República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015009748-0 B1

(22) Data do Depósito: 31/10/2013

(45) Data de Concessão: 27/04/2021

(54) Título: FORMULAÇÃO DE HDL RECONSTITUÍDA, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO E SEU USO

(51) Int.Cl.: A61K 38/17; A61P 3/06.

(30) Prioridade Unionista: 02/11/2012 US 61/721,771; 04/02/2013 EP 13153903.3; 10/04/2013 AU 2013205684; 14/03/2013 US 13/803,863.

(73) Titular(es): CSL LIMITED.

(72) Inventor(es): YVONNE VUCICA; GARY LEE WARREN.

(86) Pedido PCT: PCT AU2013001260 de 31/10/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/066943 de 08/05/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/04/2015

(57) Resumo: FORMULAÇÃO DE HDL RECONSTITUÍDA,SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO E SEU USO. A presente invenção refere-se a uma formulação de lipoproteína de alta densidade reconstituída (rHDL) incluindo uma apolipoproteína, um lipídio e um estabilizador de liofilização. Tais formulações possuem toxicidade renal reduzida e boa estabilidade a longo prazo, especialmente em forma liofilizada.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"FORMULAÇÃO DE HDL RECONSTITUÍDA, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO E SEU USO".**

Campo Técnico

[001] A presente invenção refere-se a formulações de lipoproteína de alta densidade reconstituída, e em particular a formulações com estabilidade e propriedades biológicas para uso farmacêutico apropriadas.

Antecedentes

[002] Lipoproteínas de alta densidade (HDLs) formam uma faixa de partículas de lipoproteína encontradas em um soro normal. Partículas de HDL maduras estão presentes na forma de uma estrutura globular contendo proteínas e lipídios. Dentro da camada externa destas partículas estão os lipídios mais polares, fosfolipídios e colesterol livre, todos possuindo grupos carregados orientados para fora, em direção ao ambiente aquoso. Os lipídios mais hidrofóbicos, como, por exemplo, colesterol esterificado e triglicerídios, residem no núcleo da partícula. Partículas de HDL nascentes ou recentemente formados não possuem o lipídio e são de forma discóide. Componentes de proteína estão embebidos na camada externa. O componente de proteína principal é a apolipoproteína I (Apo A-I) com quantidades menores de Apo A-II, Apo A-IV, Apo CIII, Apo D, Apo E e Apo J. Várias outras proteínas residem na partícula de HDL como, por exemplo, lecitina-colesterol acetil transferase, PAF acetilhidrolase e paraoxonase. HDLs são caracterizadas por alta densidade (> 1,063 g/mL) e tamanho pequeno (diâmetro de Stokes = 5 a 17 nm).

[003] Esforços têm sido feitos para desenvolver HDLs artificiais que possam ser infundidos na corrente sanguínea dos pacientes para imitar os efeitos biológicos de HDLs naturalmente ocorrentes. Estas partículas artificiais são geralmente referidas como "HDL reconstituído"

(rHDL), ou às vezes como miméticos de HDL ou partículas de HDL sintéticas. As partículas artificiais contêm componentes das partículas naturais, em particular, Apo A-I e lipídios. Por exemplo, WO 2012/000048 descreve um rHDL incluindo Apo A I, fosfatidilcolina (PC) e uma pequena quantidade de colato de sódio. WO 2012/109162 descreve rHDL incluindo Apo A-I, esfingomelina (SM) e fosfatidilglicerol (por exemplo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosforac-(1-glicerol)] (DPPG)).

[004] É conveniente para as formulações de rHDL serem liofilizadas (secas por congelamento) antes do uso. A liofilização é um método comumente usado para a preparação de fármacos de proteína sólidos. Entretanto, este processo gera uma variedade de tensões de congelamento e secagem como, por exemplo, concentração da proteína solubilizada, formação de cristais de gelo, mudanças no pH, etc. Todas estas tensões podem desnaturar proteínas a vários graus. Logo, estabilizadores são geralmente requeridos em uma formulação de proteínas para proteger a estabilidade de proteína tanto durante os processos de congelamento como os de secagem. A fim de manter a estabilidade de formulações de rHDL durante a liofilização, estabilizadores como açúcares e álcoois de açúcar têm sido usados. Por exemplo, US 5,089,602 divulga lipoproteínas derivadas de plasma que são estabilizadas com 10% de sacarose ou com uma mistura de 10% de sacarose e 5% de manitol. WO 2012/000048 divulga estabilizadores de açúcar e de álcool de açúcar usados em uma concentração de cerca de 65 a 85 g/L de formulação de rHDL (equivalente a cerca de 6,5 a 8,5% p/p). WO 2012/109162 divulga sacarose e manitol como estabilizadores, usados em uma mistura a 4% p/p e 2% p/p respectivamente. Uma investigação na manufatura e estabilidade de prateleira de rHDL foi realizada em Kim et al, Biotechnology and Bioprocess Engineering 16, 785-792 (2011). Aqui,

rHDL com uma razão de Apo A-I:PC de soja de 1:150 não pode ser suficientemente estabilizada com 1 a 5% de sacarose, onde 10% de sacarose foi descrito como ótimo.

[005] As formulações de rHDL desses documentos são intencionadas para terapia de infusão, mas concentrações altas de açúcar em produtos de infusão podem causar ou exacerbar problemas renais. Este é um problema particular na população de paciente alvo para rHDL, pois estes pacientes são geralmente prejudicados renalmente.

[006] Logo, um objetivo da presente invenção foi fornecer formulações de rHDL alternativas ou aprimoradas quando comparado com estas formulações anteriores. Em particular, os inventores procuraram formulações de rHDL estáveis com toxicidade renal reduzida.

[007] Este problema é resolvido pela formulação de acordo com a reivindicação 1. Modalidades adicionalmente preferidas são definidas nas reivindicações dependentes.

[008] Surpreendentemente, foi descoberto que a formulação de rHDL da reivindicação 1 mostra boa estabilidade em longo prazo. Ao conter menos estabilizador de liofilização que as formulações antigas, a formulação também apresenta menos risco de toxicidade renal. A concentração de estabilizador de liofilização baixa pode também permitir que o rHDL desempenhe melhor em exames funcionais da função de rHDL. Os inventores também descobriram que aminoácidos, particularmente prolina, são estabilizadores de liofilização úteis para formulações de rHDL.

Sumário da Invenção

[009] A invenção fornece uma formulação de rHDL incluindo uma apolipoproteína, um lipídio e um estabilizador de liofilização, onde a razão entre a apolipoproteína e o lipídio é de cerca de 1:20 a cerca de

1:120 (mol:mol).

[0010] Preferivelmente, o estabilizador de liofilização está presente em uma concentração de cerca de 1,0% a cerca de 6,0% (p/p de formulação de rHDL), por exemplo, de 1,0, 1,1, 1,2 ou 1,3 a 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, ou 6,0. Esta baixa quantidade de estabilizador de liofilização pode reduzir o risco de toxicidade renal. Também é particularmente apropriado para pacientes receber agentes de contraste durante terapia de síndrome coronária aguda (ACS), já que estes agentes podem competir com o estabilizador de liofilização por espaço nos rins. Em uma modalidade preferida, o agente de liofilização está presente em uma concentração de cerca de 1,0% a menos de 6,0%, por exemplo, de cerca de 1,0% a 5,9%. Preferivelmente, o estabilizador de liofilização está presente em uma concentração de cerca de 3,0 a menos de 6,0%, por exemplo, de cerca de 3,0 a 5,9%. Mais preferivelmente, o estabilizador de liofilização está presente em uma concentração de cerca de 4,0 a 5,5%, particularmente de 4,3 a 5,3%, mais particularmente de 4,3 a 5,0%, e o mais preferivelmente de 4,6 a 4,8% (p/p). Tais formulações mostram boa estabilidade e baixa toxicidade renal.

[0011] Alternativamente, ou adicionalmente, é preferido que a razão entre a apolipoproteína e o estabilizador de liofilização seja de cerca de 1:1 a cerca de 1:3 (p:p). Em particular, a razão entre a apolipoproteína e o estabilizador de liofilização é de cerca de 1:1 a cerca de 1:2,4 (p:p), por exemplo, menos de 1:2 (p:p). Os inventores descobriram que estas formulações permanecem estáveis mostrando pouca ou nenhuma mudança na distribuição de tamanho de amostras liofilizadas, até mesmo após o armazenamento por vários meses. Entretanto, em algumas modalidades, a razão entre a apolipoproteína e o estabilizador de liofilização pode ser menor que esta, por exemplo, de cerca de 1:1 a cerca de 1:7, e, em particular de cerca de 1:1 a

cerca de 1:5 (p:p).

[0012] A invenção também fornece uma formulação de rHDL incluindo uma apolipoproteína, um lipídio e um estabilizador de liofilização, onde o estabilizador de liofilização inclui um aminoácido. Preferivelmente, o aminoácido é prolina. Os inventores descobriram que aminoácidos são bons estabilizadores de liofilização para formulações de rHDL, particularmente quando em uma mistura com baixas quantidades de outros estabilizantes.

[0013] A invenção também fornece a formulação de rHDL mencionada acima para a prevenção ou tratamento de uma doença, distúrbio ou condição em um ser humano. Apropriadamente, a doença, distúrbio ou condição é responsiva à administração profilática ou terapêutica da formulação de rHDL.

Descrição Detalhada da Invenção

[0014] Dentro do contexto da presente invenção, o termo "formulação de HDL reconstituída" significa que qualquer lipoproteína artificialmente produzida ou composição que é funcionalmente similar a, análoga a, corresponde a, ou imita a lipoproteína de alta densidade (HDL), tipicamente presente em plasma sanguíneo. Formulações de rHDL incluem dentro de seu escopo "miméticos de HDL" e "partículas de HDL sintéticas".

[0015] Dentro do contexto da presente invenção, o termo "estabilizador de liofilização" significa uma substância que estabiliza a proteína durante a liofilização. Tais estabilizadores de liofilização são bem-conhecidos na técnica e são revisados em, por exemplo, Wang (2000) International Journal of Pharmaceuticals 203:1-60. Um estabilizador de liofilização preferido para uso na invenção inclui um açúcar, um álcool de açúcar, um aminoácido, ou uma mistura destes. Por exemplo, os inventores descobriram que dissacarídios como, por exemplo, sacarose são açúcares particularmente apropriados para uso

como o estabilizador de liofilização. Outros dissacarídios que podem ser usados incluem frutose, trealose, maltose e lactose. Adicionalmente a dissacarídios, trissacarídios como rafinose e maltotriose podem ser usados. Oligossacarídios maiores podem também ser apropriados, por exemplo, maltopentaose, maltohexaose e maltoheptaose. Alternativamente, monossacarídios como glicose, manose e galactose podem ser usados. Estes mono-, di-, tri- e oligossacarídios maiores podem ser usados ou sozinhos ou em combinação uns com os outros. Como notado acima, estabilizadores de liofilização que são álcoois de açúcar podem também ser usados. Estes álcoois de açúcar podem também ser usados ou sozinhos ou em combinação. Um álcool de açúcar particular para uso na invenção é manitol. Outros álcoois de açúcar que podem ser usados incluem inositol, xilitol, galactitol, e sorbitol. Outros polióis como glicerol podem também ser apropriados. Aminoácidos que podem ser usados como estabilizadores de liofilização incluem prolina, glicina, serina, alanina, e lisina. Aminoácidos modificados podem também ser usados, por exemplo, 4-hidroxiprolina, L-serina, glutamato de sódio, sacrosina, e ácido γ-aminobutírico. Os inventores descobriram que prolina é um aminoácido particularmente apropriado para uso como um estabilizador de liofilização.

[0016] Em modalidades particulares, o estabilizador de liofilização inclui uma mistura de um açúcar e um álcool de açúcar. Por exemplo, uma mistura de sacarose e manitol pode ser usada. O açúcar e o álcool de açúcar podem ser misturados em qualquer razão apropriada, por exemplo, de cerca de 1:1 (p:p) a cerca de 3:1 (p:p), e em particular de cerca de 2:1 (p:p). Razões menores que 2:1 são particularmente visadas, por exemplo, menor que 3:2. Tipicamente, a razão é maior que 1:5, por exemplo, maiores que 1:2 (p:p). Em algumas modalidades, a formulação inclui menos de 4% de sacarose e 2% de

manitol. Em algumas modalidades, a formulação inclui menos que 4% de sacarose e menos que 2% de manitol, por exemplo, cerca de 1,0% a 3,9% e cerca de 1,0% a 1,9% (p/p) de manitol.

[0017] Em modalidades particulares, o estabilizador de liofilização inclui uma mistura de um açúcar e um aminoácido. Por exemplo, uma mistura de sacarose e prolina pode ser usada. O açúcar e o aminoácido podem ser misturadas em qualquer razão apropriada, por exemplo, de cerca de 1:1 a cerca de 3:1 (p:p), e em particular cerca de 2:1 (p:p). Razões menores que 2:1 são particularmente visadas, por exemplo, menos que cerca de 3:2 (p:p). Tipicamente, a razão é maior que 1:5, por exemplo, maior que 1:2 (p:p). Preferivelmente, o aminoácido está presente em uma concentração de cerca de 1,0 a cerca de 2,5%, por exemplo, de 1,0, 1,2, ou 1,3 a 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, ou 2,5% (p/p da formulação de rHDL). Em algumas modalidades, a formulação inclui 1,0% de sacarose e 2,2% de prolina, ou 3,0% de sacarose e 1,5% de prolina, ou 4% de sacarose e 1,2% de prolina. O aminoácido pode ser adicionado ao açúcar para manter uma solução isotônica. Soluções com uma osmolalidade maior que 350 mosmol/kg são tipicamente hipertônicas, enquanto aquelas de menos de 250 mosmol/kg são tipicamente hipotônicas. Soluções com uma osmolalidade de 250 mosmol/kg a 350 mosmol/kg são tipicamente isotônicas.

[0018] Em modalidades particulares, o estabilizador de liofilização inclui uma mistura de um álcool de açúcar e um aminoácido. O estabilizador de liofilização pode incluir uma mistura de um açúcar, um álcool de açúcar, e um aminoácido.

[0019] A apolipoproteína pode ser qualquer apolipoproteína que seja um componente ativo biologicamente funcional de um HDC naturalmente ocorrente ou de uma lipoproteína de alta densidade reconstituída/rHDL. Tipicamente, a apolipoproteína é uma

apolipoproteína ou derivada de plasma ou recombinante como, por exemplo, Apo A-1, Apo A-II, Apo A-V, pro-Apo A-I ou uma variante como, por exemplo, Apo A-I Milano. Preferivelmente, a apolipoproteína é Apo A-I. Mais preferivelmente, a Apo A-I é ou recombinantemente derivada incluindo uma sequência do tipo selvagem ou a sequência Milano ou alternativamente é purificada de plasma humano. A apolipoproteína pode estar na forma de um fragmento biologicamente ativo de apolipoproteína. Tais fragmentos podem ser naturalmente ocorrentes, quimicamente sintetizados ou recombinantes. Por meio de exemplo apenas, um fragmento biologicamente ativo de Apo A-I preferivelmente possui pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% a 100% ou até mesmo mais que 100% da atividade estimuladora de lecitina-colesterol acetiltransferase (LCAT) de Apo A-I.

[0020] Na presente invenção, a razão molar de apolipoproteína:lipídio é de tipicamente cerca de 1:20 a cerca de 1:120, e preferivelmente de cerca de 1:20 a cerca de 1:100, mais preferivelmente de cerca de 1:20 a cerca de 1:75 (mol:mol), e em particular de 1:45 a 1:65. Esta faixa inclui razões molares como, por exemplo, cerca de 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95 e 1:100. Uma razão particularmente vantajosa de apolipoproteína:lipídio é de 1:40 a 1:65 (mol:mol). Isto garante que a formulação de rHDL de acordo com a presente invenção inclua um lipídio a um nível que não cause toxicidade de fígado.

[0021] Em outras modalidades, a razão molar de apoloçipoproteína:lipídio pode estar em uma faixa de cerca de 1:80 a cerca de 1:120. Por exemplo, a razão pode ser de 1:100 a 1:115, ou de 1:105 a 1:110. Nessas modalidades, a razão molar pode ser, por exemplo, de 1:80 a 1:90, de 1:90 a 1:100, ou de 1:100 a 1:110. Em uma modalidade preferida, a formulação de rHDL de acordo com a presente invenção inclui adicionalmente um detergente a fim de

estabilizar adicionalmente as partículas de rHDL. O detergente pode ser qualquer detergente iônico (por exemplo, catiônico, aniônico, zwitteriônico) ou detergente não iônico, inclusive os de ácidos de bile e sais destes, apropriados para uso em formulações de rHDL. Detergentes iônicos podem incluir ácidos de bile e sais destes, polissorbatos (por exemplo, PS80), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propano-sulfonato (CAPS), 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-2-hidróxi-1-propanossulfonato (CAPSO), cetil trimetil-brometo de amônio, lauroilsarcosina, terc-octil fenil ácido propanossulfônico e 4'-amino-7-benzamido-ácido taurocólico.

[0022] Ácidos de bile são tipicamente esteroides diidroxilados ou trioxilados com 24 carbonos, incluindo ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico ou ácido ursodesoxicólico. Preferivelmente, o detergente é um sal de bile como, por exemplo, um sal de colato, desoxicolato, quenodesoxicolato ou ursodesoxicolato. Um detergente particularmente preferido é colato de sódio. A concentração do detergente, em particular do colato de sódio, é de preferivelmente 0,3 a 1,5 mg/mL. A concentração de ácido de bile pode ser determinada usando vários métodos incluindo exame colorimétrico (ver, por exemplo, em Lerch et. al., 1996, Vox Sang. 71:155-164; Sharma, 2012, Int. J. Pharm Biomed. 3(2), 28-34; e o kit de testes Gallsäuren e Gallsäuren-Stoppreagens (Trinity Biotech)). Em algumas modalidades da invenção, a formulação de rHDL inclui níveis de colato de 0,5 a 1,5 mg/mL como determinado por exame colorimétrico e um estabilizador de liofilização em uma concentração de cerca de 4,0 a 5,5%, particularmente de 4,3 a 5,3%, mais particularmente de 4,3 a 5,0%, e o mais preferivelmente de 4,6 a 4,8% (p/p). Em particular modalidades particulares, o estabilizador de liofilização é sacarose. Tais formulações mostram boa estabilidade e baixa toxicidade renal e de fígado.

[0023] A razão entre a apolipoproteína e o estabilizador de liofilização é geralmente ajustada tal que esta razão seja de cerca de 1:1 a cerca de 1:7 (p:p). Mais preferivelmente, a razão é de cerca de 1:1 a cerca de 1:3, em particular, cerca de 1:1,1 a cerca de 1:2. Em modalidades específicas, as formulações de rHDL, logo, possuem razões de 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9 ou 1:2 (p:p). É, entretanto, contemplado que para modalidades particulares onde há baixas quantidades de proteína (por exemplo, <20 mg/mL), a razão entre a apolipoproteína e o estabilizador de liofilização pode ser estendida até cerca de 1:7 (p:p), por exemplo até cerca de 1:4,5 (p:p).

[0024] Apropriadamente, a apolipoproteína está em uma concentração de cerca de 5 a cerca de 50 mg/mL. Isto inclui 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 mg/mL e quaisquer faixas entre estas quantidades. A apolipoproteína está, preferivelmente, em uma concentração de cerca de 25 a 45 mg/mL. Em outras modalidades, a apolipoproteína pode estar em uma concentração de cerca de 5 a 20 mg/mL, por exemplo, em cerca de 8 a 12 mg/mL.

[0025] O lipídio pode ser qualquer lipídio que seja um componente funcional biologicamente ativo de HDL naturalmente ocorrente ou de lipoproteína de alta densidade reconstituída (rHDL). Tais lipídios incluem fosfolipídios, colesterol, colesterol-ésteres, ácidos graxos e/ou triglicerídios. Preferivelmente, o lipídio é pelo menos um fosfolipídio carregado ou não carregado ou uma mistura destes.

[0026] Em uma modalidade preferida, a formulação de rHDL de acordo com a presente invenção inclui uma combinação de um detergente e um fosfolipídio não carregado. Em uma modalidade preferida alternativa, a formulação de rHDL inclui um fosfolipídio carregado, mas sem detergente algum. Em uma modalidade preferida adicional, a formulação de rHDL inclui lipídios carregados e não

carregados, bem como um detergente.

[0027] Como usado aqui, "fosfolipídios não carregados", também chamados de fosfolipídios naturais, são fosfolipídios que possuem uma carga líquida de cerca de zero no pH fisiológico. Fosfolipídios não carregados podem ser zwitteríons, embora outros tipos de fosfolipídios neutros líquidos são conhecidos e podem ser usados. "Fosfolipídios carregados" são fosfolipídios que têm uma carga líquida no pH fisiológico. O fosfolipídio carregado pode incluir um único tipo de fosfolipídio carregado, ou uma mistura de dois ou mais fosfolipídios similar e tipicamente carregados diferentes. Em alguns exemplos, os fosfolipídios carregados são glicofosfolipídios negativamente carregados.

[0028] A formulação de acordo com a presente invenção pode ainda incluir uma mistura de diferentes lipídios, como, por exemplo, uma mistura de vários lipídios não carregados ou de um lipídio não carregado e um lipídio carregado. Exemplos de fosfolipídios incluem fosfatidilcolina (lecitina), ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina (cefalina), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) e esfingomielina (SM) ou derivados sintéticos ou naturais destes. Derivados naturais incluem fosfatidilcolina de ovo, fosfatidilglicerol de ovo, fosfatidilcolina de soja, fosfatidilcolina de soja hidrogenada, soi bean fosfatidilglicerol, fosfatidilserina de cérebro, esfingolipídios, esfingomielina de cérebro, esfingomielina de ovo, galactocerebrosídio, gangliosídios, cerebrosídios, cefalina, cardiolipina e dicetilfospato.

[0029] Derivados sintéticos incluem dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), didecanoilfosfatidilcolina (DDPC), dierucoilfosfatidilcolina (DEPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DLPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (PMPC), palmitoilestearoilfosfatidilcolina (PSPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), dilauroilfosfatidilglicerol (DLPG), distearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), palmitoiloleoilfosfatidilglicerol

(POPG), ácido dimirestolifosfatídico (DMPA), ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA), ácido diestearoilfosfatídico (DSPA), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), dioleoilfosfatidilserina (DOPS), dipalmitoilesfingomielina (DPSM) e diestearoilesfingomielina (DSSM). O fosfolipídio pode também ser um derivado ou análogo de qualquer um dos fosfolipídios acima. Os melhores resultados puderam ser obtidos com fosfatidilcolina. Em outra modalidade, os lipídios na formulação de acordo com a presente invenção são esfingomielina e um fosfolipídio negativamente carregado, como, por exemplo, fosfatidilglicerol (por exemplo, DPPG). Uma mistura de esfinogomielina e fosfatidilglicerol (particularmente DPPG) é especialmente visada para uso na invenção. Nessas modalidades, a esfinogomielina e o fosfatidilglicerol podem estar presentes em qualquer razão apropriada, por exemplo, de 90:10 a 99:1 (p:p), tipicamente de 95:5 a 98:2 e mais tipicamente 97:3.

[0030] A formulação de acordo com a presente invenção tipicamente tem uma concentração de estabilizador de liofilização de cerca de 1,0% a cerca de 6,0%, por exemplo, de 1,0, 1,1, 1,2 ou 1,3% a 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, ou 6,0%, preferivelmente de cerca de 1,0% a menos de 6,0%, por exemplo, de cerca de 1,0% a 5,9% (p/p da formulação de rHDL). Preferivelmente de cerca de 4,0% a 5,5%, preferivelmente de 4,3 a 5,3%, preferivelmente de 4,3 a 5,0%, e o mais preferivelmente de 4,6 a 4,8% (p/p) e em tal formulação, a razão entre a apolipoproteína e o lipídio é preferivelmente de cerca de 1:20 a cerca de 1:75, mais preferivelmente de cerca de 1:45 a cerca de 1:65 (mol:mol). O estabilizador de liofilização é preferivelmente um açúcar (por exemplo, sacarose), opcionalmente em combinação com um álcool de açúcar como, manitol ou sorbitol, ou um aminoácido como, prolina.

[0031] Em uma modalidade preferida, a formulação de rHDL de acordo com a presente invenção possui um pH na faixa de 6 a 8, preferivelmente dentro da faixa de 7 a 8. Ainda mais preferivelmente, o pH está na faixa de 7,3 a 7,7.

[0032] Em uma modalidade preferida da presente invenção, a formulação é liofilizada. Devido à presença do estabilizador de liofilização, preferivelmente de sacarose, sacarose e manitol, ou sacarose e prolina, em combinação com uma razão de apolipoproteína:lipídio, a liofilização gera um pó estável possuindo uma longa vida de prateleira. Este pó pode ser armazenado, usado diretamente ou após armazenamento como um pó ou usado após reidratação para formar a formulação de lipoproteína de alta densidade reconstituída.

[0033] A invenção pode ser usada para a produção em grande escala de lipoproteína de alta densidade reconstituída. O produto liofilizado pode ser preparado para preparações a granel ou, alternativamente, a solução de proteína/lipídio misturada pode ser repartida em recipientes menores (por exemplo, unidades de dosagem única) antes da liofilização, e tais unidades menores podem ser usadas como formas de dosagem unitárias estéreis. A formulação liofilizada pode ser reconstituída a fim de se obter uma solução ou suspensão do complexo proteína-lipídio, ou seja, a lipoproteína de alta densidade reconstituída. O pó liofilizado é reidratado com uma solução aquosa para um volume apropriado. Soluções aquosas preferidas são de água para injeção (WFI), tampão de fosfato salino ou uma solução salina fisiológica. A mistura pode ser agitada para facilitar a reidratação. Preferivelmente, a etapa de reconstituição é conduzida na temperatura ambiente.

[0034] É bem-conhecido para a pessoa versada na técnica como obter uma solução incluindo o lipídio e a apolipoproteína, como, por

exemplo, descrito em WO 2012/000048.

[0035] Em uma modalidade preferida, a invenção fornece um método de produção de uma formulação de rHDL incluindo a etapa de adição do estabilizador de liofilização à solução incluindo o lipídio e a apolipoproteína até que a concentração de cerca de 1,0% a cerca de 6,0% (p/p da formulação de rHDL) seja alcançada, por exemplo, de 1,0, 1,1, 1,2 ou 1,3 para 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, ou 6,0. Em uma modalidade preferida, o estabilizador de liofilização é adicionado até que uma concentração de cerca de 1,0% a menos de 6,0%, por exemplo, de cerca de 1,0% a 5,9% seja alcançada. Preferivelmente, o estabilizador de liofilização é adicionado até que uma concentração de cerca de 3,0 a menos de 6,0%, por exemplo, de cerca de 3,0 a 5,9% seja alcançada.

[0036] Mais preferivelmente, o estabilizador de liofilização é adicionado até que uma concentração de cerca de 4,0 a 5,5%, particularmente de 4,3 a 5,3%, mais particularmente de 4,3 a 5,0% e o mais preferivelmente de 4,6 a 4,8% (p/p) é alcançada. A solução pode ainda conter um estabilizador.

[0037] Em modalidades preferidas, a solução adicionalmente inclui um detergente como, por exemplo, colato de sódio. Em uma modalidade preferida, a formulação de rHDL é manufaturada pela combinação de Apo A-I purificado de plasma, com fosfatidilcolina (PC) na presença de colato de sódio e sacarose a uma concentração de cerca de 1,0% a cerca de 6,0%, preferivelmente de cerca de 1,0% a menos que 6,0% p/p para produzir partículas discóides associadas não covalentemente (PM de aproximadamente 144 kDa).

[0038] Em modalidades particulares, a formulação de rHDL é composta de um Apo A-I (recombinante ou purificada de plasma) e fosfatidilcolina estabilizada por colato e sacarose em uma concentração de cerca de 1,0% a cerca de 6,0% p/p, preferivelmente

de cerca de 1,0% a menos de 6,0%. Em modalidades particulares, os níveis de colato são de cerca de 0,5 a cerca de 1,5 mg/mL. Preferivelmente, o Apo A-I recombinante inclui ou uma sequência de tipo selvagem ou a sequência Milano (que quando expressa forma dímeros).

[0039] A formulação de rHDL liofilizada da presente invenção pode ser formada usando qualquer método de liofilização conhecido na técnica, incluindo, mas não limitado a, secagem por congelamento, ou seja, a solução de apolipoproteína/contendo lipídio é sujeita a congelamento seguido de evaporação a pressão reduzida.

[0040] As formulações de rHDL liofilizadas que são fornecidas podem reter substancialmente suas características de estabilidade originais por pelo menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 ou mais meses. Por exemplo, formulações de rHDL liofilizadas armazenadas em 2-8 ºC ou 25 ºC podem tipicamente reter substancialmente a mesma distribuição de tamanho molecular como medido por HPLC-SEC quando armazenadas por 6 meses ou mais. Modalidades particulares da formulação de rHDL podem ser estáveis e apropriadas para uso farmacêutico comercial por pelo menos 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses ou até mesmo mais quando armazenadas a 2-8 ºC e/ou na temperatura ambiente.

[0041] A formulação de rHDL de acordo com a presente invenção pode ser usada na prevenção ou tratamento de uma doença, distúrbio ou condição em um ser humano. Apropriadamente, a doença, distúrbio ou condição é responsiva à administração profilática ou terapêutica da formação de rHDL de acordo com a presente invenção. Exemplos de tais doenças, desordens ou condições incluem ateroesclerose; doenças cardiovasculares (por exemplo, síndrome coronária aguda (ACS) como, por exemplo, angina pectoris e infarto do miocárdio); ou doenças, desordens ou condições como, por exemplo, diabetes que

sejam predispostas a ACS; hipercolesteromia (por exemplo, colesterol de soro elevada ou colesterol de LDL elevado), e hipocolesterolemia resultando de níveis reduzidos de lipoproteína de alta densidade (HDL), como, por exemplo, sendo sintomática à doença de Tangier.

[0042] Formulações de rHDL de acordo com a presente invenção podem ser administradas por qualquer rota de administração conhecida na técnica. Preferivelmente, as formulações de rHDL são administradas parenteralmente como, por exemplo, por infusão intravenosa (IV) ou por injeção. Em modalidades preferidas, a formulação de rHDL inclui Apo A-I (recombinante ou purificado de plasma) que foi reconstruída para formar partículas apropriadas para infusão IV.

[0043] A dosagem administrada da formulação de rHDL pode estar na faixa de cerca de 1 a cerca de 120 mg/kg de peso corporal. Preferivelmente, a dosagem está na faixa de cerca de 5 a cerca de 80 mg/kg incluindo dosagens de 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, e 70 mg/kg. Alternativamente, a entrega pode ser alcançada por dosagens fixas ficas de rHDL ou seja, em uma quantidade independente de peso corporal do paciente. Dosagens fixas preferidas incluem 0,1-15 g, 0,5-12 g, 1-10 g, 2-9 g, 3-8 g, 4-7 g ou 5-6 g de apolipoproteína. Exemplos não limitantes de dosagens fixas específicas incluem 0,25 g, 0,5 g, 1,0 g, 1,7 g, 2,0 g, 3,4 g, 4,0 g, 5,1 g, 6,0 g, 6,8 g e 8,0 g de apolipoproteína. De acordo com isto, um frasco preferivelmente inclui a formulação de rHDL liofilizada com um conteúdo de proteína de 0,25 g, 0,5 g, 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 8 ou 10 g por frasco. Mais preferivelmente, o conteúdo de proteína é ou 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, ou 10 g por frasco.

[0044] A invenção também fornece um kit de apolipoproteína incluindo uma ou mais dosagens de unidade da formulação de

apolipoproteína divulgada aqui e um ou mais de outros componentes de kit.

[0045] Apropriadamente, o kit é para o tratamento profilático ou terapêutico de uma doença, distúrbio ou condição em um ser humano, como descrito aqui antes.

[0046] Exemplos não limitantes de um ou mais de outros componentes de kit incluem instruções para uso; frascos, recipientes ou outros vasos de armazenamento contendo cada uma das doses de unidade; dispositivos para entrega como, por exemplo, agulhas, catéteres, seringas, tubos e similares; e/ou embalagem apropriada para armazenamento e/ou transporte seguro e conveniente do kit. Preferivelmente, as instruções para uso estão na etiqueta ou inseridas na embalagem, onde a etiqueta ou inserção na embalagem indica que a formulação de apolipoproteína pode ser usada para tratar uma doença ou condição como, por exemplo, doença cardiovascular por administração de uma quantidade de dose fixa a um sujeito ser humano em necessidade desta.

[0047] Uma "inserção em pacote" refere-se a instruções inclusas nas embalagens comerciais das formulações de apolipoproteína que contêm informação sobre as indicações, uso, dosagem, administração, contraindicações e/ou avisos a respeito do uso de tais formações de aplipoproteína.

[0048] Para os propósitos daqui, um "frasco" refere-se a um recipiente que contenha uma formulação de apolipoproteína. O frasco pode ser selado por uma tampa perfurável por seringa. Geralmente, o frasco é formado de um material de vidro. A formulação de apolipoproteína no frasco pode estar em vários estados, incluindo líquido, liofilizado, congelado, etc. A formulação de apolipoproteína de dosagem fixa é preferivelmente estável, enquanto que a turbidez é uma medida principal. Um nível de turbidez abaixo de cerca de 5, 10,

15, 20, ou 30 NTU pode ser geralmente considerado de uma formulação de apolipoproteína de dosagem estável. Medidas de turbidez podem ser tomadas por incubação das formulações de apolipoproteína por períodos de tempo como, por exemplo, 0 horas, 2 horas, 4horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 72 horas, 7 dias e 14 dias em temperaturas de armazenamento como, por exemplo, temperatura ambiente ou de 2 a 8ºC. Preferivelmente, a formulação de apolipoproteína é considerada como sendo estável como um líquido quando armazenada por 14 dias na temperatura ambiente e exibe uma turbidez de menos de cerca de 15 NTU.

[0049] O kit pode facilitar a administração da formulação de apolipoproteína por um profissional de saúde ou por auto-administração por um paciente ou cuidador.

[0050] Como usado aqui, o termo "incluindo" engloba "composto de" bem como "consistindo em", por exemplo, uma formulação ou compoente de uma formulação que é descrito como "incluindo" X pode consistir exclusivamente de X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

[0051] O termo "cerca de" em relação ao valor numérico x significa, por exemplo, x ± 10%.

[0052] A palavra "substancialmente" não exclui "completamente", por exemplo, uma composição que está "substancialmente livre" de Y pode estar completamente livre de Y. Onde necessário, a palavra "substancialmente" pode ser omitida da definição da invenção.

[0053] Onde a invenção fornece um processo envolvendo múltiplas etapas sequenciais, a invenção pode também fornecer um processo envolvendo menos que o número total de etapas. As diferentes etapas podem ser realizadas em tempos bem diferentes por diferentes pessoas em diferentes lugares (por exemplo, em diferentes países).

[0054] A menos que especificado de outra maneira, um processo incluindo uma etapa de dois ou mais componentes não requer qualquer ordem específica de mistura. Logo, componentes podem ser misturados em qualquer ordem. Onde houver três componentes, então dois componentes podem ser combinados um com o outro, e então a combinação pode ser combinada com o terceiro componente, etc.

[0055] Várias modalidades da invenção são descritas aqui. Será apreciado que as características especificadas em cada modalidade possam ser combinadas com outras características especificadas para fornecer modalidades adicionais. Em particular, modalidades destacadas aqui como sendo apropriadas, típicas ou preferidas podem ser combinadas umas com as outras (exceto quando elas forem mutualmente exclusivas).

Breve Descrição das Figuras

[0056] Figura 1: Distribuição de tamanho molecular de formulações contendo de 5 a 10% p/p de sacarose.

[0057] Figura 2A: Comparação direta de distribuição de tamanho molecular de formulações contendo 4 e 7,5% p/p de sacarose.

[0058] Figura 2B: Distribuição de tamanho molecular de formulações contendo de 1, 2, 3, 4 e 7,5% p/p de sacarose.

[0059] Figura 2C: Distribuição de tamanho molecular de formulações contendo sacarose e prolina e 7,5% de sacarose.

[0060] Figuras 3A e 3B: Atividade de LCAT para formulações de 4 a 10% p/p de sacarose.

[0061] Figura 3C: Atividade de LCAT para formulações contendo de 1, 2, 3, 4 e 7,5% p/p de sacarose.

[0062] Figura 3D: Atividade de LCAT para formulações contendo sacarose e prolina.

[0063] Figuras 4A a 4B: Impacto da concentração de sacarose no efluxo de colesterol.

[0064] Figura 4C: Impacto das formulações contendo sacarose e prolina no efluxo de colesterol.

[0065] Figuras 5A a 5H: Turbidez de formulações com diferentes concentrações de sacarose e formulações contendo sacarose e prolina.

[0066] Figura 6: Fotografia de tortas de lio com diferentes concentrações de sacarose.

[0067] Figura 7: Fotografia de tortas de lio com diferentes concentrações de sacarose e de sacarose e prolina.

Exemplos

Exemplo 1: Preparação das amostras

[0068] Para produzir as amostras para os seguintes experimentos, colato de sódio (New Zealand Pharmaceuticals) foi dissolvido em um tampão (10 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 10 mM de TRIS, pH 8,0) e agitado até o clareamento. Fosfatidilcolina de soja (Phospholipid GmbH) foi adicionado em um volume apropriado do colato e agitado por 16 horas na temperatura ambiente. A solução de Apo-I foi diluída a uma concentração de proteína de 9,0 mg/mL (determinado por OD 280) com 10 mM de NaCl e misturado com um volume apropriado da solução de lipídio para obter uma razão de proteína para lipídio na faixa de 1:45 a 1:65. A mistura foi agitada a 2-8 ºC por 30 minutos a 16 horas. Os miméticos de HDL foram preparados por diálise com colato usando 1% de sacarose como o tampão de diafiltração. O eluído foi concentrado a uma concentração de proteína de 33 a 38 g de proteína/L. Sacarose foi adicionada para se obter a concentração desejada (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6.5%, 7%, 10% p/p). O pH da solução foi ajustado com 0,2 M de NaOH ao pH 7,5 ± 0,1 após o qual WFI (água para injeção) foi adicionada para se obter uma concentração de proteína de 30 mg/mL. As formulações finais foram então filtradas em meio estéril através de um filtro de 0,2 + 0,1 µm e preenchidas em

frascos de vidro de 100 mL a 1,7 g de proteína por frasco e liofilizada.

[0069] Em algumas formulações, prolina foi adicionada na concentração desejada. Prolina mantém uma formulação isotônica.

Exemplo 2: Distribuição de tamanho molecular

[0070] A formação de partículas foi determinada usando HPLC-SEC e examinada por distribuição de tamanho molecular das várias formulações. Cromatografia por exclusão de tamanho (HPLC_SEC) foi realizada em uma coluna Superose 6 HR 10/30 (GE Healthcare) com 140 mmol/L de NaCl, 10 mmol/L de Na-fosfato, 0,02% de NaN3, pH 7,4, com uma vazão de 0,5 mL/min. Amostras de cerca de 90 µg de proteína foram aplicadas, e perfis de eluição foram gravados em 280 nm.

[0071] Pouca diferença foi observada para formulações contendo 5-10% p/p de sacarose na formulação final (Figura 1), indicando que formulações contendo ≥ 5% p/p de sacarose não afetaram a estabilidade da partícula após reconstituição. A Figura 1 mostra um cromatograma completo de (1) controle interno, 2: 5% p/p de sacarose, 3: 6,5% p/p de sacarose, 4: 7,5% p/p de sacarose e 5: 10% p/p de sacarose.

[0072] Em adição a isto, uma comparação direta entre uma formulação de 7,5% p/p de sacarose e uma de 4% p/p de sacarose demonstrou que estas formulações exibem uma distribuição de tamanho molecular similar (Figura 2A).

[0073] As Figuras 2B e 2C mostram os resultados para concentrações de sacarose de 1, 2, 3 e 4% (p/p) e formulações incluindo sacarose e prolina.

[0074] Todas as formulações testadas são estáveis. O conteúdo de sacarose de 4 a 7,5% p/p era ótimo e não afetou a estabilidade de partículas após a reconstrução.

Exemplo 3: Ativação de LCAT

[0075] Uma medida da eficiência das partículas de rHDL em várias formulações foi determinada pela medição da atividade de LCAT. Partículas de HDL são capazes de sequestrar colesterol de placas formadas ao longo de paredes de artérias ou células por interação com o transportador cassete ligante a ATP A1 (ABCA1). Lecitina-colesterol acetiltransferase (LCAT), uma enzima de plasma, converte o colesterol livre em éster de colesterol (uma forma mais hidrofóbica de colesterol), que é então sequestrado para o núcleo da partícula de HDL antes de ser transportado ao fígado para ser metabolizado. Se o conteúdo de sacarose na formulação final afetou a eficiência da partícula de rHDL, a atividade de LCAT diminuiria.

[0076] A esterificação da atividade de lecitina-colesterol acetiltransferase (LCAT) foi examinada como descrito por Stokke e Norum (Scand J Clin Lab Invest. 1971;27(1):21-7). 150 µL de uma reserva de plasma humano (CSL Behring) foram incubados com 10 µL de amostra de rHDL e 150 µL de PBS na presença de 20 µL de [4-14C]colesterol (7,5 µCi/mL) por 1,5 horas a 4ºC. Para iniciar a esterificação do colesterol, metade da mistura de reação foi colocada a 37ºC por 30 minutos enquanto que a outra metade foi adicionalmente incubada a 4ºC por 30 minutos (para determinar o ruído de fundo). Para ambas as amostras, o colesterol e o éster de colesterol são extraídos por extração líquido-líquido em n-hexano. O éster de colesterol foi separado de colesterol não esterificado usando uma coluna de extração em fase sólida (SampliQ Amino, Agilent) e medido por contagem de cintilação. A taxa de contagem da amostra armazenada a 4 ºC é subtraída da taxa de contagem da amostra armazenada a 37 ºC. O mesmo procedimento também é realizado com uma amostra de referência. A atividade de LCAT é expressa como % da amostra de Referência.

[0077] As Figuras 3A e 3B mostram a atividade de LCAT para as

formulações de 4-10% p/p de sacarose. A Figura 3C mostra a atividade de LCAT para formulações de sacarose de 1-4% p/p. Muito pouca diferença é vista na atividade de LCAT quando a sacarose está na faixa de 5-10% p/p na formulação final (Figura 3A), entretanto, uma leve tendência decrescente é evidente quando a sacarose é adicionalmente reduzida para 4% p/p (Figura 3B). A Figura 3D mostra a atividade de LCAT para formulações incluindo sacarose e prolina. Nenhuma tendência na atividade de LCAT é observada para formulações contendo sacarose e prolina. Logo, a eficiência da partícula de HDL nas formulações de sacarose/prolina é mantida.

Exemplo 4: Efluxo de colesterol

[0078] O transporte de colesterol reverso (RCT) é um caminho pelo qual colesterol acumulado é transportado da parede do vaso até o fígado para a excreção. O efluxo de células liberam o colesterol para a Apo A-I pobre em lipídios através do caminho de ABCA1. O exame do efluxo de colesterol mede a capacidade do HDL aceitar colesterol liberado das células. É antecipado que se o conteúdo de sacarose afetou a formação e/ou a integridade de partículas, as diferenças iriam afetar o efluxo de colesterol.

[0079] O efluxo de colesterol de linhagens de célula de macrófago de murina J774 e RAW 264,7 é altamente responsivo ao estímulo de cAMP, o que leva à *upregulation* de ABCA1 (Bortnick *et. al.*,. *J Biol Chem*. 2000;275(37):28634-40. Células de RAW264,7 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). Células foram cultivadas em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementadas com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FCS, Gibco), 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em um incubador com CO_2 umidificado a 37 ºC. Para experimentos de refluxo, células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 0,35 x 10^6 células por poço. No dia

seguinte, as células foram marcadas com [1,2-^{3}H]colesterol (1 µCi/mL, GE) em DMEM suplementado com 5% (v/v) de FCS. Após um período de marcação de 36 horas, células foram lavadas com tampão de fosfato salino (PBS) e então incubado em DMEM contendo 0,2% de albumina de soro bovino livre de ácido graxo na ausência ou presença de 0,3 mM de sal 8-cloro-adenosina-3',5'-monofosfato de sódio cíclico-cAMP (8Br-cAMP) por 16 horas para *up-regular* o ABCA1. Seguindo duas lavagens com PBS, as células foram incubadas com diferentes aceptores de colesterol em meio de DMEM/0,2% de BSA livre de ácido graxo. Após 5-6 h de incubação, placas foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos para remover quaisquer células flutuantes e resíduo celular. A radioatividade em células sobrenadantes foi medida por contagem de cintilação líquida. O [^{3}H]colesterol foi determinado após a extração das células em poços de controle por pelo menos 30 minutos com 0,1 M de Triton X-100. O efluxo de colesterol foi expresso como a porcentagem da radioatividade liberada das células no meio relativo à radioatividade total nas células e no meio. A diferença no efluxo entre o controle e as células estimuladas por 8Br-cAMP foi tomada como uma medida do efluxo dependente de ABCA1.

[0080] As Figuras 4A e 4B mostram que a contaminação de sacarose diminui de 7,5% p/p para 4% p/p, e o efluxo de colesterol aumenta. Nenhuma diferença aparente no efluxo de colesterol foi observada entre as formulações contendo prolina e a formulação de 7,5% de sacarose (Figura 4C).

Exemplo 5: Turbidez

[0081] O termo turbidez é usado para descrever a nebulosidade ou névoa em uma solução. Estritamente, a turbidez surge de múltiplos eventos de espalhamento da luz visível por elementos presentes na solução. Já que a turbidez surge da luz espalhada líquida, ela depende do comprimento do caminho da amostra, concentração de proteína e

tamanho da proteína/agregados/partículas. Dado que todas as formulações de sacarose reduzidas continham a mesma concentração de proteína sob reconstituição e foram medidas com o mesmo tamanho de comprimento, as diferenças em turbidez podem ser atribuídas a diferenças no tamanho e/ou número de proteína/agregados/partículas resultando das várias formulações de sacarose.

[0082] A turbidez foi determinada com um nefelômetro de LED (Hach 2100AN Turbiditimeter, Loveland, CO.) usando formacina como um padrão. Os resultados são dados como espalhamento de luz relativo (NTU).

[0083] As formulações contendo 4-10% p/p de sacarose produzido soluções túrbidas similares sob reconstituição (Figuras 5A e 5B). Concentrações de sacarose de menos de 4% mostraram turbidez aumentada (Figuras 5E e 5G). Baseado na turbidez, concentrações de sacarose de 4% (p/p) e acima são ótimas.

[0084] Aumentos relativos na turbidez de uma solução sob armazenamento são geralmente citados como uma indicação de agregação em biofármacos de proteína. As Figuras 5C, 5D, 5F e 5H mostram que pouco ou nenhum aumento na turbidez é visto sob armazenamento em forma líquida, indicando nesta a estabilidade das partículas.

Exemplo 6: Aparência da torta de lio

[0085] As formulações de sacarose com 4% p/p e 7,5% p/p de sacarose produziram as tortas de lio mais estáveis (Figura 6).

[0086] As formulações de sacarose com 1 a 4% p/p e as formulações contendo sacarose e prolina também produziram tortas de lio estáveis (Figura 7).

Exemplo 7: Estabilidade das formulações de rHDL

[0087] A estabilidade de formulações de rHDL liofilizadas (preparadas conforme o Exemplo 1) foi examinada antes e depois do

armazenamento (protegidas da luz) a 40 ºC por 12 semanas. Parâmetros testados incluiíram pH, turbidez, ativação de LCAT, HPLC-SEC (conteúdo de agregado, % de lipoproteína em pico único e seu tempo de retenção relativo) e efluxo de colesterol (efluxo de C) (Tabelas 1 e 2). Os resultados indicam que as formulações permaneceram estáveis pelo período de armazenagem.

Tabela 1

1385.E009.09-13 / 40°C	**t=0**				
	1% de sacarose	**2% de sacarose**	**3% de sacarose**	**4% de sacarose**	**7.5% de sacarose**
Turbidez	12,4	10,4	8,63	6,87	6,06
Ativação de LCAT	97	102	104	110	111
HPLC - SEC - Agregados	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
HPLC-SEC -Pico de lipoproteína	98,8	99,2	99,5	99,6	99,6
Efluxo de C (efluxo total)	110	95	103	119	102

Continuação

t=12 semanas				
1% de sacarose	**2% de sacarose**	**3% de sacarose**	**4% de sacarose**	**7.5% de sacarose**
13,7	11,1	7,24	5,41	5,16
94	101	100	98	105
<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
99,3	99,7	99,6	99,6	99,6
109	85	114	116	84

Tabela 2

1385.E009.14-16 / 40°C	**t=0**		
	1% de sacarose / 2.2% de prolina	**3% de sacarose / 1.5% de prolina**	**4% de sacarose / 1.2% de prolina**
Ativação de LCAT	8,20	8,48	7,48
HPLC - SEC - Agregados	104	116	109
HPLC-SEC -Pico de lipoproteína	<0,2	<0,2	<0,2
Efluxo de C (efluxo total)	98,6	99,4	99,5
Ativação de LCAT	114	80	97

Continuação

t=12 semanas		
1% de sacarose / 2.2% de prolina	**3% de sacarose / 1.5% de prolina**	**4% de sacarose / 1.2% de prolina**
8,74	6,14	6,12
95	103	99
<0,2	<0,2	<0,2
99,2	99,5	99,7
120	108	99

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação de lipoproteína de alta densidade reconstituída (rHDL) caracterizada pelo fato de que compreende uma apolipoproteína, um lipídio e um estabilizador de liofilização, em que a razão entre a apolipoproteína e o lipídio é de 1:20 a 1:120 (mol:mol) e o estabilizador de liofilização compreende sacarose presente em uma concentração de 1,0% a menos de 6,0% em p/p da formulação de rHDL, e em que o estabilizador de liofilização está presente em uma concentração total de 1,0% a menos de 6,0% em p/p da formulação de rHDL.

2. Formulação de rHDL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a razão entre a apolipoproteína e o estabilizador de liofilização é de 1:1 (p:p) a 1:3 (p:p).

3. Formulação de rHDL, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o estabilizador de liofilização está presente em uma concentração de 4,0 a 5,5% (p/p).

4. Formulação de rHDL, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende adicionalmente um detergente.

5. Formulação de rHDL, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o detergente compreende colato de sódio.

6. Formulação de rHDL, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a razão entre a apolipoproteína e o lipídio é de 1:20 a 1:100 (mol:mol).

7. Formulação de rHDL, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a concentração da apolipoproteína é de 5 a 50 mg/mL.

8. Formulação de rHDL, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a apolipoproteína

compreende apolipoproteína A-I (Apo A-I).

9. Formulação de rHDL, de acordo a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a Apo A-I é selecionada a partir do grupo consistindo de Apo A-I purificada de plasma e Apo A-I recombinante.

10. Formulação de rHDL, de acordo a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a Apo A-I compreende a tipo selvagem ou a sequência Apo A-I de Milano.

11. Formulação de rHDL, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que o lipídio compreende pelo menos um fosfolipídio carregado ou não carregado ou uma mistura destes.

12. Formulação de rHDL, de acordo a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o lipídio compreende uma fosfatidilcolina.

13. Formulação de rHDL, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que a apolipoproteína é Apo A-I purificada de plasma, o lipídio é fosfatidilcolina, o estabilizador de liofilização é sacarose e a formulação compreende adicionalmente detergente de colato de sódio.

14. Formulação de rHDL, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a razão entre a apolipoproteína e o lipídio é de 1:45 a 1:65 (mol:mol); o estabilizador de liofilização está presente em uma concentração de 4,6 a 4,8% (p/p); e o colato de sódio está presente em uma concentração de 0,5 a 1,5 mg/mL.

15. Formulação de rHDL, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pelo fato de que a formulação tem um pH na faixa de 6 a 8.

16. Formulação de rHDL, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que a formulação é

liofilizada.

17. Formulação de rHDL, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que a formulação é adequada para administração parenteral.

18. Formulação de rHDL, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que a formulação é adequada para administração intravenosa.

19. Formulação de rHDL, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a razão entre a apolipoproteína e o estabilizador de liofilização é de 1:1 (p:p) a 1:2,4 (p:p).

20. Formulação de rHDL, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a razão entre a apolipoproteína e o estabilizador de liofilização é de 1:1 (p:p) a menos de 1:2 (p:p).

21. Formulação de rHDL, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o estabilizador de liofilização está presente em uma concentração de 4,3 a 5,3% (p/p).

22. Formulação de rHDL, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que o estabilizador de liofilização está presente em uma concentração de 4,6 a 4,8% (p/p).

23. Método de produção de uma formulação de rHDL, como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende combinar uma apolipoproteína, um lipídio, e um estabilizador de liofilização compreendendo sacarose, tal que a razão entre a apolipoproteína e o lipídio é de 1:20 a 1:120 (mol:mol), e a sacarose está presente em uma concentração de 1,0% a menos de 6,0% (p/p) da formulação, e em que o estabilizador de liofilização está presente em uma concentração total de 1,0% a menos de 6,0% (p/p) da formulação de rHDL.

24. Uso de uma formulação de rHDL, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de

que é na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença, distúrbio ou condição em um ser humano em necessidade da mesma, em que a doença, distúrbio ou condição é selecionada do grupo consistindo de doença cardiovascular, hipercolesterolemia ou hipocolesterolemia.

25. Uso, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a doença, distúrbio ou condição é selecionada do grupo consistindo de síndrome coronária aguda (ACS), ateroesclerose, angina pectoris e infarto do miocárdio.

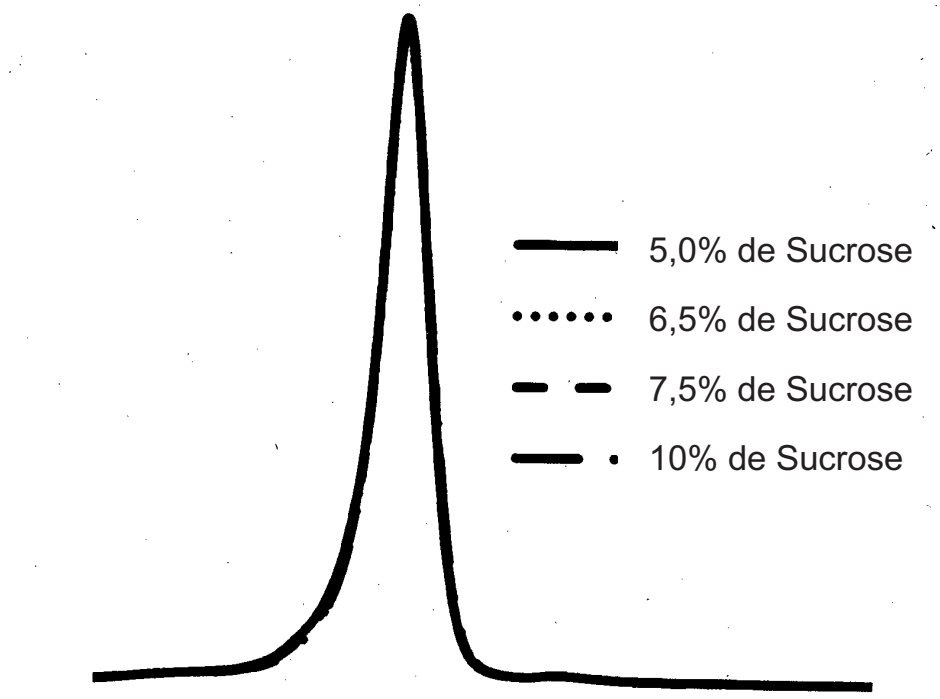


FIG. 1

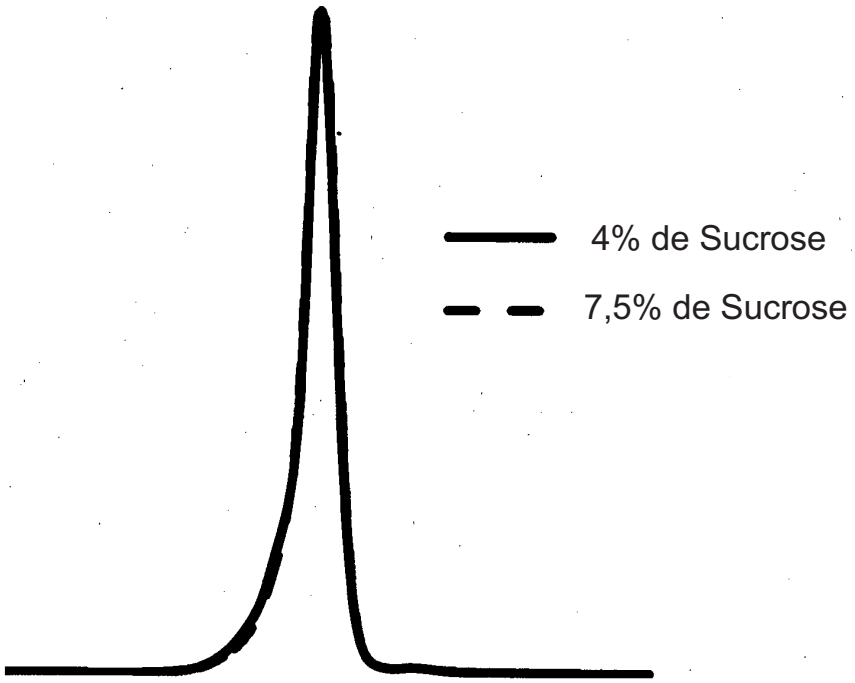


FIG. 2A

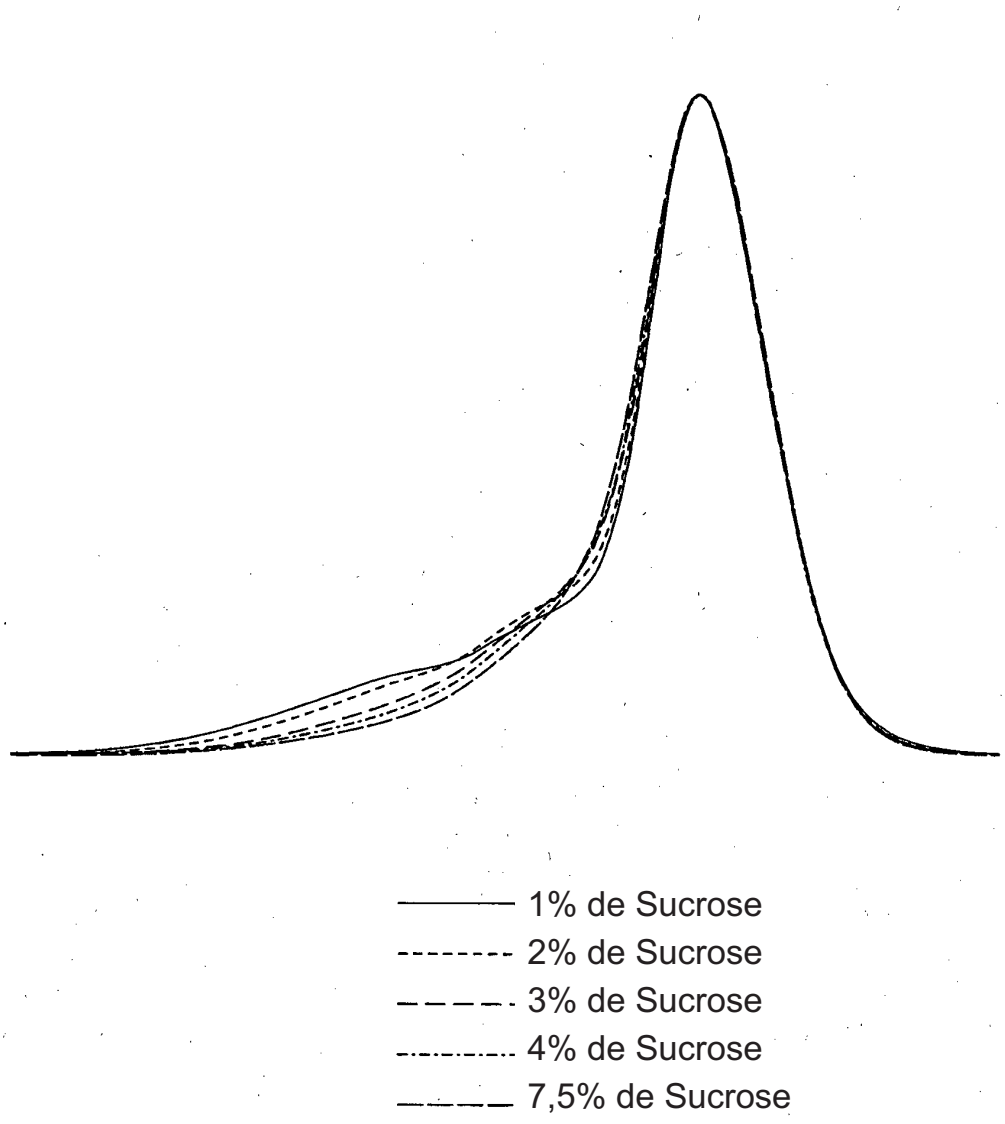
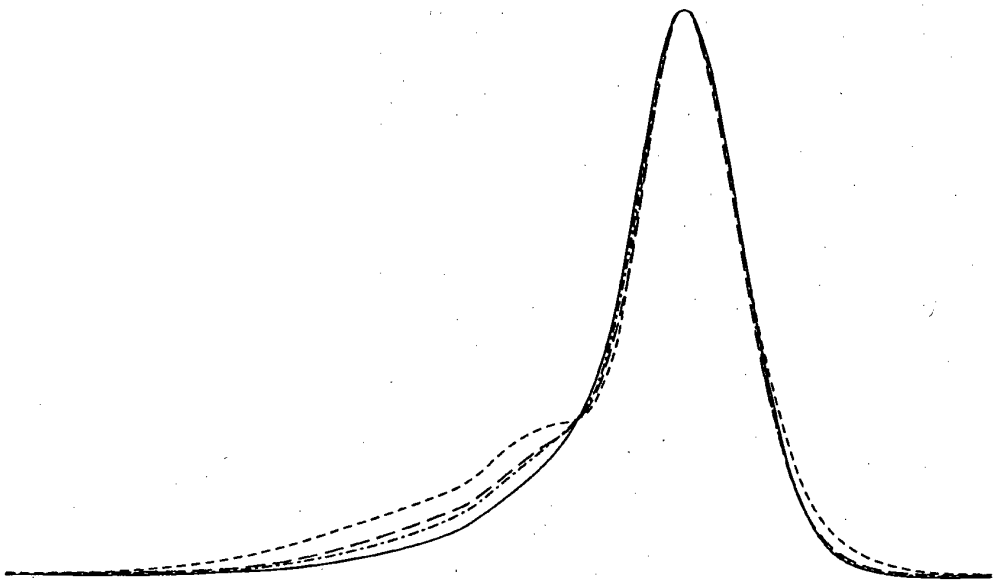

1% de Sucrose
2% de Sucrose
3% de Sucrose
4% de Sucrose
7,5% de Sucrose

FIG. 2B



7,5% de Sucrose
1% de Sucrose / 2,2% de Prolina
3% de Sucrose / 1,5% de Prolina
4% de Sucrose / 1,2% de Prolina

FIG. 2C

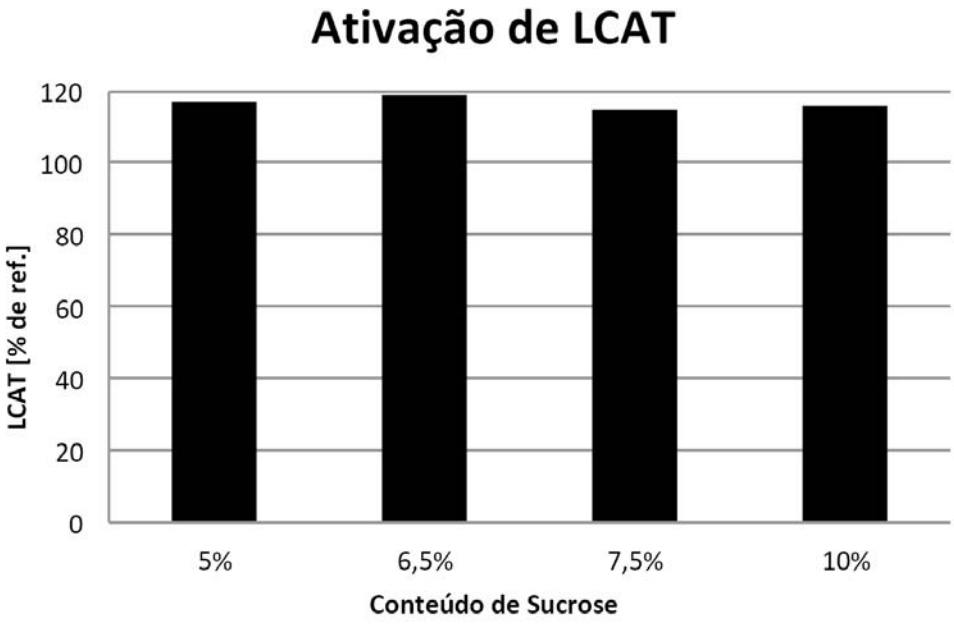

Ativação de LCAT
120
100
80
60
40
20
0
LCAT [% de ref.]
5%
6,5%
7,5%
10%
Conteúdo de Sucrose

FIG. 3A

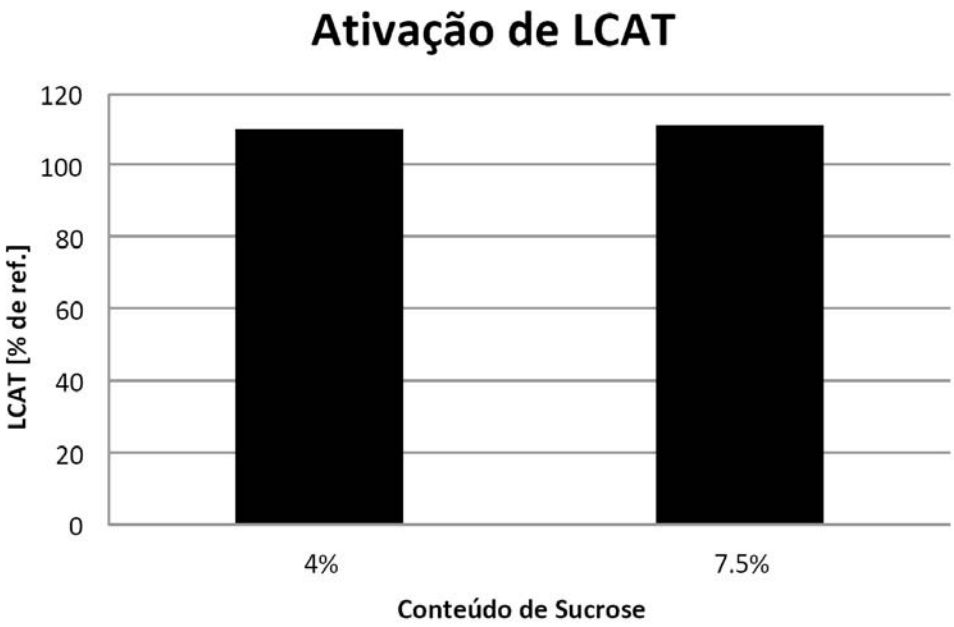

Ativação de LCAT
120
100
80
60
40
20
0
LCAT [% de ref.]
4%
7.5%
Conteúdo de Sucrose

FIG. 3B

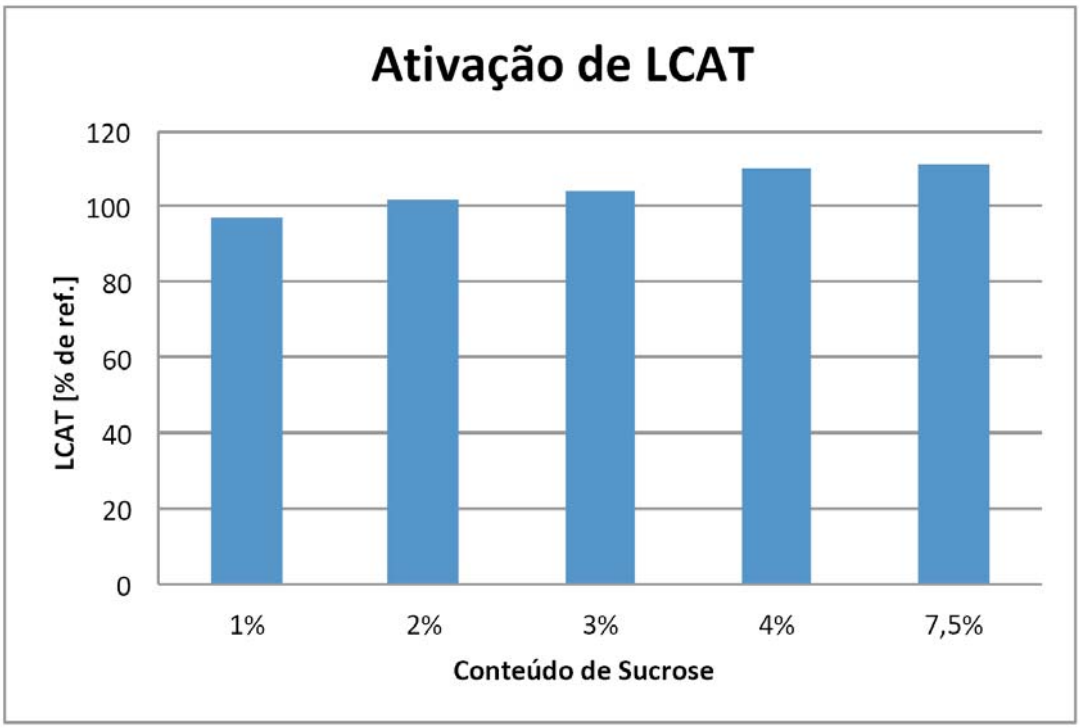

Ativação de LCAT
120
100
80
60
40
20
0
LCAT [% de ref.]
1%
2%
3%
4%
7,5%
Conteúdo de Sucrose

FIG. 3C

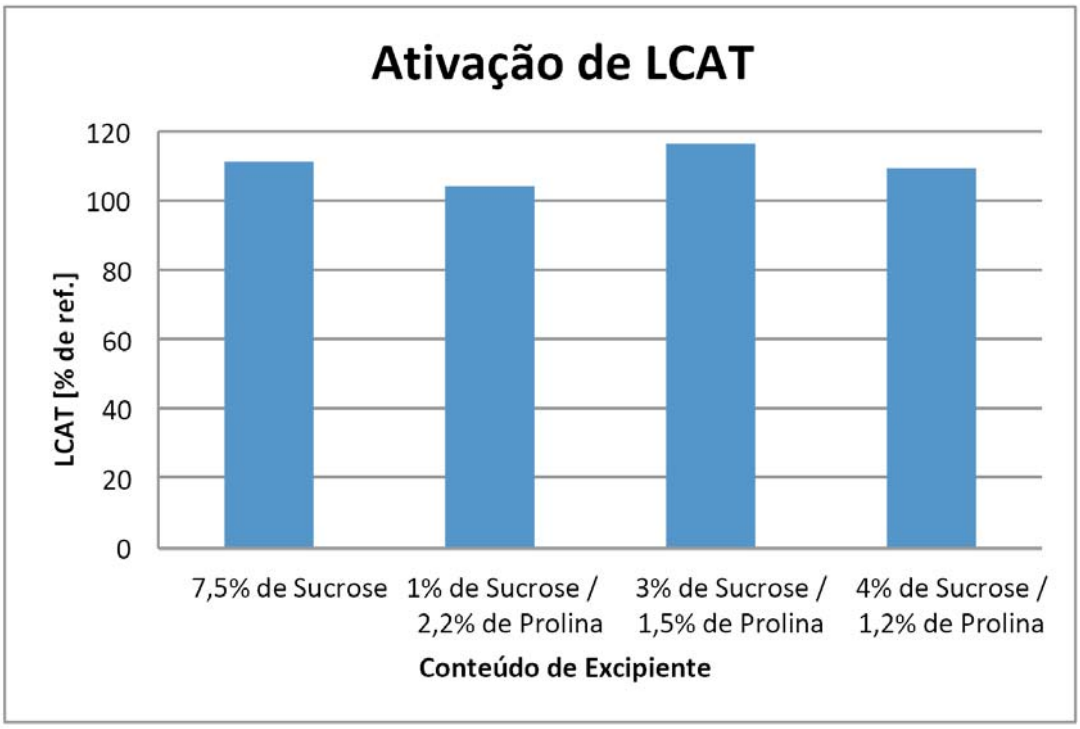

Ativação de LCAT
120
100
80
60
40
20
0
LCAT [% de ref.]
7,5% de Sucrose
1% de Sucrose / 2,2% de Prolina
3% de Sucrose / 1,5% de Prolina
4% de Sucrose / 1,2% de Prolina
Conteúdo de Excipiente

FIG. 3D

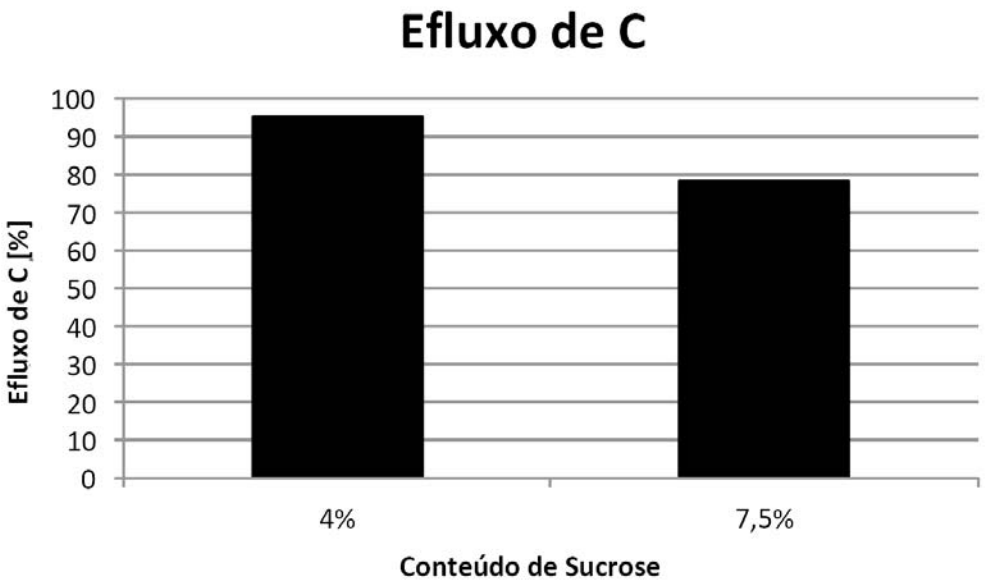

Efluxo de C
Efluxo de C [%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4%
7,5%
Conteúdo de Sucrose

FIG. 4A

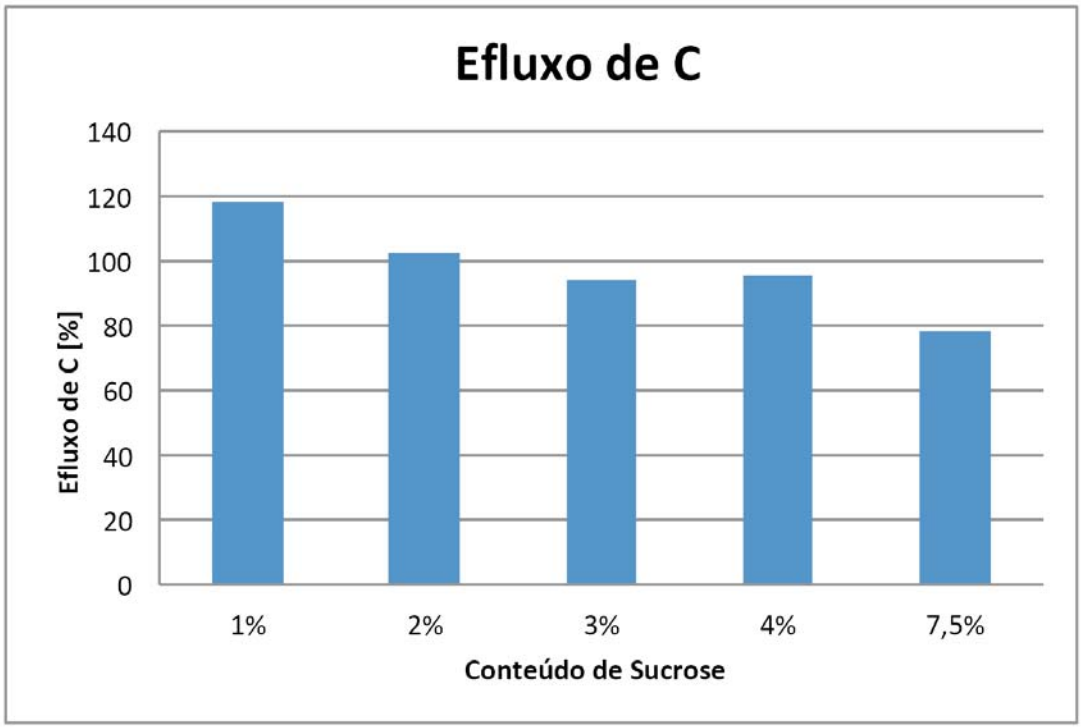

Efluxo de C
Efluxo de C [%]
140
120
100
80
60
40
20
0
1%
2%
3%
4%
7,5%
Conteúdo de Sucrose

FIG. 4B

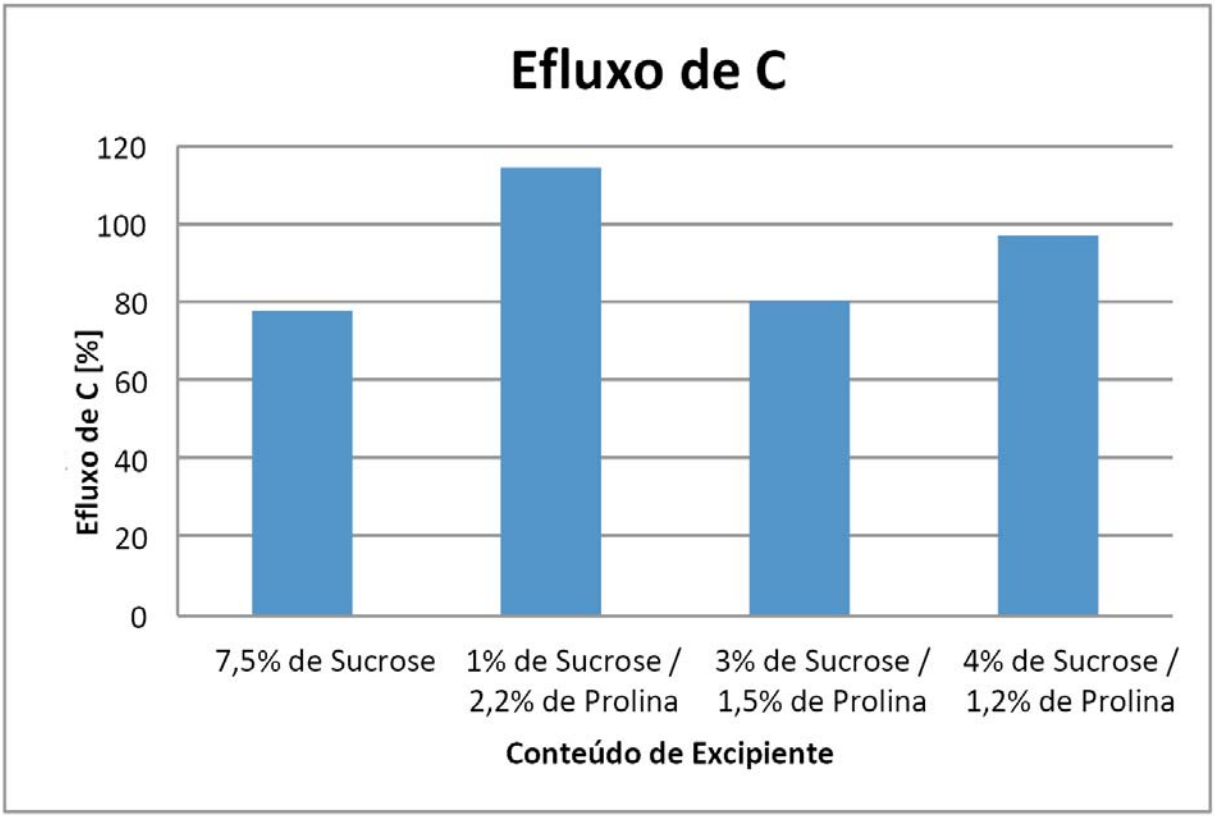

Efluxo de C
120
100
80
60
40
20
0
Efluxo de C [%]
7,5% de Sucrose
1% de Sucrose / 2,2% de Prolina
3% de Sucrose / 1,5% de Prolina
4% de Sucrose / 1,2% de Prolina
Conteúdo de Excipiente

FIG. 4C

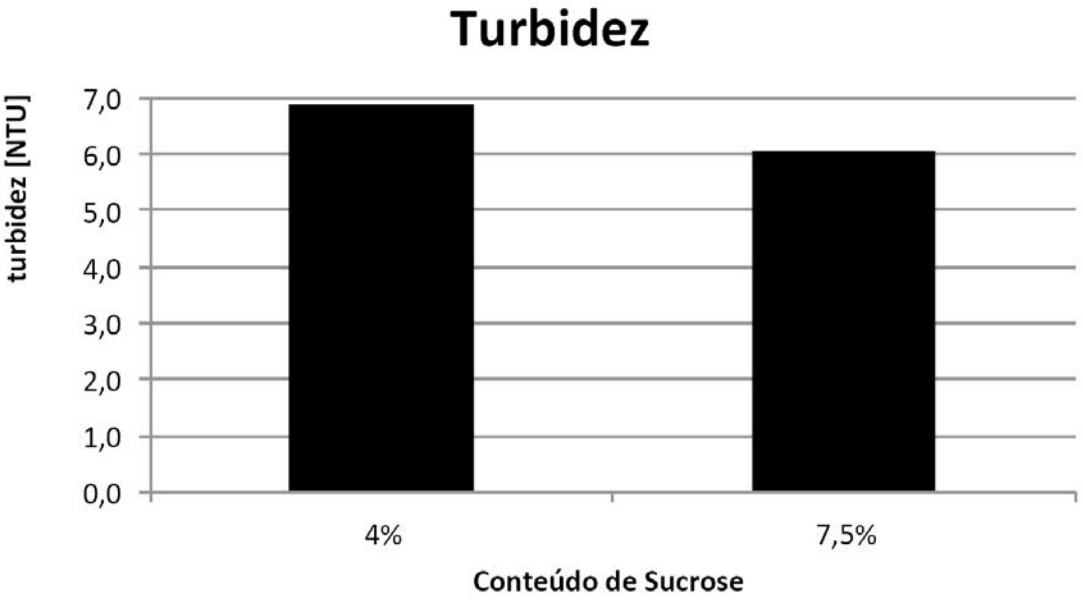

Turbidez
turbidez [NTU]
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
4%
7,5%
Conteúdo de Sucrose

FIG. 5A

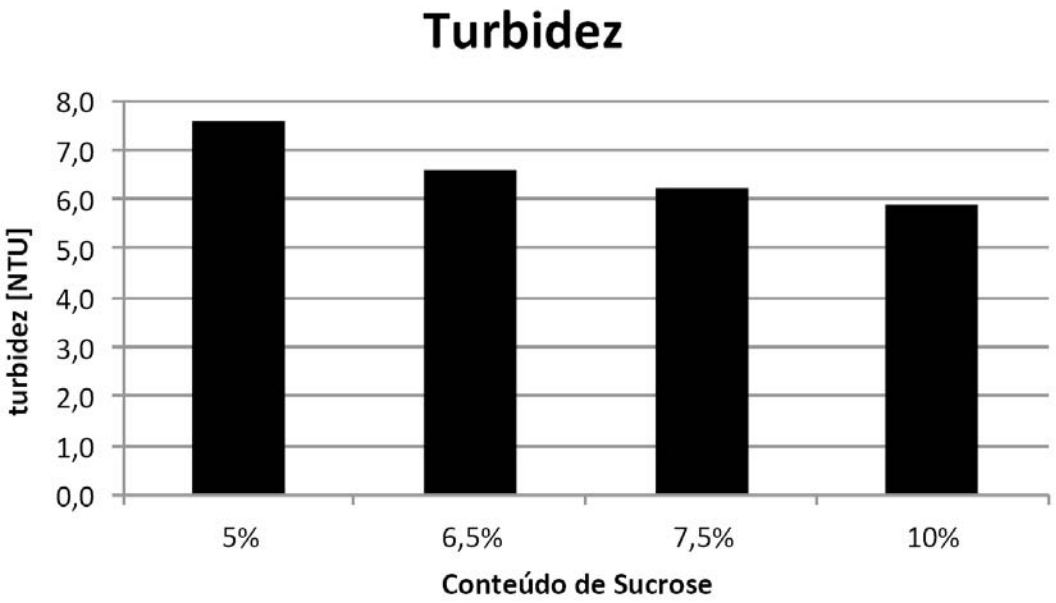

Turbidez
turbidez [NTU]
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
5%
6,5%
7,5%
10%
Conteúdo de Sucrose

FIG. 5B

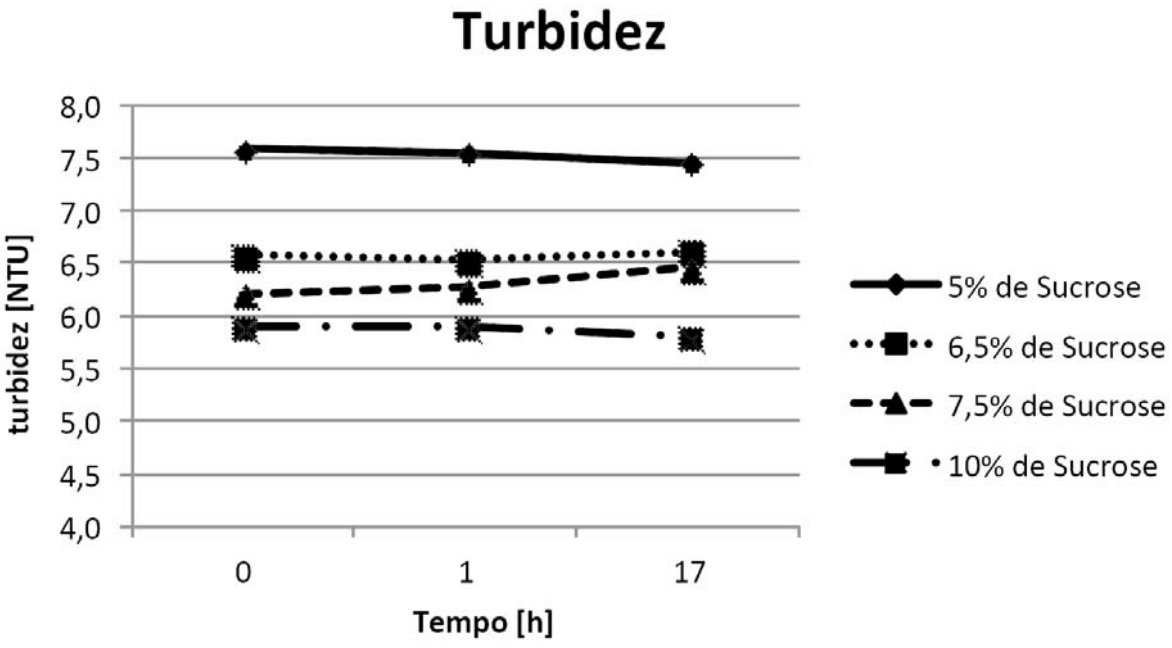

Turbidez
8,0
7,5
7,0
6,5
6,0
5,5
5,0
4,5
4,0
turbidez [NTU]
0
1
17
Tempo [h]
5% de Sucrose
6,5% de Sucrose
7,5% de Sucrose
10% de Sucrose

FIG. 5C

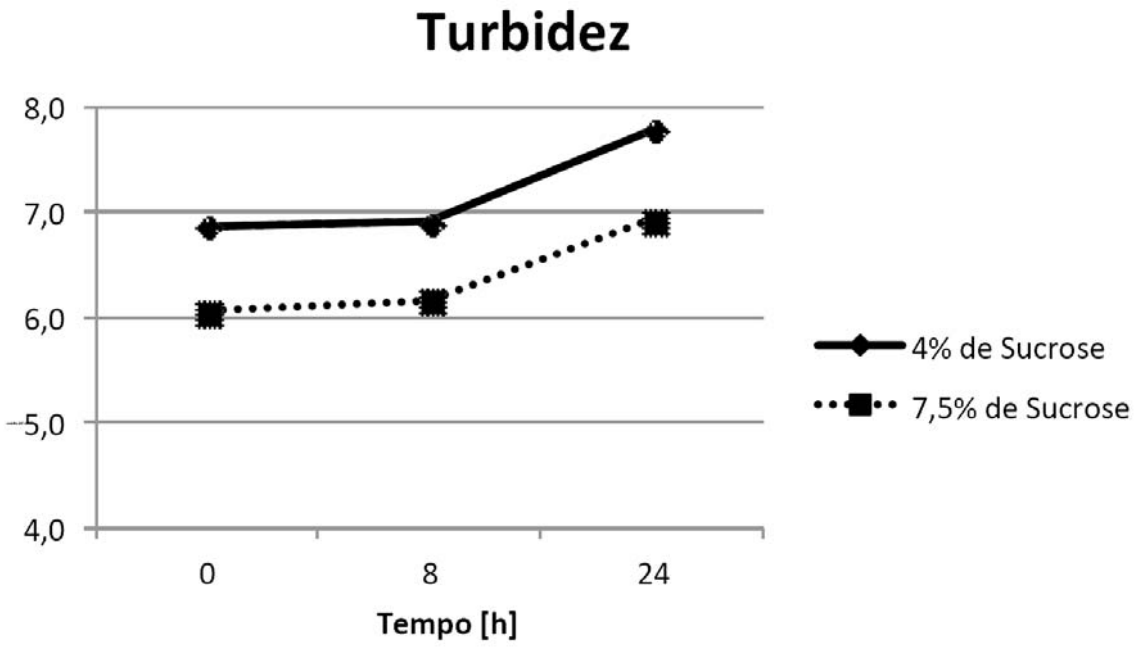

Turbidez
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
0
8
24
Tempo [h]
4% de Sucrose
7,5% de Sucrose

FIG. 5D

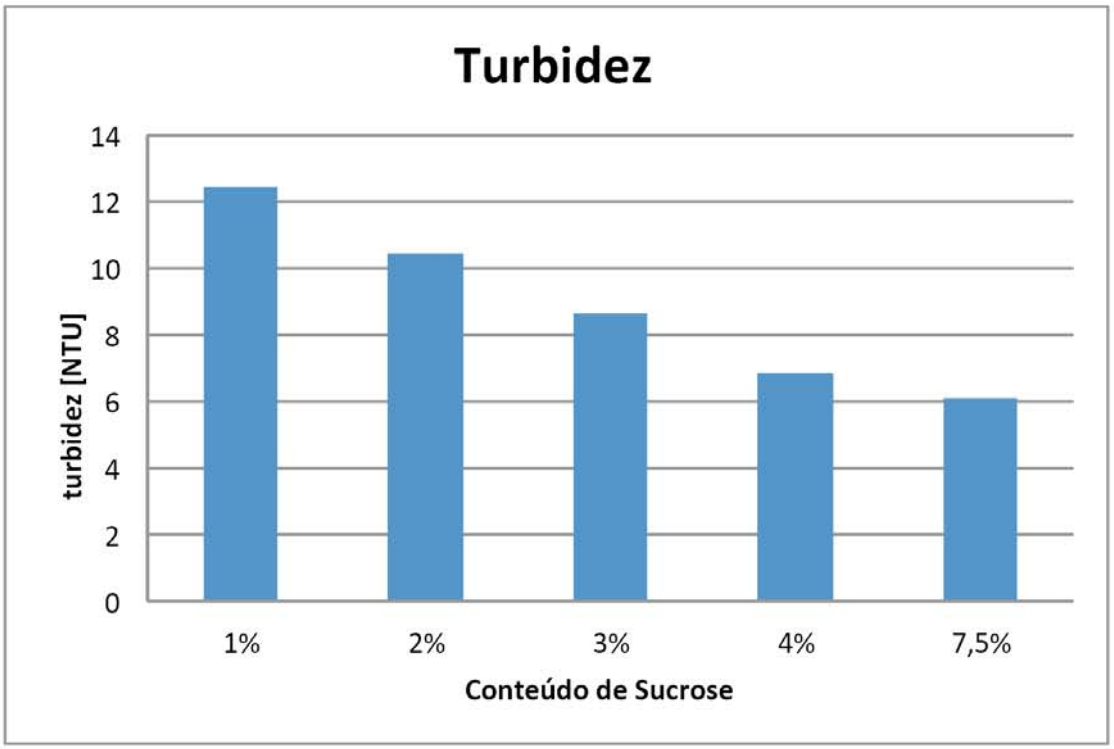

Turbidez
14
12
10
8
6
4
2
0
turbidez [NTU]
1%
2%
3%
4%
7,5%
Conteúdo de Sucrose

FIG. 5E

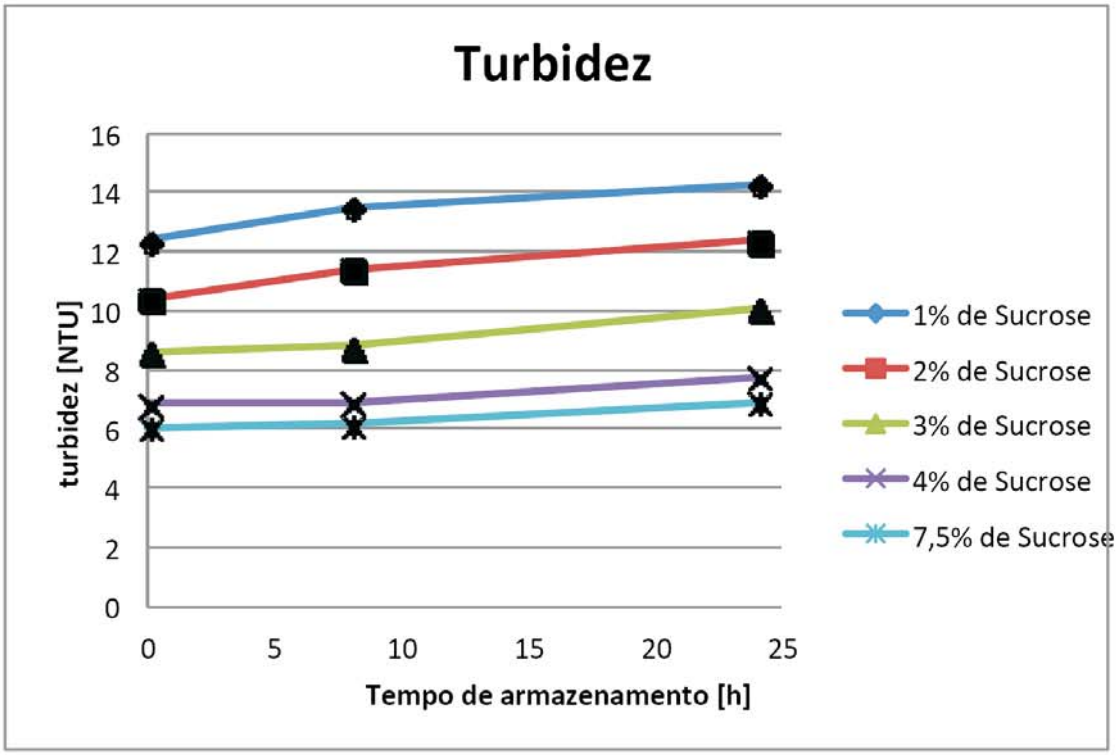

Turbidez
16
14
12
10
8
6
4
2
0
turbidez [NTU]
0
5
10
15
20
25
Tempo de armazenamento [h]
1% de Sucrose
2% de Sucrose
3% de Sucrose
4% de Sucrose
7,5% de Sucrose

FIG. 5F

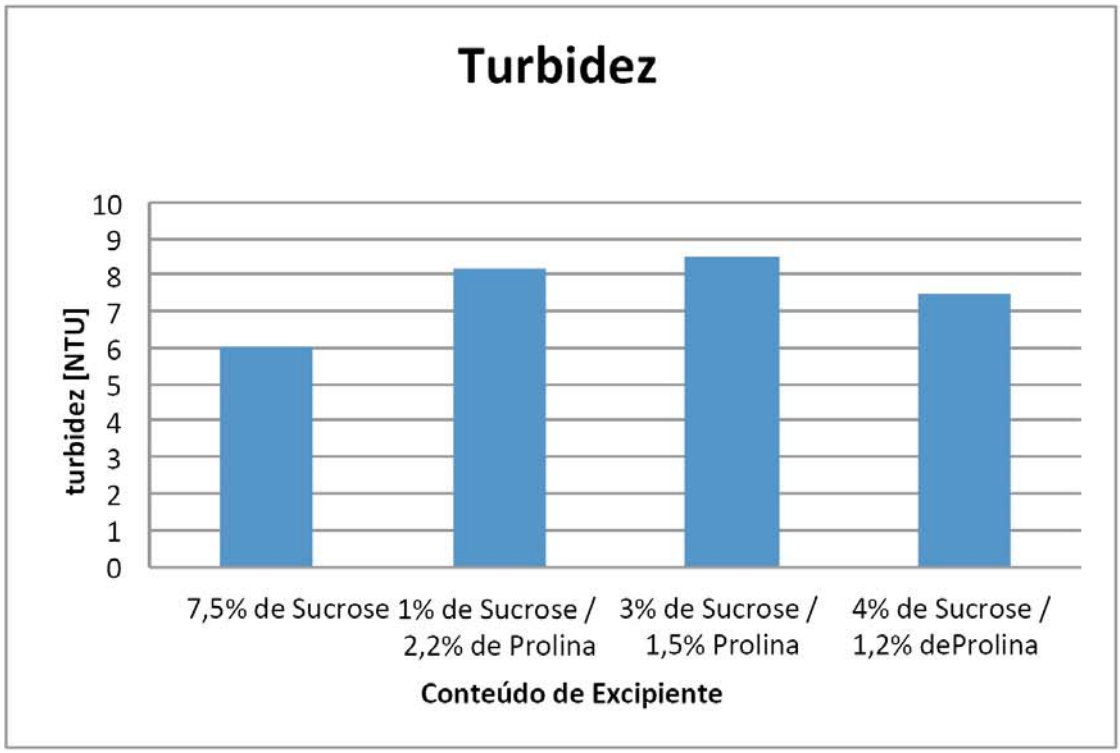

Turbidez
turbidez [NTU]
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
7,5% de Sucrose
1% de Sucrose / 2,2% de Prolina
3% de Sucrose / 1,5% Prolina
4% de Sucrose / 1,2% deProlina
Conteúdo de Excipiente

FIG. 5G

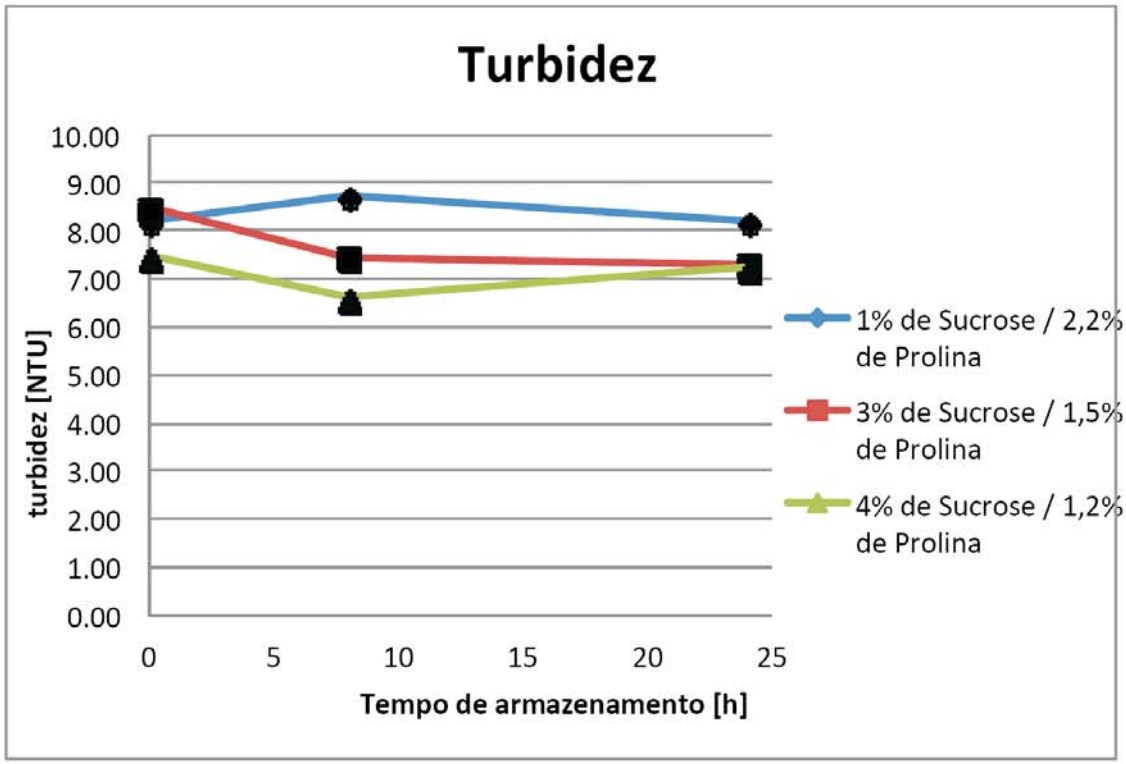

Turbidez
turbidez [NTU]
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
0
5
10
15
20
25
Tempo de armazenamento [h]
1% de Sucrose / 2,2% de Prolina
3% de Sucrose / 1,5% de Prolina
4% de Sucrose / 1,2% de Prolina

FIG. 5H


4% de Sucrose
7,5% de Sucrose

FIG. 6


7,5% de Sucrose
4% de Sucrose
3% de Sucrose
1% de Sucrose
4% de Sucrose / 1,2% de Prolina
3% de Sucrose / 1,5% de Prolina
1% de Sucrose / 2,2% de Prolina

FIG. 7