显著的生物化学变化,以致于降低了动脉粥样硬化病变的程度及严重性。在 Maciejko 和 Mao(1982, Arteriosclerosis 2 :407a)、Badimon 等人(1989, Lab. Invest. 60 :455-61 ;1989, J. Clin. Invest. 85 :1234-41) 的最初报告之后,发现通过注入 HDL( $d = 1.063-1.325\text{g/ml}$ )可显著地降低喂食胆固醇的兔中动脉

粥样硬化病变的程度（降低 45%）以及降低其胆固醇酯含量（降低 58.5%）。他们还发现注入 HDL 可使确定的病变出现接近 50% 的消退。Esper 等人 (1987, *Arteriosclerosis* 7: 523a) 已经证明注入 HDL 可以显著地改变患有遗传性高胆固醇血症的、Watanabe 兔的血浆脂蛋白组成, 所述遗传性高胆固醇血症可发展成早期的动脉病变。在这些兔中, 注入 HDL 可使保护性 HDL 与导致动脉粥样硬化的 LDL 之间的比值超过两倍。

[0027] 通过 ApoA-I 在体外发挥溶纤维蛋白活性的观察结果进一步了解了 HDL 在动物模型中预防动脉疾病的潜力 (Saku 等人, 1985, *Thromb. Res.* 39:1-8)。Ronneberger (1987, *Xth Int. Congr. Pharmacol*, 悉尼, 1990) 证明 ApoA-I 可以增加 Beagle 犬与 Cynomolgus 猴的血纤蛋白溶解。发现在体外的人血浆中具有类似的活性。Ronneberger 能够证实 ApoA-I 治疗的动物中, 脂质沉积和动脉斑块形成的减少。

[0028] 体外研究表明 ApoA-I 与卵磷脂的络合物可以促进游离的胆固醇由培养的动脉平滑肌细胞外流 (Stein 等人, 1975, *Biochem. Biophys. Acta*, 380:106-18)。HDL 通过这种机制还可以减少这些细胞的增殖 (Yoshida 等人, 1984, *Exp. Mol. Pathol.* 41:258-66)。

[0029] 也已证明使用包括 ApoA-I 或 ApoA-II 模拟肽的 HDL 灌注疗法通过 ABC1 转运子而调节血浆 HDL 浓度, 从而产生了治疗心血管疾病的效力 (参见, 如, Brewer 等人, 2004, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1755-1760)。

[0030] 已经分离出 ApoA-I 的两种天然形成的人突变体, 其中精氨酸残基变异为半胱氨酸。在载脂蛋白 A-I<sub>米</sub> (ApoA-I<sub>M</sub>) 中, 这种取代出现在残基 173, 而在载脂蛋白 A-I<sub>巴黎</sub> (ApoA-I<sub>P</sub>) 中, 这种取代出现在残基 151 (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; Klön 等人, 2000, *Biophys. J.* 79(3):1679-85)。包括 ApoA-I<sub>M</sub> 或 ApoA-I<sub>P</sub> 二硫化物连接的同源二聚体的重构 HDL 颗粒与包括野生型 ApoA-I 的重构 HDL 颗粒相比, 其清除二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC) 乳状液的能力及其促进胆固醇外流的能力相似 (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)。在两种突变体中, 杂合的个体降低了 HDL 的浓度, 但是自相矛盾地是, 其也降低了动脉粥样硬化的风险 (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)。尽管包括任一变体的重构 HDL 颗粒与包括野生型 ApoA-I 的重构 HDL 颗粒相比时具有降低的效力, 但是其能够活化 LCAT (Calabresi 等人, 1997a, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232:345-49; Daum 等人, 1999, *J. Mol. Med.* 77:614-22)。

[0031] ApoA-I<sub>M</sub> 突变体作为常染色体显性性状遗传; 并且已经鉴别了该家族内的八代载体 (Gualandri 等人, 1984, *Am. J. Hum. Genet.* 37:1083-97)。单个 ApoA-I<sub>M</sub> 载体状态的特征为显著降低的 HDL 胆固醇浓度。尽管单个载体显著降低 HDL 胆固醇浓度, 但是其并未明显地表现出任何增加的动脉疾病风险。事实上, 通过研究系谱档案发现这些受试者受到“保护”而使其免于动脉粥样硬化 (Sirtori 等人, 2001, *Circulation*, 103:1949-1954; Roma 等人, 1993, *J. Clin. Invest.* 91(4):1445-520)。

[0032] ApoA-I<sub>M</sub> 在载体突变体中的、可能的保护作用机制似乎与 ApoA-I<sub>M</sub> 突变体的结构修



饰有关,而在该结构中,缺失了一个  $\alpha$ -螺旋并且增加了暴露的疏水性残基 (Franceschini 等人, 1985, *J. Biol. Chem.* 260 :1632-35)。多个  $\alpha$ -螺旋紧密结构的缺失使该分子的柔韧性增加,而所述分子与常规的 ApoA-I 相比,更易于与脂质缔合。此外,载脂蛋白-脂质络合物对变更更敏感,从而表明在突变体中,也可以改善脂质的递送。

[0033] Bielicki 等人 (1997, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 17 (9) :1637-43) 已经证明 ApoA-I<sub>M</sub> 与野生型 ApoA-I 相比,具有募集膜胆固醇的有限能力。此外,由 ApoA-I<sub>M</sub> 与膜脂质缔合而形成的初生 HDL 主要是 7.4nm 的颗粒而不是由野生型 ApoA-I 形成的、较大的 9- 和 11-nm 的络合物。这些观察结果表明在 ApoA-I 基本序列中 Arg<sub>173</sub> → Cys<sub>173</sub> 的取代干扰了细胞胆固醇募集和初生 HDL 集结的正常过程。该突变明显与胆固醇由细胞除去的、降低的效力有关。因此,其导致动脉粥样硬化的性质可能与 RCT 无关。

[0034] 归因于 Arg<sub>173</sub> → Cys<sub>173</sub> 取代的、最显著的结构变化是 ApoA-I<sub>M</sub> 的二聚作用 (Bielicki 等人, 1997, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 17 (9) :1637-43)。ApoA-I<sub>M</sub> 可以与自身形成同源二聚体而与 ApoA-II 形成异源二聚体。对于包括载脂蛋白混合物的血液成分的研究表明,循环中二聚体和络合物的存在是造成载脂蛋白消除半衰期延长的原因。已在载体突变体的临床研究中观察到此类消除半衰期的延长 (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<sub>M</sub> 二聚体 (ApoA-I<sub>M</sub>/ApoA-I<sub>M</sub>) 可在体外的 HDL 颗粒互变中起抑制因子的作用 (Franceschini 等人, 1990, *J. Biol. Chem.* 265 :12224-31)。

[0035] 3.3 目前用于血脂异常及相关失调的治疗

[0036] 脂质代谢紊乱是与升高的血清胆固醇和甘油三酯浓度以及较低的血清 HDL : LDL 比值相关的疾病,并且其包括高脂血症 (特别是高胆固醇血症)、冠心病、冠状动脉疾病、血管和血管周围疾病、以及诸如动脉粥样硬化的心血管疾病。也可以包括与动脉粥样硬化相关的综合征,比如由动脉机能不全引起的间歇性跛行。目前具有大量可用于降低与脂质代谢紊乱相关的、高血清胆固醇和甘油三酯的治疗。但是,鉴于疗效、副作用和患病人群,而使得每种治疗具有各自的缺点和不足。

[0037] 胆汁酸结合树脂是一类中断胆汁酸由肠至肝的再循环的药物,如消胆胺 (Questran Light<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb) 和盐酸考来替泊 (Colestid<sup>®</sup>, Upjohn 公司)。当口服时,这些带正电荷的树脂在肠中与带负电荷的胆汁酸结合。由于所述树脂不能由肠吸收,因此它们携带着胆汁酸一起排出。但是,此类树脂的使用充其量只能将血清胆固醇浓度降低约 20%,而且其与以下的胃肠副作用有关——包括便秘和一些维生素缺乏症。此外,由于所述树脂也可以结合其他的药物,因而必须在所述树脂摄入前至少一个小时或者摄入之后四至六小时才能服用其他的口服药物,从而使得心脏病患者的用药方案复杂化。

[0038] 抑制素 (statins) 是降胆固醇药物,其通过抑制胆固醇生物合成通路中所涉及的关键——HMGCoA 还原酶而阻断胆固醇的合成。抑制素有时可结合胆汁酸结合树脂使用,所述抑制素的例子如洛伐他汀 (Mevacor<sup>®</sup>)、辛伐他汀 (Zocor<sup>®</sup>)、普伐他汀 (Pravachol<sup>®</sup>)、氟伐他汀 (Lescol<sup>®</sup>) 和阿伐他汀 (Lipitor<sup>®</sup>)。抑制素显著降低血清胆固醇和血清 LDL 的浓度,并且延缓冠状动脉粥样硬化的进程。然而,血清 HDL 胆固醇的浓度仅中等地增

加。LDL 作用减弱的机制可能涉及 VLDL 浓度的降低以及 LDL 受体细胞表达的诱导,而其造成了产量减少和 / 或 LDL 代谢增强。包括肝和肾功能障碍的副作用与这些药物的使用有关 (Physicians Desk Reference, 第 56 版, 2002) Medical Economics)。

[0039] 烟酸 (尼克酸) 是一种水溶性的维生素 B- 络合物, 其作为食物添加物和抗高血脂药使用。烟酸减少了 VLDL 的形成并且在降低 LDL 方面是有效的。在一些情况中, 烟酸与胆汁酸结合树脂结合使用。当烟酸以足够的剂量使用时, 可以增加 HDL, 但是当以这样高的剂量使用时, 其有效性受到严重副作用的限制。Niaspan<sup>®</sup> 是一种延长释放的烟酸形式, 其与纯烟酸相比产生更少的副作用。烟酸 / 洛伐他汀 (Nicostatin<sup>®</sup>) 是一种含有烟酸和洛伐他汀的制剂, 其联合了每种药物的益处。

[0040] 贝特类药物 (Fibrates) 是一类降脂质药物, 其用于治疗各种形式的高脂血症 (即, 血清甘油三酯升高), 所述高脂血症也可以与高胆固醇血症有关。贝特类药物似乎减少了 VLDL 成分并且适当地增加了 HDL, 但是, 这些药物对于血清胆固醇的作用却是可变的。在美国, 贝特类药物如氯贝丁酯 (Atromid-S<sup>®</sup>)、非诺贝特 (Tricor<sup>®</sup>) 和苯扎贝特 (Bezalip<sup>®</sup>) 已被批准作为降血脂药使用, 但仍未获得批准用作高胆固醇血症药物。例如, 氯贝丁酯是一种降血脂药, 其 (经由未知的机制) 通过减少 VLDL 成分而起降低血清甘油三酯的作用。尽管在某些患者亚群中可以降低血清胆固醇, 但是其对于药物的生物化学反应是可变的, 并且不可能总是预知哪名患者将获得有利的结果。Atromid-S<sup>®</sup> 未表现出预防冠心病的疗效。化学和药理学相关的药物吉非贝齐 (Lopid<sup>®</sup>) 是一种脂质调节剂, 其中等地降低血清甘油三酯和 VLDL 胆固醇, 并中等增加 HDL 胆固醇——HDL<sub>2</sub> 和 HDL<sub>3</sub> 亚成分以及 ApoA-I 和 A-II (即, AI/AMT-HDL 成分)。但是, 该脂质应答是不均匀的 (heterogeneous), 特别是在不同的患者群体中。此外, 尽管在无冠心病史或存在冠心病症状的、40-55 岁之间的男性患者中观察到了冠心病的预防作用, 但是却不能将这些结果明确地外推至其他患者群体 (如, 妇女、老年人和较年轻的男性)。事实上, 在患有确定的冠心病的患者中并未观察到疗效。严重的副作用与贝特类药物的使用有关, 而所述副作用包括毒性作用, 如恶性肿瘤 (特别是胃肠癌)、胆囊疾病以及非冠状死亡发生几率的增加。

[0041] 认为口服雌激素补偿疗法可以用于减轻绝经后妇女的高胆固醇血症。然而, HDL 的增加可能伴有甘油三酯的升高。当然, 雌激素治疗受限于具体的患者群体 (绝经后妇女) 并且与严重的副作用有关, 而所述副作用包括诱发恶性肿瘤、胆囊疾病、血栓栓塞性疾病、肝腺瘤、血压升高、葡萄糖耐受不良以及高钙血症。

[0042] 其他可用于治疗高脂血症的药物包括依泽替米贝 (Zetia<sup>®</sup>; Merck), 其阻断或抑制胆固醇的吸收。但是, 依泽替米贝的抑制剂已显示出某种毒性。

[0043] 因此, 存在对安全药物的需求, 该药物能够更有效地降低血清胆固醇、增加 HDL 血清浓度、预防和 / 或治疗血脂异常和 / 或与血脂异常相关的疾病、病症和 / 或失调。

[0044] 例如, HDL 以及与磷脂络合的、重组形式的 ApoA-I 可以起用于以下非极性或两亲性分子的吸收剂 / 清除剂的作用, 所述非极性或两亲性分子如胆固醇及衍生物 (氧甾醇、氧化的甾醇、植物甾醇等)、胆固醇酯、磷脂及衍生物 (氧化的磷脂)、甘油三酯、氧化产物和酯

多糖 (LPS) (参见, 如, Casas 等人, 1995, *J. Surg. Res. Nov* 59(5) :544-52)。HDL 还可以起 TNF- $\alpha$  及其他淋巴因子的清除剂的作用。HDL 还可以起人血清对氧磷酶的载体的作用, 所述人血清对氧磷酶如 PON-1、-2、-3。对氧磷酶是一种与 HDL 缔合的酯酶, 其对于保护细胞组分对抗氧化是重要的。LDL 的氧化在氧化应激过程中产生, 其似乎与动脉粥样硬化的形成有直接关联 (Aviram, 2000, *Free Radic. Res.* 33 Suppl :S85-97)。对氧磷酶似乎在动脉粥样硬化和心血管疾病的易受性方面起重要作用 (Aviram, 1999, *MoI. Med. Today* 5(9) :381-86)。人血清对氧磷酶 (PON-1) 与高密度脂蛋白 (HDL) 结合。其活性与动脉粥样硬化呈负相关。PON-1 水解有机磷酸酯并且可以通过抑制 HDL 和低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化而保护免受动脉粥样硬化 (Aviram, 1999, *MoI. Med. Today* 5(9) :381-86)。实验研究表明这种保护作用与 PON-1 水解氧化的脂蛋白中的特异性脂质过氧化物的能力有关。保持或促进 PON-1 活性的干预可有助于延缓动脉粥样硬化与冠心病的发作。

[0045] HDL 进一步具有抗血栓药和纤维蛋白原还原剂的作用以及作为失血性休克药物的作用 (Cockerill 等人, WO 01/13939, 2001 年 3 月 1 日公布)。HDL, 特别是 ApoA-I, 其已被证明使败血症产生的酯多糖顺利地交换为包括 ApoA-I 的脂质颗粒, 从而功能性的中和了所述酯多糖 (Wright 等人, WO 9534289, 1995 年 12 月 21 日公布; Wright 等人, 1999 年 7 月 27 日发行的美国专利第 5, 928, 624 号; Wright 等人, 1999 年 8 月 3 日发行的美国专利第 5, 932, 536 号)。

[0046] 然而, 由于治疗施用需要大量的载脂蛋白以及由于蛋白质生产昂贵的成本、对于较低的生产总收率的考虑, 使得目前 ApoA-I、ApoA-I<sub>M</sub>、ApoA-I<sub>P</sub> 及其他变体、以及重构 HDL 的治疗使用受到了限制。早期的临床试验已经表明用于治疗心血管疾病的剂量范围为每次输注 1.5-4g 之间的蛋白质。完全治疗所需的输注次数是未知的。(参见, 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. Vase. Biol.* 20(9) :2148-55; Nanjee 等人, 1999, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 19(4) :979-89; Nanjee 等人, 1996, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 16(9) :1203-14)。因此, 需要开发用于治疗和 / 或预防脂质代谢疾病、病症和 / 或紊乱的新方法。

[0047] 不应将本申请第 2 部分或任何其他部分中的任何参考文献的引证或标识解释为同意此类参考文献是作为本发明的现有技术而提供。

#### 4. 发明内容

[0048] 本公开提供了荷电的脂蛋白络合物、包括该络合物的组合物以及使用该络合物治疗和 / 或预防多种失调和病症的方法, 所述失调和病症包括血脂异常和 / 或与其相关的各种疾病、失调和 / 或病症。该络合物一般为脂蛋白, 其包括两种成分 (载脂蛋白成分和脂质成分), 并且包括作为关键成分的、特定量的荷电磷脂 (或两种或多种不同的、通常类似荷电的磷脂混合物)。该荷电磷脂在生理 pH 下可具有正电荷或负电荷, 但是在多种实施方案中为负电荷, 在一些实施方案中, 该荷电的磷脂包括一种或多种磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油和 / 或磷脂酸。

[0049] 所述载脂蛋白成分包括一种或多种蛋白质、肽或肽类似物, 所述蛋白质、肽或肽类似物能够使包括在络合物中的胆固醇流动 (称为“载脂蛋白”)。这样的载脂蛋白的具体实

例是 ApoA-I。其他的具体实例在下文作进一步描述。

[0050] 所述脂质成分通常包括一种或多种中性的磷脂和荷电的磷脂,并且可以任选的包括其他的脂质,例子如甘油三酯、胆固醇、胆固醇酯、溶血磷脂及其各种类似物和 / 或衍生物。在一些实施方案中,荷电的脂蛋白络合物不包括此类任选的脂质。

[0051] 中性的磷脂可以是在生理 pH 下具有净电荷约为零的任何磷脂。在一些实施方案中,所述中性的磷脂是在生理 pH 下具有净电荷约为零的两性离子。在一些实施方案中,所述中性的磷脂包括卵磷脂(也称为磷脂酰胆碱或“PC”)。在一些实施方案中,所述中性的磷脂包括鞘磷脂(“SM”)。在一些实施方案中,所述中性的磷脂包括卵磷脂与 SM 的混合物。在荷电的脂蛋白络合物的多个实施方案中,脂质成分包括卵磷脂或 SM、至少一种荷电的磷脂、以及其他任选的脂质的,所述脂蛋白络合物被称为“三元”络合物,原因是它们包括以下三种“主要”的组分:载脂蛋白、卵磷脂或鞘磷脂、以及荷电的磷脂。在荷电的脂蛋白络合物的多个实施方案中,脂质成分包括卵磷脂和 SM、至少一种荷电的磷脂、以及其他任选的脂质的,所述脂蛋白络合物被称为“四元”络合物。

[0052] 该荷电脂蛋白络合物的、包括脂质成分的荷电磷脂的总量可以改变,但是其范围通常为约 0.2 至 10wt%。在一些实施方案中,所述脂质成分包括约为总量 0.2 至 2wt%、0.2 至 3wt%、0.2 至 4wt%、0.2 至 5wt%、0.2 至 6wt%、0.2 至 7wt%、0.2 至 8wt% 或 0.2 至 9wt% 的荷电磷脂。在一些实施方案中,所述脂质成分包括约为总量 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 或 3.0wt% 的荷电磷脂,和 / 或包括任何将这些值作为端点的范围。在一些实施方案中,所述脂质成分包括约为总量 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 或 3.0wt% 的荷电磷脂,一直到约为总量 4、5、6、7、8、9 或 10wt% 的荷电磷脂。

[0053] 包括脂质成分的中性磷脂的总量也可以改变,并且其取决于所包括的荷电磷脂与任何任选脂质的量。在不包括任选脂质的实施方案中,所述脂质成分通常将包括约为总量 90 至 99.8wt% 的中性磷脂。

[0054] 如上所述,该中性磷脂可以包括卵磷脂、SM 或卵磷脂与 SM 的混合物。卵磷脂和 / 或 SM 可以包括该中性磷脂的块(bulk),或者可选地,除卵磷脂和 / 或 SM 之外,该中性磷脂还可以包括中性磷脂。在中性磷脂包括卵磷脂而不包括 SM 的实施方案中,该中性磷脂通常包括约 5 至 100wt% 的卵磷脂。在一些实施方案中,该中性磷脂包括 100wt% 的卵磷脂。

[0055] 在中性磷脂包括 SM 而不包括卵磷脂的实施方案中,该中性磷脂通常包括约 5 至 100wt% 的 SM。在一些实施方案中,该中性磷脂包括 100wt% 的 SM。

[0056] 在中性磷脂包括卵磷脂与 SM 的混合物的实施方案中,包括全部中性磷脂的混合物的量以及该混合物包括的卵磷脂与 SM 的相对量(即,卵磷脂:SM 的摩尔比)可以改变。通常,该中性磷脂将包括约 5 至 100wt% 的卵磷脂 / SM 混合物。在一些实施方案中,该中性磷脂所包括的全部为卵磷脂与 SM(即,卵磷脂与 SM 的 100wt% 混合物)。

[0057] 卵磷脂与 SM 的摩尔比(卵磷脂:SM)可以改变,但其范围通常为约 20:1 至 1:20。在一些实施方案中,卵磷脂:SM 的摩尔比范围为约 10:3 至 10:6。在其他实施方案中,卵磷脂:SM 的摩尔比范围为约 1:20 至 3:10。

[0058] 如果包括任选的脂质,其通常包括约 50wt% 或更少的脂质成分。在一些实施方案

中,该脂质成分包括低于总量约 30wt% 的任选脂质。在特定的实施方案中,所述脂质成分包括低于总量约 5wt%、10wt% 或 20wt% 的任选脂质。

[0059] 所述荷电脂蛋白络合物中脂质与载脂蛋白的摩尔比也可以改变。在一些实施方案中,所述荷电脂蛋白络合物包括脂质:载脂蛋白的摩尔比范围为约 2:1 至约 200:1。在一些实施方案中,脂质:载脂蛋白的摩尔比为约 50:1。

[0060] 此处描述的荷电脂蛋白络合物可以采用多种形状、尺寸和形式,其范围可以从胶束结构至类似于天然形成的前- $\beta$  HDL 颗粒的小盘状颗粒,至类似于天然形成的  $\alpha$ -HDL 颗粒的较大的盘状颗粒,至类似于天然形成的 HDL<sub>2</sub> 或 HDL<sub>3</sub> 的大球形颗粒。如本领域已知的,可以通过调节包括脂质成分的脂质的组成与重量(或摩尔)比、以及调节脂质:载脂蛋白的摩尔比而控制此处描述的荷电脂蛋白络合物的期望尺寸和形状(参见,如,Barter 等人,1996, J. Biol. Chem. 271:4243-4250)。

[0061] 在一些实施方案中,所述荷电的脂蛋白络合物为盘状颗粒形式,其中所述脂质成分基本上由约为总量 90 至 99.8wt% 的全中性磷脂与约为总量 0.2 至 10wt% 的全负电荷磷脂组成。该盘状颗粒可以大(如,具有约 10 至 14nm 的扁圆径)或小(如,具有约 5 至 10nm 的扁圆径)。如本领域已知的,可以通过调节脂质:载脂蛋白的摩尔比而控制该盘状颗粒的尺寸(参见,如,Barter 等人,1996, 见上)。例如,可以使用尺寸排阻柱色谱法(size exclusion column chromatography)来测定颗粒的尺寸。

[0062] 药物组合物通常包括如此处所描述的荷电脂蛋白络合物,并且可以任选地包括一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂和/或稀释剂。在一些实施方案中,将该药物组合物包装成适于施用的单位剂量。例如,在一些实施方案中,将包括单位剂量干燥的(例如冻干)荷电脂蛋白络合物的组合物包装于密封瓶中。此类组合物适合用水、生理溶液(比如盐水)或缓冲液重构,并经由注射施用。此类组合物可以任选地包括一种或多种促进该荷电络合物重构的抗粘剂剂和/或抗凝剂,或者包括一种或多种经设计用以调节重构的混悬液的 pH、渗透压和/或盐度的缓冲剂、糖或盐(如氯化钠)。

[0063] 预期此处描述的荷电脂蛋白络合物和组合物可影响和/或促进胆固醇外流和/或消除胆固醇,并由此预期所述络合物和组合物可用于治疗和/或预防多种病症和失调,例子包括血脂异常和/或与血脂异常相关的或者与脂质消耗、聚集或排除(如,脂肪沉着、细胞降解)/或非极性分子(比如毒素、外援物等)相关的疾病、病症和/或失调。可以使用此处描述的荷电脂蛋白络合物和组合物进行治疗或预防的此类疾病、失调和/或相关的病症的非限制性实例包括外周血管病、高血压、炎症、阿尔茨海默病、再狭窄、动脉粥样硬化以及动脉粥样硬化的多种临床表现,例子如休克、失血性休克、短暂性脑缺血发作、心肌梗死、急性冠状动脉综合征、心绞痛、肾血管性高血压、肾血管机能不全、间歇性跛行、严重的肢体缺血、静止痛和坏疽。

[0064] 该方法通常包括向受试者施用足以治疗或预防特定适应症的、有效量的此处描述的荷电脂蛋白络合物或药物络合物(composition)。该络合物和/或组合物可以单独施用(作为单一疗法),或者可选地,它们可以配合其他的治疗剂一起施用,该治疗剂可用于治疗和/或预防血脂异常和/或与血脂异常相关的病症、疾病和/或失调。可以与此处描述的荷电脂蛋白络合物和组合物配合施用的治疗剂的非限制性实例包括胆汁酸结合树脂、HMG CoA 还原酶抑制剂(抑制素)、烟酸、树脂、胆固醇吸收抑制剂和贝特类药物。

[0065] 尽管不预期受到任何操作的理论束缚,但仍认为包括脂质成分的荷电磷脂使得此处描述的荷电脂蛋白络合物和组合物具有优于常规脂蛋白络合物的、改善的治疗性能。小的盘状前- $\beta$  HDL 与大的盘状和 / 或球形 HDL 之间的一个关键区别在于颗粒的电荷,其中所述小的盘状前- $\beta$  HDL 在肾中降解,而所述大的盘状和 / 或球形 HDL 被肝识别,在肝中进行胆固醇的贮存、再循环、代谢(作为胆汁酸)或消除(在胆汁中)。所述小的盘状前- $\beta$  HDL 与具有负电荷的所述大的盘状和 / 或球形 HDL 相比,具有更少的表面负电荷。尽管不预期受到任何操作的理论束缚,但仍认为较多的负电荷是触发肝识别颗粒的因素之一,并且由此避免了经由肾代谢所述颗粒。此处描述的荷电脂蛋白络合物和组合物比常规的脂蛋白络合物在循环中停留更长时间的看法可部分归因于荷电磷脂的存在,或者该电荷可以电荷依赖的方式影响所述脂蛋白的半衰期。期望脂蛋白较长的循环(滞留)时间有利于胆固醇流动(使该络合物具有更多的时间以蓄积胆固醇)和酯化(为 LCAT 提供更多的时间以催化酯化反应)。该电荷还可提高捕获和 / 或除去胆固醇的几率,从而促使大量的除去胆固醇。因而,期望此处描述的荷电脂蛋白络合物和组合物能够提供优于常规脂蛋白治疗的治疗益处,而却只需施用更少的络合物和 / 或组合物,以及施用更少的次数。

[0066] 5. 附图简述

[0067] 图 1 提供了由原 Apo-AI (33wt%) 和鞘磷脂 (67wt%) 组成的、未荷电脂蛋白络合物的色谱图;

[0068] 图 2 提供了由原 Apo-AI (33wt%)、鞘磷脂 (65wt%) 和磷脂酰甘油 (2wt%) 组成的荷电脂蛋白络合物实施方案的色谱图;

[0069] 图 3 提供了继施用对照、未荷电的脂蛋白络合物(曲线标记为 IIA) 或如此处所描述的荷电脂蛋白络合物实施方案(曲线标记为 IIB) 之后,兔的 HDL 中作为时间函数测量的游离胆固醇总量的曲线图;以及

[0070] 图 4 提供了继施用对照、未荷电的脂蛋白络合物(组 IIA, 两只动物) 或如此处所描述的荷电脂蛋白络合物实施方案(组 IIB, 两只动物) 之后,兔的 HDL 中作为时间函数测量的游离胆固醇平均量的曲线图。

## 6. 具体实施方式

[0071] 除了其他事物之外,本公开提供了荷电的脂蛋白络合物及组合物,其可用于治疗和 / 或预防血脂异常和 / 或与血脂异常相关的疾病、失调和 / 或病症。如发明内容部分所讨论的,该荷电的脂蛋白络合物包括两种主要的成分——载脂蛋白成分和脂质成分,并且包括作为关键成分的、特定量的一种或多种荷电磷脂。

[0072] 该荷电的脂蛋白络合物可以由天然来源分离,比如由人血清分离(此处称为“分离的荷电脂蛋白络合物”),或者所述荷电的脂蛋白络合物可以由其单独组分制备或重构(此处称为“重构的荷电脂蛋白络合物”)。与本领域技术人员所理解的一样,由于可以选择性地控制重构的荷电脂蛋白络合物各种组分的特性与数量,因而该重构的荷电脂蛋白络合物在多种应用中是有利的。

[0073] 6.1 载脂蛋白与载脂蛋白肽

[0074] 荷电的脂蛋白络合物中包括载脂蛋白成分的载脂蛋白的性质并不是成功的关键所在。事实上,任何提供如此处所描述的治疗和 / 或预防益处的载脂蛋白和 / 或其衍生物

或类似物均可包括在该荷电的络合物中。此外,由于任何  $\alpha$  螺旋肽或肽类似物或任何其他类型的“模拟”载脂蛋白活性的分子(例子如 ApoA-I)在与脂质缔合时可活化 LCAT 或形成盘状的颗粒,因此其可包括荷电的络合物,并且由此而包括在“载脂蛋白”的定义内。适宜的载脂蛋白的实例包括但不限于前原载脂蛋白形式的 ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoA-V 和 ApoE;原形式和成熟形式的人 ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV 和 ApoE;以及活化的多晶型、异构型、变体和突变体以及截断形式,其中最常见的是 ApoA-I<sub>M</sub>(ApoA-I<sub>M</sub>) 和 ApoA-I<sub>P</sub>(ApoA-I<sub>P</sub>)。还已知载脂蛋白突变体含有半胱氨酸残基,并且也可使用(参见,如, U. S. 2003/0181372)。载脂蛋白可以是单体或二聚体形式,而所述二聚体可以为同源二聚体或异源二聚体。例如,可以使用以下的同源二聚体和异源二聚体(切实可行的):原 ApoA-I 和成熟 ApoA-I (Duverger 等人,1996, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 16(12):1424-29)、ApoA-I<sub>M</sub>(Franceschini 等人,1985, *J. Biol. Chem.* 260:1632-35)、ApoA-I<sub>P</sub>(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 和 ApoH。载脂蛋白可以包括与促进其分离的元件(比如 His 标签)或经设计用于其他目的的其他元件相应的残基,只要当该载脂蛋白包括在络合物中时能够保留某些生物活性即可。

[0075] 如本领域所公知的,此类载脂蛋白可以由动物来源进行纯化(特别是由人类来源)或者进行重组生产,参见,如, Chung 等人,1980, *J. Lipid Res.* 21(3):284-91; Cheung 等人,1987, *J. Lipid Res.* 28(8):913-29。还可参见美国专利第 5,059,528、5,128,318、6,617,134 号以及美国公布文本第 20002/0156007、2004/0067873、2004/0077541 和 2004/0266660 号。

[0076] 适合作为载脂蛋白用于此处描述的荷电络合物及组合物中的、与载脂蛋白相应的肽和肽类似物以及模拟 ApoA-I、ApoA-I<sub>M</sub>、ApoA-II、ApoA-IV 和 Apo-E 活性的激动剂的非限制性实例在以下文献中公开:美国专利第 6,004,925、6,037,323 和 6,046,166 号(授予 Dasseux 等人);美国专利第 5,840,688 号(授予 Tso);美国公布文本 2004/0266671、2004/0254120、2003/0171277 和 2003/0045460 (Fogelman 的);以及美国公布文本 2003/0087819 (Bielicki 的),通过引用将其全部公开内容并入本文。这些肽和肽类似物可以包括 L-氨基酸或 D-氨基酸或者包括 L-氨基酸与 D-氨基酸的混合物。所述肽和肽类似物还可以包括一种或多种非肽或酰胺键合,比如一种或多种公知的肽/酰胺等排物。可以使用本领域已知的任何肽合成技术来合成或制备此类“肽和/或肽模拟物”载脂蛋白,所述肽合成技术包括,如美国专利第 6,004,925、6,037,323 和 6,046,166 号中描述的技术。

[0077] 该荷电的络合物可以包括单种类型的载脂蛋白,或者包括两种或多种不同的载脂蛋白的混合物,所述两种或多种不同的载脂蛋白可以源自相同或不同的物种。尽管不需要,但是该荷电的脂蛋白络合物仍优先地包括源自受治疗动物物种的氨基酸序列的载脂蛋白或与其相应的载脂蛋白,以避免产生对治疗免疫应答的诱导作用。载脂蛋白肽模拟物的使用还可以诱导或避免产生免疫应答。

[0078] 6.2 磷脂

[0079] 荷电的络合物及组合物的脂质成分包括以下两种类型的磷脂:中性磷脂和荷电磷

脂。如此处所用,“中性磷脂”是在生理 pH 下净电荷约为零的磷脂。虽然其他类型的净电荷中性磷脂是已知并可以使用的,但是在多种实施方案中,该中性磷脂为两性离子。该中性磷脂包括卵磷脂和 / 或 SM 中的一种或两种,并且可以任选地包括其他中性磷脂。在一些实施方案中,所述中性磷脂包括卵磷脂但不包括 SM。在其他实施方案中,所述中性磷脂包括 SM 但不包括卵磷脂。在又一实施方案中,所述中性磷脂包括卵磷脂和 SM。除了卵磷脂和 / 或 SM 之外,所有这些具体示例的实施方案还可包括中性磷脂,但在多种实施方案中,并不包括此类额外的中性磷脂。

[0080] 使用的 SM 的特性并不是成功的关键所在。因此,如此处所用,“SM”的表达不仅包括源自天然来源的鞘磷脂,而且包括与天然形成的 SM 一样的、不受 LCAT 水解影响的天然形成的 SM 的类似物和衍生物。SM 是一种结构极类似于卵磷脂的磷脂,但是其与卵磷脂不一致之处在于其不具有甘油骨架,并由此而不具有结合酰基链的酯键。相反,SM 具有神经酰胺骨架,在该骨架中酰胺键与酰基链连接。SM 并不是 LCAT 的底物,并且其通常不能被 LCAT 水解。但是,SM 可以起 LCAT 抑制剂的作用或者可以通过稀释底物磷脂的浓度而降低 LCAT 的活性。由于 SM 未被水解,因此其在循环中可滞留更长的时间。预期这种特征可使包括 SM 的、荷电的脂蛋白络合物具有更长的药理作用持续时间(胆固醇的流动),并且其与不包括 SM 的载脂蛋白络合物相比,能够获取更多的脂质,尤其是胆固醇(参见,如,美国公布文本第 2004/0067873 号中描述的载脂蛋白络合物,通过引用将其全部公开内容并入本文)。这种作用可以使包括 SM 的脂蛋白络合物与不包括 SM 的脂蛋白络合物相比,治疗所需的次数更少或者剂量更低。

[0081] 事实上,SM 可以源自任何来源。例如,SM 可以由牛奶、蛋或脑获得。还可以使用 SM 类似物或衍生物。有用的 SM 类似物和衍生物的非限制性实例包括但不限于棕榈酰鞘磷脂、硬脂酰鞘磷脂、D-赤藓糖 -N-16:0-鞘磷脂及其二氢异构体、D-赤藓糖 -N-16:0-二氢-鞘磷脂。

[0082] 可以人工地使由天然来源分离的鞘磷脂富含一种特殊的饱和或不饱和酰基链。例如,牛奶鞘磷脂(Avanti 鞘磷脂,Alabaster, Ala.)的特征为具有饱和的长酰基链(即,具有 20 个或多个碳原子的酰基链)。相反,蛋鞘磷脂的特征为具有饱和的短酰基链(即,具有少于 20 个碳原子的酰基链)。例如,虽然只有大约 20%的牛奶鞘磷脂包括 C16:0(16 个碳,饱和的)酰基链,但是却有约 80%的蛋鞘磷脂包括 C16:0 酰基链。可以通过使用溶剂萃取来使牛奶鞘磷脂的组成富含与蛋鞘磷脂具可比性的酰基链组分,反之亦然。

[0083] 为使 SM 具有特定的酰基链,其可以是半合成的。例如,牛奶鞘磷脂可以首选由牛奶进行纯化,然后可以对一种特殊的酰基链,如 C16:0 酰基链进行裂解并替换为另一种酰基链。SM 还可以通过如大规模合成来进行完全合成。参见,如,Dong 等人的、1993 年 6 月 15 日发行的、题为“Synthesis of D-erythro-sphingomyelins”的美国专利第 5,220,043 号; Weis,1999, Chem. Phys. Lipids 102(1-2):3-12。

[0084] 可以选择性地改变包括半合成或合成 SM 的酰基链的长度和饱和度。所述酰基链可以是饱和或不饱和的,并且可以含有约 6 至约 24 个碳原子。每条链可以含有相同数目的碳原子,或者可选地,每条链可以含有不同数目的碳原子。在一些实施方案中,半合成或合成的 SM 包括混合的酰基链,以使其中的一条链为饱和的而另一条链为不饱和的。在具有这样混合的酰基链的 SM 中,该链的长度可以相同或不同。在其他实施方案中,半合成或合成



SM 的酰基链可均为饱和或不饱和的。此外,该链可以含有相同或不同数目的碳原子。在一些实施方案中,包括半合成或合成 SM 的这两种酰基链是相同的。在具体的实施方案中,该链与天然形成的脂肪酸的酰基链一致,所述天然形成的脂肪酸的例子如油酸、棕榈酸或硬脂酸。在另一个具体的实施方案中,这两种酰基链均为饱和的并且均含有 6 至 24 个碳原子。以下的表 1 提供了可以包括在半合成和合成 SM 中的、存在于通常形成的脂肪酸中的酰基链的非限制性实例:

长度:不饱和度数目	通用名
14:0	肉豆蔻酸
16:0	棕榈酸
18:0	硬脂酸
18:1 顺式 $\Delta^9$	油酸
18:2 顺式 $\Delta^{9,12}$	亚油酸
18:3 顺式 $\Delta^{9,12,15}$	亚麻酸
20:4 顺式 $\Delta^{5,8,11,14}$	花生四烯酸
20:5 顺式 $\Delta^{5,8,11,14,17}$	二十碳五烯酸 (一种 $\omega$ -3 脂肪酸)

[0085] 与 SM 一样,所使用的卵磷脂的特性并不是成功的关键所在。此外,还与 SM 一样的是,卵磷脂可以源自天然来源或由天然来源分离,或者其可通过合成获得。由天然来源分离的、适宜的卵磷脂的实例包括但不限于蛋磷脂酰胆碱和大豆磷脂酰胆碱。适宜的卵磷脂的其他非限制性实例包括二棕榈酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、1-肉豆蔻酰-2-棕榈酰磷脂酰胆碱、1-棕榈酰-2-肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、1-棕榈酰-2-硬脂酰磷脂酰胆碱、1-硬脂酰-2-棕榈酰磷脂酰胆碱、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱、1-油酰-2-棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱及其醚衍生物或类似物。

[0087] 与 SM 一样,由天然来源衍生或分离的卵磷脂可富含特定的酰基链。如上文与 SM 相关的讨论一样,在采用半合成或合成卵磷脂的实施方案中,可以选择性地改变酰基链的特性。在此处描述的荷电络合物的一些实施方案中,卵磷脂上的两条酰基链是相同的。在包括 SM 和卵磷脂的荷电脂蛋白络合物的一些实施方案中,SM 和卵磷脂的酰基链全部相同。在特定的实施方案中,该酰基链与肉豆蔻酸、棕榈酸、油酸或硬脂酸的酰基链一致。

[0088] 脂质成分还包括荷电的磷脂。如此处所用,“荷电的磷脂”是在生理 pH 下具有净电荷的磷脂。所述荷电的磷脂可以包括单种类型的荷电的磷脂,或者包括两种或多种不同的、通常为类似荷电的磷脂的混合物。在一些实施方案中,该荷电的磷脂为负电荷的甘油磷脂。所述荷电的磷脂的特性并不是成功的关键所在。适宜的负电荷磷脂的具体实例包括但不限于磷脂酰甘油 (phosphatidylglycerol)、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol)、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油和磷脂酸。在一些实施方案中,负电荷的磷脂包括一种或多种磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油和 / 或磷脂酸。

[0089] 与 SM 和卵磷脂一样,负电荷的磷脂可以由天然来源获得或者通过化学合成制备。如上文与 SM 相关的讨论一样,在采用合成的负电荷磷脂的实施方案中,可以选择性地改变酰基链的特性。在此处描述的荷电脂蛋白络合物的一些实施方案中,该负电荷磷脂上的两

种酰基链是相同的。在此处描述的、三元和四元荷电脂蛋白络合物的一些实施方案中, SM、卵磷脂以及负电荷磷脂上的酰基链全部相同。在特定的实施方案中, 所述荷电的磷脂和 / 或 SM 均具有 C16:0 或 C16:1 酰基链。在另一个特定的实施方案中, 所述荷电的磷脂、卵磷脂和 / 或 SM 的酰基链与棕榈酸的酰基链一致。在又一特定的实施方案中, 所述荷电的磷脂、卵磷脂和 / 或 SM 的酰基链与油酸的酰基链一致。

[0090] 包括荷电络合物的负电荷磷脂的总量可以改变。通常, 脂质成分将包括约 0.2 至 10wt% 的负电荷磷脂。在一些实施方案中, 所述脂质成分包括约为总量 0.2 至 1wt%、0.2 至 2wt%、0.2 至 3wt%、0.2 至 4wt%、0.2 至 5wt%、0.2 至 6wt%、0.2 至 7wt%、0.2 至 8wt% 或 0.2 至 9wt% 的负电荷磷脂。在一些实施方案中, 所述脂质成分包括约为总量 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 或 3.0wt% 的负电荷磷脂和 / 或包括这些值作为端点的任何范围。在一些实施方案中, 所述脂质成分包括约为总量 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 或 3.0wt% 的负电荷磷脂, 一直到约为总量 4、5、6、7、8、9 或 10wt% 的负电荷磷脂。

[0091] 预期包括在此处描述的荷电脂蛋白络合物中的负电荷磷脂将提供与常规的络合物相比, 具有更高稳定性 (于溶液中) 的络合物以及具有更长货架期的产物。此外, 预期负电荷磷脂的使用可使颗粒的聚集降至最低 (如, 通过电荷排斥), 从而有效地增加给定剂量方案中存在的、可利用的络合物的数目, 并且有助于该络合物被肝靶向识别而不是肾。

[0092] 在体内, 一些载脂蛋白由一种脂蛋白络合物交换至另一种 (这对于载脂蛋白 ApoA-I 是正确的)。在这样的交换过程中, 该载脂蛋白通常随身携带一种或多种磷脂分子。由于这种性能而使得可以预期此处描述的荷电脂蛋白络合物能够将负电荷的磷脂“接种”于内源性的 HDL, 从而将负电荷的磷脂转化为对肾消除更具抵抗力的  $\alpha$  颗粒。因此, 预期此处描述的荷电脂蛋白络合物以及组合物的施用将增加血清 HDL 的浓度, 和 / 或改变内源性 HDL 的半衰期以及内源性 HDL 的代谢。预期其可使胆固醇代谢以及脂质逆转运发生改变。

[0093] 除了中性的和荷电的磷脂之外, 所述脂质成分可以任选地包括另外的脂质。事实上, 可以使用任何类型的脂质, 其包括但不限于溶血磷脂、半乳糖脑苷脂、神经节苷脂、脑苷脂、甘油酯、甘油三酯和胆固醇及其衍生物。

[0094] 尽管在一些例子中可以包括更多任选的脂质, 但是即使包括此类任选的脂质, 其通常也只包括低于约 50wt% 的脂质成分。在一些实施方案中, 荷电的脂蛋白络合物的脂质成分不包括任选的脂质。

[0095] 如发明内容部分所示, 包括荷电脂蛋白络合物的脂质成分的中性磷脂总量可以根据所包括的荷电磷脂的总量以及是否包括任何任选的脂质而改变, 并且其范围通常为约 50 至 99.8wt%。在不包括任选的脂质的特定实施方案中, 通常包括约为总量 90 至 99.8wt% 的中性磷脂。包括卵磷脂和 SM 的脂质成分中适宜的卵磷脂: SM 摩尔比在发明内容部分描述。

[0096] 在特定的实施方案中, 该荷电的脂蛋白络合物是三元络合物, 在该三元络合物中, 所述脂质成分基本上由约 90 至 99.8wt% 的 SM 以及约 0.2 至 10wt% 的负电荷磷脂, 例如, 约为总量 0.2-1wt%、0.2-2wt%、0.2-3wt%、0.2-4wt%、0.2-5wt%、0.2-6wt%、0.2-7wt%、0.2-8wt%、0.2-9wt% 或 0.2-wt% 的负电荷磷脂组成。在另一个特定的实施方

案中,该荷电的脂蛋白络合物是三元络合物,在该三元络合物中,所述脂质成分基本上由约 90 至 99.8wt% 的卵磷脂以及约 0.2 至 10wt% 的负电荷磷脂,例如,约为总量 0.2-1wt%、0.2-2wt%、0.2-3wt%、0.2-4wt%、0.2-5wt%、0.2-6wt%、0.2-7wt%、0.2-8wt%、0.2-9wt% 或 0.2-10wt% 的负电荷磷脂组成。

[0097] 在又一特定的实施方案中,该荷电的脂蛋白络合物是四元络合物,在该四元络合物中,所述脂质成分基本上由约 9.8 至 90wt% 的 SM、约 9.8 至 90wt% 的卵磷脂以及约 0.2-10wt% 的负电荷磷脂,例如,约为总量 0.2-1wt%、0.2-2wt%、0.2-3wt%、0.2-4wt%、0.2-5wt%、0.2-6wt%、0.2-7wt%、0.2-8wt%、0.2-9wt% 至 0.2-10wt% 的负电荷磷脂组成。

[0098] 该络合物还可以任选地包括其他蛋白质,例子如对氧磷酶 (PON) 或 LCAT、抗氧化剂、环糊精和 / 或其他有助于捕获核中或络合物表面胆固醇的材料。可以任选地对该络合物进行聚乙二醇化 (pegylated) (如,使用聚乙二醇或其他聚合物覆盖) 以延长循环半衰期。

[0099] 如本领域技术人员所理解的,此处描述的荷电脂蛋白络合物中脂质成分与载脂蛋白成分的摩尔比可以改变,并且除了其他因素之外,该摩尔比取决于包括所述载脂蛋白成分的载脂蛋白的特性、包括所述脂质成分的荷电磷脂的特性和数量、以及荷电脂蛋白络合物的期望尺寸。由于认为载脂蛋白 (诸如 ApoA-I) 的生物活性受包括载脂蛋白的两亲性螺旋介导,因此可方便地使用 ApoA-I 蛋白质当量来表示该载脂蛋白中脂质: 载脂蛋白的摩尔比。一般公认 ApoA-I 含有 6-10 个两亲性螺旋,并且其取决于用来计算螺旋的方法。根据载脂蛋白含有的两亲性螺旋数目,可以 ApoA-I 当量来表示其他的载脂蛋白。例如,通常以二硫桥键二聚体存在的 ApoA-I<sub>M</sub> 可表示为 2 当量的 ApoA-I,原因是每分子 ApoA-I<sub>M</sub> 含有的两亲性螺旋是每分子 ApoA-I 的两倍。相反,含有一个两亲性螺旋的肽载脂蛋白可以表示为 1/10-1/6 当量的 ApoA-I,原因是其每分子含有的两亲性螺旋是每分子 ApoA-I 的 1/10-1/6。一般而言,荷电脂蛋白络合物 (此处定义为“R<sub>i</sub>”) 中脂质: ApoA-I 当量的摩尔比范围为约 2 : 1 至 100 : 1。在一些实施方案中,R<sub>i</sub> 约为 50 : 1。使用 MW 约为 650-800 的磷脂可以获得重量比。

[0100] 可以通过改变 R<sub>i</sub> 来控制荷电的脂蛋白络合物的尺寸。换言之,R<sub>i</sub> 越小,圆盘越小。例如,大的盘状圆盘一般具有的 R<sub>i</sub> 范围为约 200 : 1 至 100 : 1,而小的盘状圆盘一般具有的 R<sub>i</sub> 范围为约 100 : 1 至 30 : 1。

[0101] 在一些特定的实施方案中,该荷电的脂蛋白络合物为大的盘状圆盘,其含有 2-4 当量 ApoA-I (如,2-4 分子 ApoA-I、1-2 分子 ApoA-I<sub>M</sub> 二聚体或 6-10 单螺旋肽分子)、1 分子荷电的磷脂以及总计 400 分子中性的磷脂。在其他特定的实施方案中,该荷电的脂蛋白络合物是小的盘状圆盘,其含有 2-4 当量的 ApoA-I、1 分子荷电的磷脂以及总计 200 分子中性的磷脂。

[0102] 可以使用任何本领域已知的、可检测的标记物对各种载脂蛋白和 / 或包括荷电脂蛋白络合物的磷脂分子进行标记,所述标记物包括稳定的同位素 (如,<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>2</sup>H 等)、放射性同位素 (如,<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I 等)、荧光团、化学发光物或酶标记物。

[0103] 6.3 制备荷电脂蛋白络合物的方法

[0104] 可以将此处描述的荷电脂蛋白络合物制备成多种形式,其包括但不限于囊泡、脂

质体、脂蛋白体、胶束和盘状的颗粒。可以使用本领域技术人员公知的多种方法来制备该荷电的脂蛋白络合物。可以使用大量可用于制备脂质体或脂蛋白体的技术。例如,载脂蛋白可以与合适的磷脂一起超声(使用超声浴或探针超声波仪)以形成络合物。可选地,载脂蛋白可以与预成型的脂质囊泡组合以便自发形成荷电的脂蛋白络合物。还可以通过洗涤剂透析法或通过使用挤出装置或通过均化作用来形成荷电的脂蛋白络合物,例如,将载脂蛋白、荷电的磷脂 SM 和 / 或卵磷脂以及诸如胆酸盐的洗涤剂的混合物进行透析,以除去洗涤剂并重构形成荷电的脂蛋白络合物(参见,如,Jonas 等人,1986,Methods in Enzymol. 128 : 553-82)。

[0105] 在某些实施方案中,通过美国公布文本 2004/0067873 的实施例 1 中描述的胆酸盐分散法来制备荷电的脂蛋白络合物,通过引用将其公开内容并入本文。简要地,将干燥的脂质在  $\text{NaHCO}_3$  缓冲液中进行水合,然后进行涡旋和超声直至所有脂质分散。加入胆酸盐溶液,并将该混合物孵育 30 分钟,同时定期进行涡旋和超声,直至该混合物变澄清,此时表明形成了脂质胆酸盐胶束。加入原 ApoA-I 的  $\text{NaHCO}_3$  缓冲液,并将该溶液在大约  $37^\circ\text{C}$  - $50^\circ\text{C}$  下孵育 1 小时。溶液中脂质:原 ApoA-I 的比值可以由 1 : 1 至 200 : 1(摩尔/摩尔),但是在一些实施方案中,该比值为约 2 : 1 的脂质重量与蛋白质重量比(wt/wt)。

[0106] 可以通过本领域公知的方法除去胆酸盐。例如,可以通过透析、超滤而除去胆酸盐,或者通过吸附吸收至亲合珠(affinity bead)或树脂而除去胆酸盐分子。在一个实施方案中,将亲合珠,如 BIO-BEADS<sup>®</sup>(Bio-Rad 实验室)加于荷电脂蛋白络合物与胆酸盐的制剂以吸附胆酸盐。在另一个实施方案中,将该制剂,比如荷电脂蛋白络合物与胆酸盐的胶束制剂通过填装有亲合珠的柱子。

[0107] 在特定的实施方案中,通过将该制剂装载于注射器内的 BIO-BEADS<sup>®</sup>上而由荷电脂蛋白络合物制剂除去胆酸盐。然后使用隔膜密封该注射器并于  $4^\circ\text{C}$  下摇摆孵育过夜。使用前,通过将该溶液注射通过 BIO-BEADS<sup>®</sup>而除去胆酸盐,胆酸盐在 BIO-BEADS<sup>®</sup>中被所述珠吸附。

[0108] 当该络合物具有类似于 HDL,特别是类似于前- $\beta$ -1 或前- $\beta$ -2 HDL 群中的 HDL 的尺寸与密度时,预期该荷电的脂蛋白络合物具有延长的循环半衰期。可以通过冷冻干燥来制备具有较长有效期的稳定制剂。例如,下文描述的共冷冻干燥法提供了稳定的配制品并且使得配制过程/颗粒制备过程更容易进行。美国专利第 6,287,590 号还描述了共冷冻干燥法(Dasseux 等人,题为“Peptide/lipid complex formation by co-lyophilization”,2001 年 9 月 11 日发行),通过引用将其全部内容并入本文。可以使用冷冻的荷电脂蛋白络合物来制备用于药物再配制的散装供应品(bulk supplies),或者制备在施用于受试者之前可以通过使用无菌水或合适的缓冲液再水化而进行重构的单独等分部分或剂量单位。

[0109] 美国专利第 6,004,925、6,037,323、6,046,166 和 6,287,590 号(通过引用将其全部内容并入本文)公开了一种用于制备具有类似于 HDL 性质的荷电脂蛋白络合物的简单方法。这种方法包括载脂蛋白与脂质溶液在有机溶剂(或溶剂混合物)中的共冷冻干燥以及冷冻干燥的粉末在水合过程形成荷电的脂蛋白络合物,且该方法具有以下优势:(1) 该方法需要很少的步骤;(2) 该方法使用价格低廉的溶剂;(3) 所包括的成分中的大部分或全部均被用来形成设计的络合物,因而避免了对于其他方法而言常见的起始材料的浪费;(4)

形成了贮存期间很稳定的冻干络合物,因而使所得的络合物可以在使用前立即进行重构;(5) 所得的络合物在形成后以及在使用前通常不必进行进一步的纯化;(6) 避免了毒性化合物,包括诸如胆酸盐的洗涤剂;和(7) 该制造方法易于工业化并且适用于 GMP 生产(即,在无内毒素的环境中)。

[0110] 在一些实施方案中,使用通常为本领域已知的共冷冻干燥法来制备荷电的脂蛋白络合物。简要地,共冷冻干燥步骤包括将载脂蛋白(“Apo”)与磷脂一起溶解于有机溶剂或溶剂混合物中,或者将 Apo 与磷脂单独溶解后再把它们混合到一起。溶剂或溶剂混合物的期望特征为:(i) 能够溶解疏水性脂质和两性蛋白质的介质相对极性,(ii) 溶剂应属于根据 FDA 溶剂指导原则(联邦公报,第 247 号,62 卷)的 2 或 3 类溶剂,以避免与残留的有机溶剂相关的潜在毒性,(iii) 具有较低的沸点以确保冷冻干燥过程中更易除去溶剂,(iv) 具有较高的熔点以便提供更快速的冷冻、更高的冷凝温度,以及由此而使用更少的冷冻干燥器皿。在优选的实施方案中,使用了冰醋酸。还可以使用如甲醇、冰醋酸、二甲苯或环己烷的组合物。

[0111] 然后将 Apo/ 脂质溶液进行冷冻干燥以获得均质的 Apo/ 脂质粉末。可以对冷冻干燥的条件进行优化以获得溶剂的快速蒸发,并使冷冻干燥的 Apo/ 脂质粉末中残留溶剂的量达到最少。冷冻干燥条件的选择可由本领域技术人员确定,并且其取决于溶剂的特性、容器(如瓶)的类型和尺寸、容纳的溶液、填充体积以及使用的冷冻干燥机的性能。为了除去有机溶剂并成功地形成络合物,脂质/Apo 溶液在冻干之前的浓度范围可以为 10 至 50mg/ml 浓度当量的 Apo A-I,以及 20 至 100mg/ml 浓度的脂质。

[0112] 在 Apo- 脂质冻干粉末与具有合适 pH 和渗透压的水性介质进行水合后自发形成了 Apo- 脂质络合物。在一些实施方案中,该介质还可以含有稳定剂,如蔗糖、海藻糖、甘油及其他。在一些实施方案中,为了形成脂质络合物,必须将该溶液加热超过转变温度几次。为了成功形成荷电的脂蛋白络合物,脂质与蛋白质的摩尔比可以为 2 : 1 至 200 : 1(以 ApoA-I 当量表示)并且优选为约 2 : 1 的脂质重量与蛋白质重量比(wt/wt)。将粉末进行水合以获得最终的络合物浓度,其以 ApoA-I 蛋白质当量表示为约 5-30mg/ml。

[0113] 在一些实施方案中,通过将 Apo 溶液的  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  溶液进行冷冻干燥而获得 Apo 粉末。通过将脂质粉末与 Apo 溶解于冰醋酸中而形成 Apo 与脂质的均匀溶液。然后将该溶液进行冻干,并通过使冻干的粉末与水性介质水合而形成类似于 HDL 的荷电脂蛋白络合物。

[0114] 在一些实施方案中,使用均化作用来制备 Apo- 脂质络合物。该方法还可用于制备 Apo 大豆-PC 络合物并且其通常用于配制 ApoA-I<sub>M</sub>-POPC 络合物。均化作用可能更适于荷电脂蛋白络合物的形成。简要地,该方法包括以下步骤:通过 Ultraturex™ 而形成脂质在 Apo 水溶液中的混悬液,并且使用高压匀质机对形成的脂质-蛋白质混悬液进行均化直至混悬液变成澄清的乳白色溶液并形成络合物。在均化过程中使用高于脂质转变的温度。将溶液另外均化 1-14 小时的时间并加压。

[0115] 在一些实施方案中,可以通过将磷脂与肽或蛋白质溶液或混悬液进行共冷冻干燥而形成荷电的脂蛋白络合物。可以将肽/蛋白质、荷电的磷脂、SM 和/或卵磷脂(外加上任何其他选择的磷脂)于有机溶剂或有机溶剂混合物中的均匀溶液进行冻干,并且可以通过使冻干的粉末与水性缓冲液水合而自发形成荷电的脂蛋白络合物。有机溶剂或其混合物的实例包括但不限于乙酸、乙酸与二甲苯、乙酸与环己烷、以及甲醇与二甲苯。

[0116] 可以凭经验来确定蛋白质（肽）与脂质的适宜的比例，以使所得的络合物具有合适的物理和化学性能，即，通常（但不是必需的）类似于 HDL 的尺寸。将得到的 Apo 与脂质于溶剂的混合物进行冷冻并冻干至干燥。有时必须向该混合物中加入另外的溶剂以使冻干顺利进行。期望该冻干产品能够贮存较长的时间并保持稳定。

[0117] 可以重构该冻干产品以获得荷电脂蛋白络合物的溶液或混悬液。为此，该冻干的粉末可以与含水溶液再水化至适合用于如静脉内注射的适宜的体积（一般为 5-20mg 荷电脂蛋白络合物/ml）。在优选的实施方案中，所述冻干的粉末与磷酸盐缓冲液、碳酸氢盐或生理盐水溶液进行再水化。可以搅动或涡旋该混合物以使再水化顺利进行。一般而言，该重构步骤应在等于或高于络合物中脂质组分的相变温度下进行。在重构的数分钟内，应得到重构的荷电脂蛋白络合物的澄清制剂。

[0118] 其他的方法包括喷雾干燥，在喷雾干燥中溶液被喷出且溶剂被蒸发（在升高的温度或降低的压力下）。可以将脂质与载脂蛋白溶解于相同的溶剂或不同的溶剂中。然后将粉末填料填入瓶中。

[0119] 还可以使用机械方法混合载脂蛋白与脂质的冻干粉末。然后将含有载脂蛋白与脂质的均匀粉末进行水合以自发形成合适尺寸和合适脂质：载脂蛋白摩尔比的络合物。

[0120] 可以对所得的重构制剂的等分部分进行表征以证实该制剂中的络合物具有期望的粒径分布，如 HDL 的粒径分布。所述重构制剂的鉴定可以使用本领域已知的任何方法来施行，所述方法包括但不限于尺寸排阻过滤（size exclusion filtration）、凝胶过滤、柱过滤、凝胶渗透色谱法以及非变性凝胶电泳。

[0121] 例如，在冻干的荷电脂蛋白粉末水合之后或者在均化作用结束时，或在形成类似于 HDL 的 Apo- 脂质颗粒的胆酸盐透析结束时，以其尺寸、浓度、所得溶液的最终 pH 以及渗透压进行表征，在一些例子中，以脂质和 / 或载脂蛋白的完整性进行表征。所得的荷电脂蛋白颗粒的粒径是其完整性的决定因素，因此该测量值通常包括所述颗粒的特征。

[0122] 在一些实施方案中，可以使用凝胶渗透色谱法（GPC），如配有 1×30cm Superdex™ 柱（Pharmacia Biotech）和 UV 检测器的高压液相色谱系统。络合物使用包括 140mM NaCl 和 20mM 碳酸氢钠的碳酸氢盐缓冲液进行洗脱，并以 0.5ml/min 的流速递送。注入的络合物的典型量基于蛋白质重量为 0.1 至 1mg。可以通过 280nm 处的吸光度来检测该络合物。

[0123] 可以通过本领域已知的任何方法来测量荷电脂蛋白颗粒溶液中的蛋白质与脂质浓度，所述方法包括但不限于蛋白质与磷脂分析以及色谱法，比如与各种检测器连接的 HPLC、凝胶过滤色谱法、GC，而所述检测器包括质谱、UV 或二极管阵列、荧光、弹性光散射及其他。还可以通过相同的色谱技术以及肽谱法、SDS-page 凝胶、N- 和 C- 末端的蛋白质序列以及用于检测脂质氧化的标准检验来测定脂质与蛋白质的完整性。

[0124] 可以通过本领域已知的任何方法来测量此处描述的荷电脂蛋白络合物或组合物的均匀性和 / 或稳定性，所述方法包括但不限于色谱法，如凝胶过滤色谱法。例如，在一些实施方案中，单峰或数目有限的峰与稳定的络合物有关。可通过监测随时间而出现的新峰来确定该络合物的稳定性。由于颗粒的不稳定性而使得新峰的出现成为络合物中重组的标记。

[0125] 荷电络合物中磷脂与载脂蛋白的最佳比例可以使用本领域已知的任何数目的功能性检测来测定，所述功能性检测包括但不限于凝胶电泳迁移率检测、尺寸排阻色谱法、与

HDL 受体的相互作用、经由 ATP- 结合盒转运子 (ABCA1) 的识别、肝的摄取以及药物动力学 / 药效学。例如,可以使用凝胶电泳迁移率检测来测定荷电络合物中磷脂与载脂蛋白的最佳比例。此处描述的荷电络合物应表现出类似于天然前- $\beta$ -HDL 或  $\alpha$ -HDL 颗粒的电泳迁移率。因此,在一些实施方案中,可将天然前- $\beta$ -HDL 或  $\alpha$ -HDL 颗粒用作测定荷电络合物的迁移率的标准品。

[0126] 作为另一个实例,可以使用尺寸排阻色谱法来测定此处描述的荷电络合物与天然前- $\beta$ -HDL 颗粒相比的粒径。天然前- $\beta$ -HDL 颗粒通常不超过 10-12nm,并且该盘状颗粒的外周通常为 7-10nm。

[0127] 作为另一个实例,可以在功能性的检测中使用 HDL 受体以便鉴别出哪种络合物最接近于天然的前- $\beta$ -HDL 颗粒,或者鉴别出哪种络合物最有效地由细胞除去胆固醇或脂质和 / 或使其流动。在一种检测中,可以测试该络合物结合 ABCA-1 受体的能力。这样的检测依赖于独立去除的胆固醇而可以区分出 ABCA-1。虽然认为 ApoA-I 是用于此类检测的最佳配基,但是诸如小胶束或小的盘状颗粒的络合物也是具有潜力的 ABCA-1 配基。可以使用的 ABCA-1 结合实验描述于 Brewer 等人,2004, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 24 : 1755-1760)。

[0128] 作为另一个实例,已知表达 ABCA1 的细胞可识别游离 ApoA-1 并将天然前- $\beta$ -HDL 颗粒减至较少的程度 (Brewer 等人,2004, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 24 : 1755-1760。在这些实施方案中,可将识别的天然前- $\beta$ -HDL 颗粒的 ABCA1 细胞与任何一种此处描述的荷电络合物进行比较,以便鉴别出极度类似于天然前- $\beta$ -HDL 颗粒的络合物。

[0129] 一种用于鉴别极度类似于天然前- $\beta$ -HDL 颗粒的荷电络合物的、相对简单的方法是使用含有重构的荷电络合物的溶液对肝进行灌注并测量由肝摄取量。

[0130] 在一些实施方案中,可以采用兔一次注射法来测量荷电络合物的药物动力学 / 药效学 (PK/PD)。在这些实施方案中,将 ApoA-1 的浓度作为动力学的指标。可以在一次注射后测量药效学,即测量基线上流动的胆固醇量以及 HDL 成分中的胆固醇量。PK 和 PD 取决于磷脂的性质、磷脂的组成、脂质:载脂蛋白的摩尔比以及络合物中磷脂的浓度。例如,二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)/ApoA-1 络合物具有比蛋磷脂酰胆碱 (EPC)/ApoA-1 络合物更长的半衰期。鞘磷脂/ApoA-1 络合物具有比 EPC/ApoA-1 络合物更长的半衰期。人 ApoA-1 在人的半衰期约为 5 至 6 天。

[0131] 在另一个实施方案中,可以通过追踪 HDL 成分中胆固醇随时间的酯化速率来测量荷电络合物的药效学。LCAT 是造成血液中胆固醇酯化的唯一的酶。胆固醇酯化的速率是评价颗粒质量的良好参数。LCAT 起分子探针的作用,假如四元络合物被 LCAT 识别,则酯化速率较高。这意味着表面是理想的,电荷是理想的,形态学是理想的以及两种底物是易于发生反应的 (LCAT 首先水解磷脂的酰基链 (酯酶活性),并且随后酯化胆固醇游离的 OH (酯酶活性) 以形成胆固醇酯) 并在正确的浓度。此外,其意味着该颗粒具有良好的尺寸以及组成以溶解并捕获以下反应的产物:溶血磷脂与胆固醇酯,否则该反应将停止。

[0132] 6.4 药物组合物

[0133] 发明内容所预期的药物组合物包括作为活性成分的荷电脂蛋白络合物,该络合物包含在药学上可接受的、适用于体内施用和递送的载体中。由于肽可以包含酸性和 / 或碱性的末端和 / 或侧链,因此肽模拟的载脂蛋白可以游离酸或碱的形式、或者以药学上可接

受的盐形式包括在该组合中。还可以使用改性的蛋白质,如酰胺化、酰化、乙酰化或聚乙二醇化的蛋白质。

[0134] 可注射的组合物包括活性成分在水性或油性载体中的无菌混悬液、溶液或乳剂。该组合物还可包括多种配方成分,如混悬剂、稳定剂和 / 或分散剂。用于注射的组合物可以单位剂量形式存在,如,在安瓿中或在多剂量的容器中,并且可包括添加的防腐剂。对于输注,组合物可在输液袋中进行供应,该输液袋由与荷电脂蛋白络合物相容的材料制成,如乙烯乙酸乙烯酯或任何其他本领域已知的相容的材料。

[0135] 可选地,可注射的组合物可以粉末形式提供,该粉末形式在使用前可用适宜的载体进行重构,所述载体包括但不限于无菌无热原的水、缓冲液、葡萄糖溶液等。为此,可以将 Apo 进行冻干,或者可以制备共冷冻干燥的荷电脂蛋白络合物。贮存的组合物可以单位剂量形式供应并在用于体内前进行重构。

[0136] 对于延长的递送而言,可将活性成分配制成贮库组合物而用于植入施用,如皮下、皮内或肌内注射。因此,例如, Apo- 脂质络合物或载脂蛋白可单独与适宜的聚合或疏水材料一起配制(如,作为可接受的油中的乳剂)或者在磷脂泡沫或离子交换树脂中配制。

[0137] 可选地,可以使用作为吸盘或贴片而制备的透皮递送系统,其缓慢地释放经皮吸收的活性成分。为此,可以使用渗透促进剂以促进活性成分的经皮渗透。通过将此处描述的荷电络合物引入用于患有缺血性心脏病和高胆固醇血症的患者的硝酸甘油贴片中而获得特定的益处。

[0138] 可选地,可以使用导管或注射器进行局部或壁内(血管壁内)递送(参见,如,美国公布文本 2003/0109442)。

[0139] 如果希望,该组合物可以存在于包装或分配器装置中,所述包装或分配器装置可以包括含有活性成分的一种或多种单位剂量形式。例如,该包装可以包括金属或塑料箔,比如泡罩包装。该包装或分配器装置可以附有施用说明书。

#### [0140] 6.5 治疗方法

[0141] 事实上,此处描述的荷电脂蛋白络合物与组合物可以用于脂蛋白络合物的各种显示为有用的目的。在特定的实施方案中,该络合物和组合物可以用于治疗或预防血脂异常和 / 或实际上与血脂异常相关的任何疾病、病症和 / 或失调。如此处所用,术语“血脂异常”或“血脂异常的”指血浆中脂质浓度不正常的升高或降低,其包括但不限于与以下病症相关的脂质浓度的改变:冠心病、冠状动脉疾病、心血管疾病、高血压、再狭窄、血管或外周血管疾病、脂质代谢紊乱、异常脂蛋白血症、高浓度的低密度脂蛋白胆固醇、高浓度的极低密度脂蛋白胆固醇、低浓度的高密度脂蛋白、高浓度的脂蛋白 Lp(a) 胆固醇、高浓度的载脂蛋白 B、动脉粥样硬化(包括动脉粥样硬化的治疗和预防)、高脂血症、高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症 (FH)、家族性复合高脂血症 (FCH)、脂蛋白脂肪酶缺乏,如高甘油三酯血症、 $\alpha$  低脂蛋白血症以及高胆固醇脂蛋白血症 (hypercholesterolemialipoprotein)。

[0142] 与血脂异常相关的疾病包括但不限于冠心病、冠状动脉疾病、急性冠状动脉综合征、心血管疾病、高血压、再狭窄、血管或外周血管疾病、脂质代谢紊乱、异常脂蛋白血症、高浓度的低密度脂蛋白胆固醇、高浓度的极低密度脂蛋白胆固醇、低浓度的高密度脂蛋白、高浓度的脂蛋白 Lp(a) 胆固醇、高浓度的载脂蛋白 B、动脉粥样硬化(包括动脉粥样硬化的治疗和预防)、高脂血症、高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症 (FH)、家族性复合高脂血症



(FCH)、脂蛋白脂肪酶缺乏,如高甘油三酯血症、 $\alpha$  低脂蛋白血症以及高胆固醇脂蛋白血症。

[0143] 预期通过使用此处描述的荷电脂蛋白络合物和组合物可使剂量范围低于目前本领域已知的有效剂量约 2 至 25 倍(以 ApoA-I 当量表示)的磷脂可有效地治疗或预防疾病或者能够带来改善的疗效。

[0144] 在一个实施方案中,该方法包括一种治疗或预防与血脂异常相关的疾病的方法,其包括以下步骤:向受试者施用此处描述的、有效量的荷电脂蛋白络合物或组合物以便在施用至少一天后,获得比施用前基线浓度(最初的)更高的、范围为约 10mg/dL 至 300mg/dL 的游离或络合的载脂蛋白血清浓度。

[0145] 在另一个实施方案中,该方法包括一种治疗或预防与血脂异常相关的疾病的方法,其包括以下步骤:向受试者施用此处描述的、有效量的荷电脂蛋白络合物或组合物以便在施用至少一天后,获得比施用前最初的 HDL-胆固醇成分高至少约 10% 的 HDL-胆固醇成分的循环血浆浓度。

[0146] 在另一个实施方案中,该方法包括一种治疗或预防与血脂异常相关的疾病的方法,其包括以下步骤:向受试者施用此处描述的、有效量的荷电脂蛋白络合物或组合物以便在施用后的 5 分钟到 1 天之间,获得 30 和 300mg/dL 的 HDL-胆固醇成分的循环血浆浓度。

[0147] 在另一个实施方案中,该方法包括一种治疗或预防与血脂异常相关的疾病的方法,其包括以下步骤:向受试者施用此处描述的、有效量的荷电脂蛋白络合物或组合物以便在施用后的 5 分钟到 1 天之间,获得 30 和 300mg/dL 的胆固醇酯的循环血浆浓度。

[0148] 在又一实施方案中,该方法包括一种治疗或预防与血脂异常相关的疾病的方法,其包括以下步骤:向受试者施用此处描述的、有效量的荷电脂蛋白络合物或组合物以便在施用至少一天后,获得比施用前的基线(最初的)浓度高至少约 10% 的增加的粪便胆固醇分泌。

[0149] 此处描述的荷电脂蛋白络合物或组合物可以单独使用或与用于治疗或预防前述病症的其他药物进行联合治疗。这样的治疗包括但不限于所包括药物的同时或依序施用。例如,在高胆固醇血症或动脉粥样硬化的治疗中,荷电的脂蛋白制剂可以与目前使用的任何一种或多种降低胆固醇的疗法一起施用,如胆汁酸树脂、烟酸、抑制素、胆固醇吸收抑制剂和/或贝特类药物。由于在胆固醇的合成和转运中,每种药物作用于不同的靶点,因而使得这样的联合方案可以产生特定的有益疗效,即,胆汁酸树脂影响胆固醇的再循环、乳糜微粒和 LDL 群;烟酸主要影响 VLDL 和 LDL 群;抑制素抑制胆固醇的合成,减少 LDL 群(或者增加 LDL 受体的表达);而此处描述的荷电脂蛋白络合物影响 RCT,增加 HDL 并促进胆固醇外流。

[0150] 在另一个实施方案中,此处描述的荷电脂蛋白络合物或组合物可以结合贝特类药物使用以治疗或预防冠心病、冠状动脉疾病、心血管疾病、高血压、再狭窄、血管或外周血管疾病、脂质代谢紊乱、异常脂蛋白血症、高浓度的低密度脂蛋白胆固醇、高浓度的极低密度脂蛋白胆固醇、低浓度的高密度脂蛋白、高浓度的脂蛋白 Lp(a) 胆固醇、高浓度的载脂蛋白 B、动脉粥样硬化(包括动脉粥样硬化的治疗和预防)、高脂血症、高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症(FH)、家族性复合高脂血症(FCH)、脂蛋白脂肪酶缺乏,如高甘油三酯血症、 $\alpha$  低脂蛋白血症以及高胆固醇脂蛋白血症。下文描述了示例性的制剂和治疗方案。

[0151] 可以通过任何确保循环生物利用度的、适宜的途径来施用此处描述的荷电脂蛋白

络合物或组合物。一个包括 SM 的、具有重要特征的实施方案是该荷电的脂蛋白络合物可以低于预期有效剂量 1-10% 的剂量施用,所述预期有效剂量对单独施用载脂蛋白 (Apo) 或 Apo 肽是有效的;以及以低于 Apo-大豆 PC(或 Apo-蛋 PC 或 Apo-POPC) 施用所需的有效剂量 2-25 倍的剂量施用。需要以与每 2 至 10 天约 40mg 至 2g 载脂蛋白 / 人一样低的剂量(用于静脉内注射)来进行施用,而不是目前可用的治疗方案所需的大量载脂蛋白(每 1.4g 至 8g 平均成人体重,每 2 至 5 天施用 20mg/kg 至 100mg/kg)。

[0152] 此处描述的荷电脂蛋白络合物或组合物可以增加小 HDL 成分的剂量施用,所述小 HDL 成分的例子为前- $\beta$ 、前- $\gamma$  和前- $\beta$  状 HDL 成分、 $\alpha$  HDL 成分、HDL3 和 / 或 HDL2 成分。在一些实施方案中,该剂量可有效地实现如经由显像技术所测量的动脉粥样硬化斑块的减少,所述显像技术如磁共振成像 (MRI) 或血管内超声 (IVUS)。IVUS 追踪的参数包括但不限于粥样斑体积由基线改变的百分比以及粥样斑总体积的改变;MRI 追踪的参数包括但不限于 IVUS 的那些参数以及脂质的组成和斑块的钙化。

[0153] 可以在最后的输注结束时,或在最后的输注后数周内,或在开始治疗后的 3 个月、6 个月或 1 年内使用患者作为自身对照来测量斑块的消退(时间 0 比时间 t)。

[0154] 通过胃肠外的施用途径可实现最佳的施用,其包括静脉内注射 (IV)、肌内注射 (IM)、皮内注射、皮下注射 (SC) 以及腹膜内注射 (IP)。在某些实施方案中,经由注射器、吸入器或导管进行施用。在一些实施方案中,该荷电的脂蛋白络合物以获得与通过胃肠外施用获得的循环血清浓度相等的量,通过注射、皮下植入泵或贮库制品进行施用。例如,该络合物还可吸入支架或其他装置中。

[0155] 可以通过多种不同的治疗方案来实现施用。例如,可以在一天内定期地施用几次静脉内注射,其中累积的注射总体积不能达到每日毒性剂量。可选地,可以大约每 3 至 15 天施用一次静脉内注射,优选大约每 5 至 10 天一次,并且最优选大约每 10 天一次。在又一备选方案中,可以施用渐增的剂量,开始时以每次施用 (50-200mg) 之间的剂量给药约 1 至 5 次,随后每次施用时重复 200mg 和 1g 之间的剂量。根据患者的需求,其可以通过持续时间超过 1 小时的缓慢输注进行施用,通过 1 小时或更少时间的快速输注进行施用,或者通过一次快速推注施用。

[0156] 在一些实施方案中,可以进行定期的注射施用,然后停止 6 个月至 1 年,随后再开始另一系列的施用。然后可以每年或每 3 至 5 年施用注射维持系列。可以在一天内(灌注以维持络合物的特定血浆浓度)、几天内(如,在八天的时间内注射四次)或几周内(如,在四周的时间内注射四次)施用该系列的注射,然后在六个月至一年后重新开始。

[0157] 可以使用其他的施用途径。例如,可以通过口服施用途径(包括但不限于吞服、含服和舌下途径)来实现经过胃肠道的吸收,所述口服施用途径由合适的制剂提供(如肠溶衣),其可用于避免活性成分在如口腔粘膜、胃和 / 或小肠的苛刻环境中的降解或者使其降解达到最低。可选地,可以采用经由粘膜组织的施用,比如阴道和直肠施用模式来避免胃肠道中的降解或使其降解达到最小。在其他的实施方案中,本发明的制剂可以经皮(如,透皮)或吸入施用。应理解的是优选的途径可以根据接受者的病症、年龄和依从性而改变。

[0158] 此处描述的荷电脂蛋白络合物或组合物的实际剂量可以根据施用途径而改变。

[0159] 由美国专利第 6,004,925、6,037,323 和 6,046,166 号描述的动物模型系统获得的数据(授予 Dasseux 等人,通过引用将其全部内容并入本文)表明 ApoA-I 肽与 HDL 组分缔

合,并预计在人中具有约 5 天的半衰期。因此,在一些实施方案中,荷电的脂蛋白络合物可以以下述剂量通过静脉内注射施用:每 2 至 10 天,每平均体重成人每次施用约 0.1g-1g 之间剂量的荷电脂蛋白络合物。

[0160] 可以使用细胞培养中的标准药物规程或者使用测定 LD50 (群体 50% 的致死剂量) 和 ED50 (群体 50% 的治疗有效剂量) 的实验动物来测定各种荷电脂蛋白络合物的毒性和治疗效力。毒性与治疗作用之间的剂量比是治疗指标并且其可以表示为 LD50/ED50 比值。优选表现出更高治疗指数的荷电脂蛋白络合物。可跟踪的参数非限制性实例包括肝功能转氨酶 (不超过  $2 \times$  正常的基线水平)。其表明过多的胆固醇被运至肝并且不能通化如此大的量。由于胆固醇由红细胞流出可使红细胞变脆或者影响红细胞的形状,因而还可监测对红细胞的作用。

[0161] 患者可以在采取医疗措施 (如,预防性治疗) 之前、或之中或之后接受数天至数周的治疗。所述施用可以与另一种干预疗法依序或同时进行,所述干预疗法如血管成形术、颈动脉消融术、rotoblader 或器官移植 (如,心脏、肾、肝等)。

[0162] 在某些实施方案中,将荷电的脂蛋白络合物施用于胆固醇合成受抑制素或胆固醇合成抑制剂控制的患者。在其他实施方案中,将荷电的脂蛋白络合物施用于接受结合树脂 (如消胆胺的半合成树脂) 或纤维 (如植物纤维) 治疗的患者,以捕获胆汁盐和胆固醇从而增加胆汁酸的分泌并降低血胆固醇浓度。

[0163] 6.6 其他用途

[0164] 例如,出于诊断的目的,可以在体外检测中使用此处描述的荷电脂蛋白络合物和组合物来测量血清 HDL。由于 ApoA-I、ApoA-II 和 Apo 肽与血清中的 HDL 组分缔合,因此荷电的脂蛋白络合物可作为 HDL 群和前- $\beta$  以及前- $\beta$  2 HDL 群的“标记物”使用。此外,该荷电的脂蛋白络合物可作为在 RCT 中有效的 HDL 亚群的标记物使用。为此,可将荷电的脂蛋白络合物加于患者的血清样品或与其混合,在合适的孵育时间后,可以通过检测引入的荷电脂蛋白络合物来分析 HDL 组分。这可通过使用标记的荷电脂蛋白络合物 (如,放射性标记、荧光标记、酶标记、染料等) 实现,或者通过使用对荷电脂蛋白络合物具有抗体 (或抗体片段) 特异性的免疫测定实现。

[0165] 可选地,成像法可以使用标记的荷电脂蛋白络合物 (如,CAT 扫描、MRI 扫描) 以使循环系统显像或者监测 RCT、或者使脂纹、动脉粥样硬化病变等地方蓄积的 HDL 显像,其中 HDL 在胆固醇外流中具有活性。

[0166] 与某种原 ApoA-1 脂质络合物的制品和特性相关的实施例以及数据在美国专利公布文本第 2004/0067873 号中描述,通过引用将其全部内容并入本文。

[0167] 由使用某种原 ApoA-1 脂质络合物的动物模型系统获得的数据在美国专利公布文本第 2004/0067873 号中描述,通过引用将其全部内容并入本文。

[0168] 7. 实施例

[0169] 实施例 1:原 ApoA-I、鞘磷脂和磷脂酰甘油的制备

[0170] 原 ApoA-I 蛋白质以每 100mL 瓶含有约 90mg 蛋白质的冻干品由 Unité de Biotechnologie, Institut Meurice, Hte Ecole Lucia De Brouckère, 1Avenue Emile Gryzon, B-1070 Anderlecht, Belgium 供应。批号为 20060202。该蛋白质使用前在大约 4°C 下保存。在冻干之前,原 ApoA-I 的浓度为 3.225mg/mL,其中脲的含量为约 0.011mg/mL。通

过将大约 630mg 的原 ApoA-I 溶解于 25.6mL 的乙酸 /5% 水中而制备原 ApoA-I 溶液。溶液的终浓度为 25mg/mL。

[0171] 来自蛋的鞘磷脂 (Coatsome<sup>®</sup> NM-10) 由日本的 NOF 公司, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-Shi, 660-0095 供应。批号为 0502ES1。鞘磷脂使用前在大约 -20°C 下保存。鞘磷脂的纯度为 99.1%。通过将 799.4mg 纯化的鞘磷脂溶解于 16mL 的乙酸 /5% 水中以得到 50mg/mL 的终浓度而制备鞘磷脂溶液。

[0172] 1,2-二棕榈酰 -SN-甘油基 -3-磷脂酰甘油 (phosphatidyl glycerol) 的钠盐 (DPPG-Na, Coatsome<sup>®</sup> MG-6060LS) 由日本的 NOF 公司, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-Shi, 660-0095 供应。批号为 0309651L。DPPG-Na 使用前在大约 4°C 下保存。DPPG-Na 的纯度为 99.2%。通过将 49.1mg 的 DPPG-Na 溶解于 1mL 的乙酸 /5% 水中以得到 50mg/mL 的终浓度而制备 DPPG-Na 溶液。

[0173] 实施例 2: 未荷电的对照脂蛋白络合物的制备

[0174] 按照以下描述来制备由原 Apo-AI (33wt%) 和鞘磷脂 (67wt%) 组成的、未荷电的对照脂蛋白络合物。

[0175] 通过将 5.6mL 浓度为 25mg/mL 的原 Apo-AI 与大约 5.6mL 浓度为 50mg/mL 的鞘磷脂在 100mL 的玻璃瓶中进行混合而制备未荷电的对照脂蛋白络合物的制剂。将所得的混合物通过 0.22  $\mu$ m 的尼龙过滤器过滤。在约 50°C 下加热混合物且随后在人工搅拌下于液氮中冷冻。冻结后立即将该瓶置于冷冻干燥机中 15 小时。冻干后, 将该瓶在约 40°C 的真空下放置 4 小时。所得的制剂于使用前在大约 4°C 下保存。

[0176] 将 14mL 含有 140mM NaCl 和 20mM NaHCO<sub>3</sub> 的溶液加于含有未荷电的对照脂蛋白络合物冻干制剂的玻璃瓶中。通过向 20mL 溶液中加入 0.75mL 的 1M NaOH 来将所得溶液调节至碱性的 pH。人工搅拌该溶液, 在大约 50°C 下加热, 然后置入超声浴中至少 1 小时。原 ApoA-I 在所得制剂中的浓度为 10mg/mL。将该制剂注入 HPLC 系统以检测存在的未荷电脂蛋白络合物。图 1 提供了按照此处描述制备的、未荷电脂蛋白络合物的 HPLC 色谱图的一个例子。

[0177] 实施例 3: 测试的荷电脂蛋白络合物的制备

[0178] 按照以下描述来制备由原 Apo-AI (33wt%)、鞘磷脂 (65wt%) 和磷脂酰甘油 (2wt%) 组成的、荷电脂蛋白络合物。

[0179] 通过将 5.6mL 浓度为 25mg/mL 的原 ApoA-I 与大约 5.6mL 浓度为 50mg/mL 的鞘磷脂以及大约 0.15mL 浓度为 50mg/mL 的 DPPG-NA 在 100mL 的玻璃瓶中进行混合而制备荷电脂蛋白络合物的制剂, 且随后将所得的混合物通过 0.22  $\mu$ m 的尼龙过滤器过滤。在约 50°C 下加热混合物并在人工搅拌下于液氮中冷冻。冻结后立即将该瓶置于冷冻干燥机中 15 小时。冻干后, 将该瓶在约 40°C 的真空下放置 4 小时。所得的制剂于使用前在大约 4°C 下保存。

[0180] 将 14mL 140mM NaCl 和 20mM NaHCO<sub>3</sub> 加于含有上述冻干制剂的玻璃瓶中。通过向 20mL 溶液中加入 0.75mL 的 1M NaOH 来将所得溶液调节至碱性的 pH。人工搅拌该溶液, 在大约 50°C 下加热, 然后置入超声浴中至少 1 小时。原 ApoA-I 在所得制剂中的浓度为 10mg/mL。将该制剂注入 HPLC 系统以检测存在的未荷电脂蛋白络合物。图 2 提供了按照此处描述制备的、荷电脂蛋白络合物的 HPLC 色谱图的一个例子。

[0181] 实施例 4 :动物模型系统

[0182] 使用重量在 3 至 4kg 之间的新西兰雄兔来测定由上文描述的未荷电络合物以及荷电络合物流动化的胆固醇。所述动物由法国的 CEGAV 供应,并且分别使用独特的耳纹身进行识别。将兔分别圈养在 Avogadro (法国) 动物设施的单独的笼中。动物的圈养和护理符合指令 86/609/EEC 的标准。Avogadro 动物设施具有协议书号码 B 31 188 01,其由法国兽医署获得。根据一般的惯例以及目前 Avogadro 的标准操作规程 (SOPs) 对所有的动物进行类似的管理并适当关注其健康状况。对设备及动物房适时的进行定期清扫。

[0183] 动物室的条件如下:温度:22±2°C,相对湿度:55±15%并进行 12 小时光/12 小时黑暗的循环。每天记录温度和相对湿度并保留研究的原始数据。每只兔子每天观察一次,记录观察到的任何异常结果,并向实验负责人报告。

[0184] 在研究开始前对动物驯化至少 7 天。以每天为基础随意让动物接受粒状的对照饮食。在整个研究的自始至终随意供水。

[0185] 在施用络合物之前,将动物禁食过夜。恰好在施用络合物之前将动物称重。该络合物以 15mg/kg 的剂量比经静脉内施用,该剂量与 1.5mL/kg 相当。施用的体积基于重量。在施用络合物后大约 6 小时重新开始喂食。所记录的治疗细节包括剂量计算值、施用的剂量、日期以及施用时间。

[0186] 在采集血样之前,将动物禁食过夜。由颈静脉或由耳缘静脉抽取血样。使用安装有针与 EDTA 的注射器由颈静脉抽取血液(在每次取样的时间抽取约 1mL 血液)。采集后立即将血样保存于约 4°C 以避免血样发生变化。将血液标本离心(在约 5°C 下以 3500g 离心 10 分钟)。分离血浆样品并进行等分(至少为 200 μL 的 3 个等份(等份 A、B、C)),然后在约 -80°C 下保存。丢弃剩余的血块。

[0187] 实施例 5 :荷电的脂蛋白络合物使胆固醇流动

[0188] 按上文的描述制备对照脂蛋白络合物(制剂 IIA)或荷电的脂蛋白络合物(制剂 IIB)并将其施用于兔子(15mg 络合物/kg 体重);每组两只兔子。

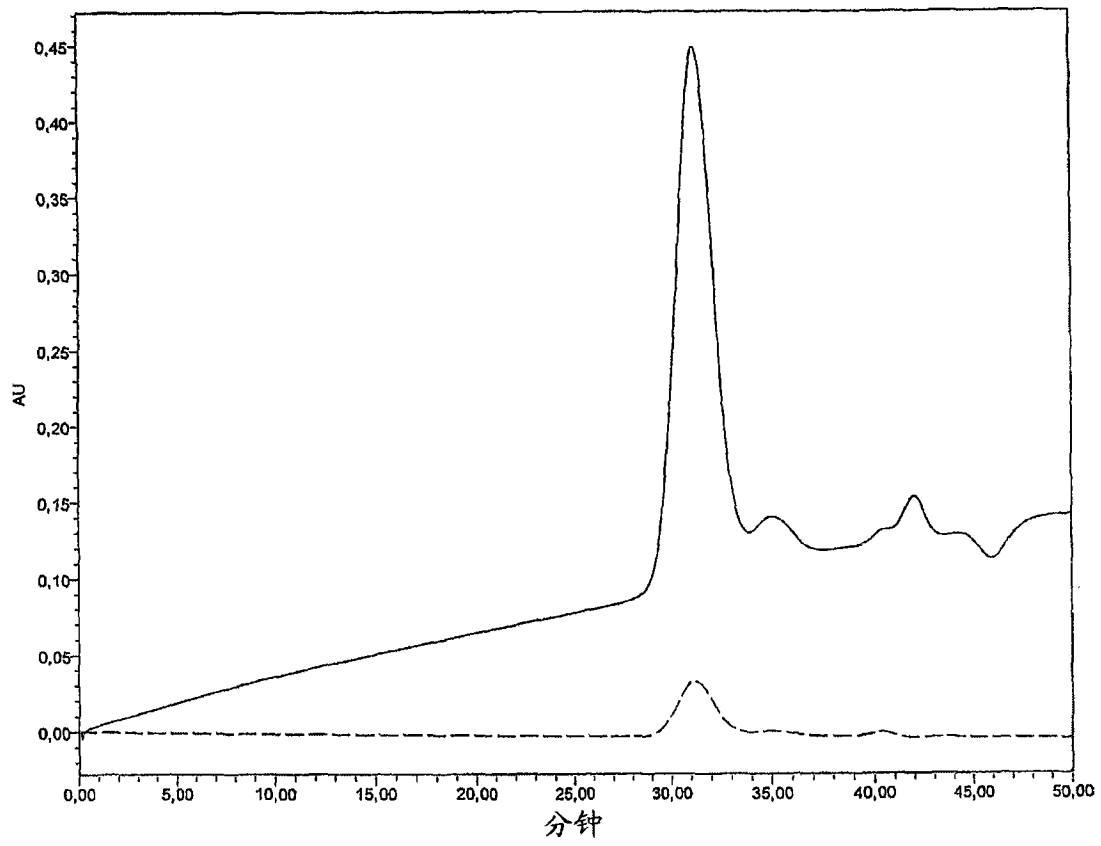
[0189] 在剂量施用前、剂量施用后 5min、15min、30min、1h、2h、3h 和 6h 时取血样(1ml)。根据公开的方法分析血浆样品中的总胆固醇、游离胆固醇以及甘油三酯(参见,如,Usui, S. 等人,2002, J. Lipid Res., 43 :805-14)。通过从胆固醇总含量减去游离的胆固醇含量来计算酯化的胆固醇浓度。图 3 示出每只动物的 HDL 中游离胆固醇结果。图 4 示出包括对照组(组 IIA)和测试组(组 IIB)的两只动物的平均值。

[0190] 如预期的一样,对照的脂蛋白络合物和测试的脂蛋白络合物均使胆固醇流动,其中测试组平均值与对照组平均值的比较表明测试组具有增加的流动化。

[0191] 所有参考文献均通过引用完全结合到本文以用于所有目的,就如同每个单独的文本、专利或专利申请都被具体地、单独地通过引用而被完全结合到本文以用于所有目的。

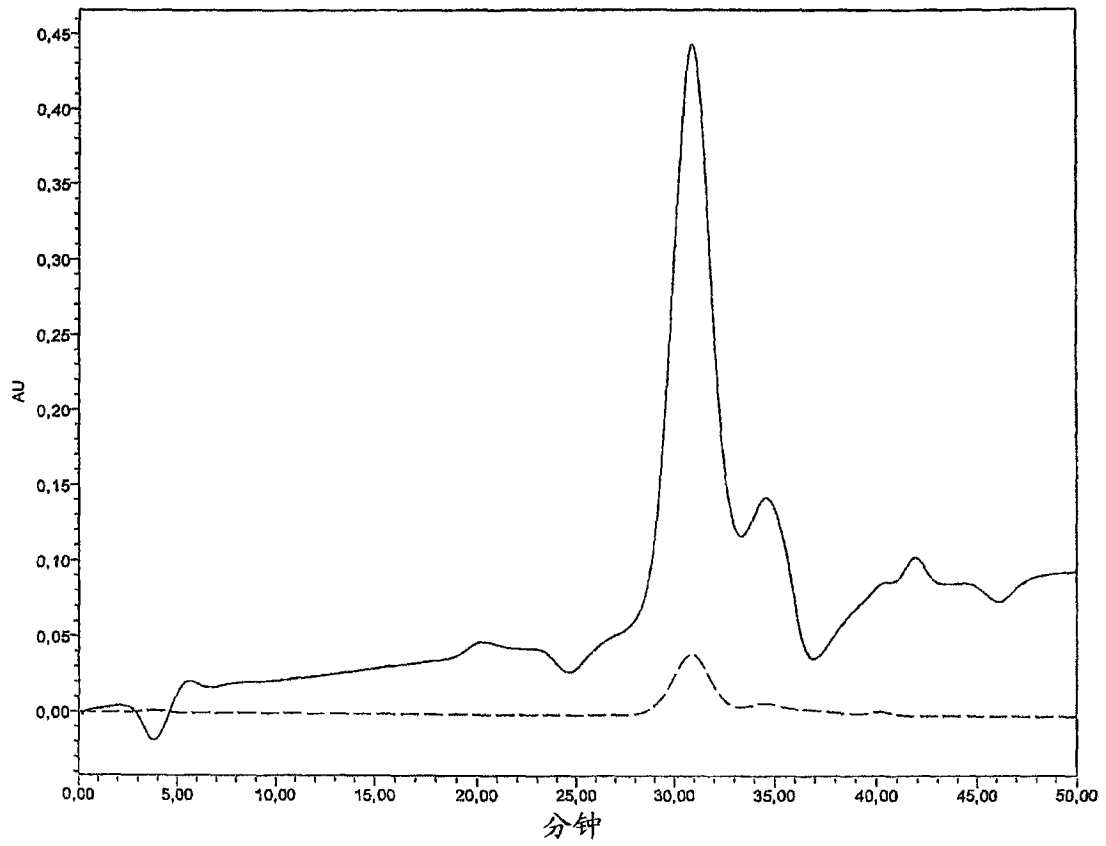
[0192] 任何出版物的引用是其在提交日期之前的公开内容,且不应解释为根据现有发明承认本发明没有使这样的出版物日期提前的权利。

[0193] 对于本领域技术人员显而易见的是,可对本发明作出多种改进和变化而不脱离其实质和范围。所描述的特定实施方案仅通过举例的方式提供,并且本发明不单限于所附权利要求的术语,而且还可以覆盖此类权利要求具有的等价的全部范围。



—— 脂质 (220 nm)  
- - - 蛋白质 (280 nm)

图1



—— 脂质 (220 nm)  
- - - 蛋白质 (280 nm)

图2

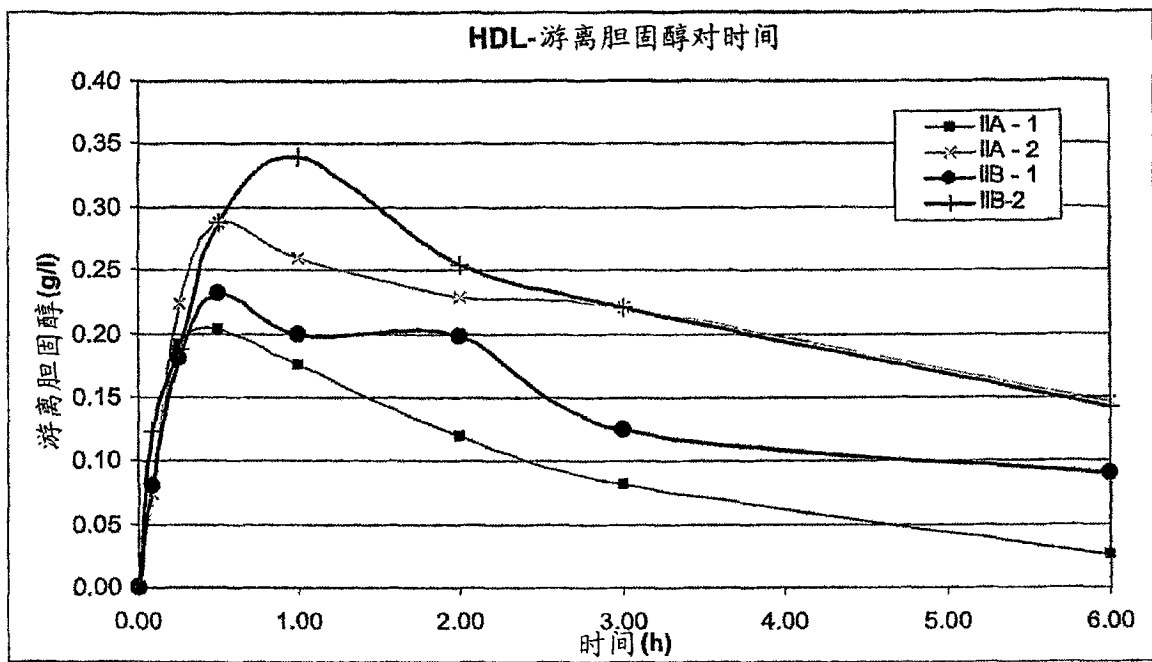


图3



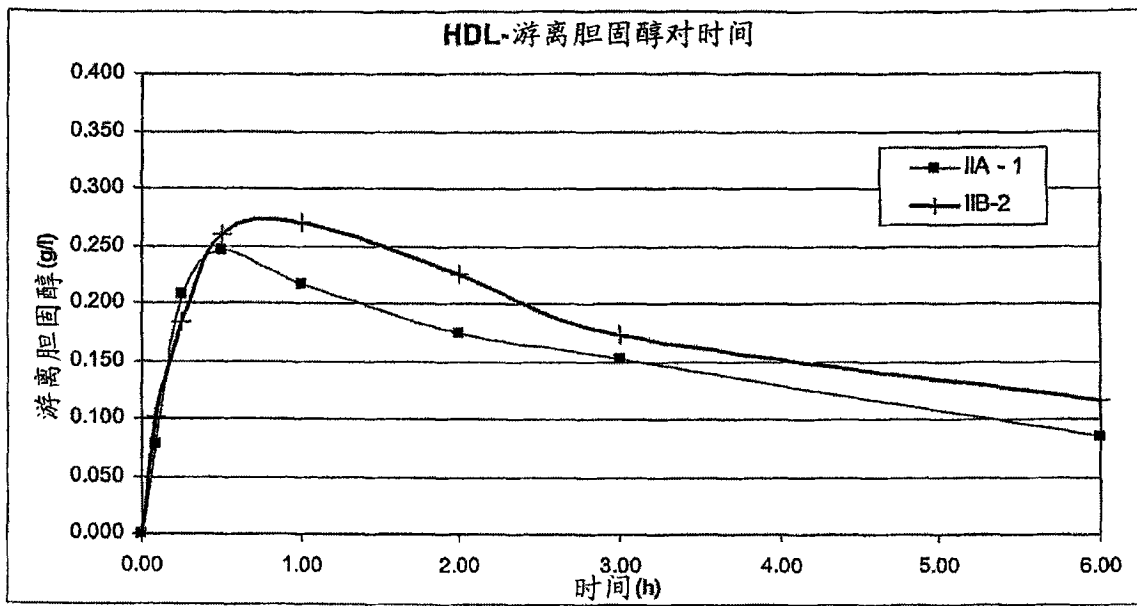


图 4