



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105288589 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201510711086. 3

A61P 9/00(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 02. 06

(30) 优先权数据

61/440, 371 2011. 02. 07 US

61/452, 630 2011. 03. 14 US

61/487, 263 2011. 05. 17 US

(62) 分案原申请数据

201280015257. 3 2012. 02. 06

(71) 申请人 塞勒尼斯医疗控股公司

地址 法国拉贝若

(72) 发明人 J-L. 达塞尤克斯 D.C. 奥尼西奥

R. 阿克曼

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006. 01)

A61K 47/24(2006. 01)

A61P 3/06(2006. 01)

权利要求书3页 说明书89页

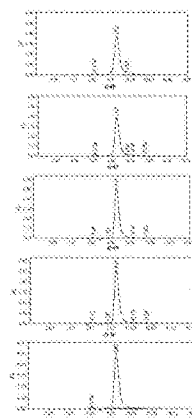
序列表3页 附图35页

(54) 发明名称

脂蛋白复合物及其制备和用途

(57) 摘要

本公开涉及脂蛋白复合物和脂蛋白群体以及它们在治疗和 / 或者预防血脂异常疾病、障碍和 / 或者病症中的用途。本公开还涉及使用基于热循环的方法进行载脂蛋白的重组表达、载脂蛋白的纯化以及脂蛋白复合物的产生。



1. 脂蛋白复合物的群体,其各自包含脂质部分和载脂蛋白部分,所述载脂蛋白部分基本上由载脂蛋白 A-I (“ApoA-I”) 构成,其中如由凝胶渗透色谱法中的单峰所反映,所述脂蛋白复合物为至少 95%均质的。

2. 权利要求 1 的群体,其中至少 97%均质,如经凝胶渗透色谱法的单峰所反映。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的群体,其中以群体中的 ApoA-I 的重量计至少 98%是截短的 ApoA-I。

4. 权利要求 1-3 中任一项所述的群体,如经凝胶渗透色谱法 (“GPC”) 或者动态光散射 (“DLS”) 所测量,至少 95%的所述脂蛋白复合物为具有以下粒度的颗粒的形式:4nm 至 15nm、6nm 至 15nm、4nm 至 12nm、6nm 至 12nm 或者 8nm 至 12nm。

5. 权利要求 1-4 中任一项所述的群体,其中在所述群体中至少 75wt%、至少 80wt%、至少 85wt%、至少 90wt%或者至少 95wt%的 ApoA-I 为成熟形式。

6. 权利要求 1-4 中任一项所述的群体,其中在所述群体中不超过 25wt%、不超过 20wt%、不超过 15wt%、不超过 10wt%或者不超过 5wt%的 ApoA-I 为不成熟形式。

7. 权利要求 1-6 中任一项所述的群体,其中在所述群体中所述 ApoA-I 中的不超过 10%、不超过 5%、不超过 3%、不超过 2%或者不超过 1%的蛋氨酸 112 和蛋氨酸 148 各自被氧化。

8. 权利要求 1-7 中任一项所述的群体,其中在所述群体中所述 ApoA-I 的不超过 15%、不超过 10%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%或者不超过 1%的氨基酸被脱去酰胺。

9. 权利要求 1-8 中任一项所述的群体,其中所述群体含有不超过 1EU 内毒素 / 毫克 ApoA-I、不超过 0.5EU 内毒素 / 毫克 ApoA-I、不超过 0.3EU 内毒素 / 毫克 ApoA-I 或者不超过 0.1EU 内毒素 / 毫克 ApoA-I。

10. 权利要求 1-9 中任一项所述的群体,其中所述群体含有不超过 100 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克 ApoA-I、不超过 50 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克 ApoA-I、不超过 25 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克 ApoA-I、不超过 10 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克 ApoA-I 或者不超过 5 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克 ApoA-I。

11. 权利要求 1-10 中任一项所述的群体,其中所述群体含有不超过 500 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克 ApoA-I、不超过 200 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克 ApoA-I、不超过 100 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克 ApoA-I、不超过 50 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克 ApoA-I 或者不超过 20 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克 ApoA-I。

12. 权利要求 1-11 中任一项的群体,其中所述群体包含不超过 200pm、不超过 100ppm 或不超过 50ppm 的非含水溶剂和 / 或不包含任何去垢剂。

13. 权利要求 1-12 中任一项所述的群体,其中在所述复合物的脂质部分中不超过 15wt%、不超过 10wt%、不超过 5wt%或者不超过 2wt%的脂质为胆固醇。

14. 权利要求 1-13 中任一项的群体,其中所述 ApoA-I 为人 ApoA-I 蛋白。

15. 权利要求 1-14 中任一项的群体,其中所述 ApoA-I 为重组 ApoA-I。

16. 权利要求 1-15 中任一项的群体,其中所述脂质级分包含中性脂质。

17. 权利要求 16 所述的群体,其中所述中性脂质基本上由鞘磷脂组成。

18. 权利要求 16 或权利要求 17 所述的群体,其中脂质级分还包括带负电荷的脂质。

19. 权利要求 18 所述的群体, 其中所述带负电荷的脂质基本上由 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3-[- 磷酸 - 外消旋 -(1- 甘油)] (DPPG) 组成。

20. 权利要求 18 或权利要求 19 所述的群体, 其包括带负电荷的脂质, 其中群体中带负电荷的脂质的组分与中性脂质和 ApoA-1 的摩尔比为 2-6:90-120:1。

21. 权利要求 1-20 中任一项所述的群体, 其中所述脂质部分基本上由 95 至 99wt% 的中性磷脂和 1 至 5wt% 的负电荷磷脂构成。

22. 权利要求 21 的群体, 其中所述脂质部分基本上由 96 至 98wt% 的中性磷脂和 2 至 4wt% 的负电荷磷脂构成。

23. 权利要求 22 的群体, 其中所述脂质部分基本上由 97wt% 的中性磷脂和 3wt% 的负电荷磷脂构成。

24. 权利要求 23 的群体, 其中所述中性脂质为天然鞘磷脂或者合成鞘磷脂, 任选地其中所述脂质具有小于 5meq O/kg、小于 4meq O/kg、小于 3meq O/kg 或者小于 2meq O/kg 的过氧化值。

25. 权利要求 24 的群体, 其中所述鞘磷脂为蛋 - 鞘磷脂。

26. 权利要求 23-25 中任一项的群体, 其中所述负电荷磷脂包括磷脂酰甘油。

27. 权利要求 26 的群体, 其中所述负电荷磷脂包括 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3-[- 磷酸 - 外消旋 -(1- 甘油)] (DPPG) 的盐或者由 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3-[- 磷酸 - 外消旋 -(1- 甘油)] (DPPG) 的盐构成。

28. 权利要求 1-27 中任一项的群体, 其具有范围为 1:2 至约 1:3 的载脂蛋白部分与磷脂部分的重量比。

29. 一种组合物, 包括权利要求 1-28 中任一项的群体。

30. 一种组合物, 其包含权利要求 1-28 中任一项的二个、三个或者四个群体。

31. 权利要求 29 或 30 的组合物, 其中所述组合物中的不超过 15%、不超过 12%、不超过 10%、不超过 9%、不超过 8%、不超过 7%、不超过 6%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%、不超过 1% 的脂蛋白为非复合形式。

32. 权利要求 29-31 中任一项所述的组合物, 其中所述组合物中的不超过 15%、不超过 12%、不超过 10%、不超过 9%、不超过 8%、不超过 7%、不超过 6%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%、不超过 1% 的脂质为非复合形式。

33. 权利要求 29-32 中任一项的组合物, 其包含第一群体, 所述第一群体包含在每个脂蛋白复合物中具有 2 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物的脂蛋白复合物。

34. 权利要求 33 的组合物, 其包含第二群体以及任选的第三群体, 各自地, 所述第二群体包含在每个脂蛋白复合物中具有 3 或 4 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物的脂蛋白复合物, 所述第三群体包含在每个脂蛋白复合物中具有 4 或 3 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物的脂蛋白复合物。

35. 权利要求 29-34 中任一项的组合物, 其进一步包含一种或者多种药用载体、稀释剂和 / 或者赋形剂。

36. 药物组合物, 其包含权利要求 1-28 中任一项的脂蛋白复合物的群体以及一种或者多种药用载体、稀释剂和 / 或者赋形剂, 或者基本上由权利要求 1-14 中任一项的脂蛋白复合物的群体以及一种或者多种药用载体、稀释剂和 / 或者赋形剂构成。

37. 单位剂型,其包含治疗有效量的权利要求 36 的药物组合物。

38. 根据权利要求 1-28 中任一项的脂蛋白复合物或根据权利要求 29-35 中任一项的组合物的群体在制备用于治疗血脂异常障碍的药物中的用途。

脂蛋白复合物及其制备和用途

[0001] 本发明是基于申请日为 2012 年 2 月 6 日,申请号为“201280015257.3”(国际申请号为 PCT/US2012/024020),发明名称为“脂蛋白复合物及其制备和用途”的专利申请的分案申请。

[0002] 1. 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请依据 35U.S.C. § 119(e) 要求 2011 年 2 月 7 日提交的临时申请 61/440,371、2011 年 3 月 14 日提交的临时申请 61/452,630 以及 2011 年 5 月 17 日提交的临时申请 61/487,263 的益处,将所有这些申请的全部内容通过引用的方式并入本申请。

2. 技术领域

[0004] 本公开提供了脂蛋白复合物、包含所述复合物的药物组合物、产生并纯化用于所述复合物的载脂蛋白的方法、制备所述复合物的方法以及使用所述复合物治疗或者预防心血管疾病、与其相关的障碍和 / 或者病症的方法。

3. 背景技术

[0005] 3.1. 综述

[0006] 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复合物颗粒运送。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),胆固醇脂质的去除,具体地,由肝外组织至肝,胆固醇在肝中储存、分解代谢、消除或再循环。HDL 在炎症、转运氧化的脂质和白细胞介素中也起有益作用。

[0007] 脂蛋白颗粒具有包含胆固醇(通常为胆固醇酯的形式)和甘油三酯的疏水核。该核为包含磷脂、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。还发现其它蛋白质如 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)也与脂蛋白有关。

[0008] 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。令人信服的证据支持以下理论:在动脉粥样硬化病变中沉积的脂质主要来自于血浆 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 的较高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,例如,Badimon et al.,1992,Circulation 86(Suppl. III):86-94;Dansky and Fisher,1999,Circulation 100:1762-63;Tangirala et

al., 1999, *Circulation* 100(17):1816-22; Fan et al., 1999, *Atherosclerosis* 147(1):139-45; Deckert et al., 1999, *Circulation* 100(11):1230-35; Boisvert et al., 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(3):525-30; Benoit et al., 1999, *Circulation* 99(1):105-10; Holvoet et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 102(2):379-85; Duverger et al., 1996, *Circulation* 94(4):713-17; Miyazaki et al., 1995, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15(11):1882-88; Mezdoor et al., 1995, *Atherosclerosis* 113(2):237-46; Liu et al., 1994, *J. Lipid Res.* 35(12):2263-67; Plump et al., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91(20):9607-11; Paszty et al., 1994, *J. Clin. Invest.* 94(2):899-903; She et al., 1992, *Chin. Med. J. (Engl.)* 105(5):369-73; Rubin et al., 1991, *Nature* 353(6341):265-67; She et al., 1990, *Ann. NY Acad. Sci.* 598:339-51; Ran, 1989, *Chung Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih* (还翻译为: *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*) 18(4):257-61; Quezado et al., 1995, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272(2):604-11; Duverger et al., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12):1424-29; Kopfler et al., 1994, *Circulation* 90(3):1319-27; Miller et al., 1985, *Nature* 314(6006):109-11; Ha et al., 1992, *Biochim. Biophys. Acta* 1125(2):223-29; Beitz et al., 1992, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 47(2):149-52)。作为结论, HDL 已被普遍认为是“有利的”胆固醇(参见, 例如, Zhang, et al., 2003 *Circulation* 108:661-663)。

[0009] HDL 的“保护性”作用在大量研究中得以证实(例如, Miller et al., 1977, *Lancet* 1(8019):965-68; Whayne et al., 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 et al., 1989, *Lab. Invest.* 60:455-61)和/或者可以诱导所述动脉病变消退(Badimon et al., 1990, *J. Clin. Invest.* 85:1234-41)。

[0010] 3.2. 胆固醇逆转运、HDL 和载脂蛋白 A-I

[0011] 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) 经由卵磷脂:胆固醇酰基转移酶(LCAT)的作用进行的胆固醇酯化, 从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。

[0012] 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它的脂蛋白, 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, 并且脂蛋白胆固醇通过肝经由几种机制而除去。

[0013] 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。

[0014] 每个 HDL 颗粒通常包含至少 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 (γ -LpE 颗粒), 其还被认为负责胆固醇外流(参见,例如, von Eckardstein et al., 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) (原 ApoA-I (proApoA-I)) 分泌且快速地发生裂解从而产生血浆形式的 ApoA-I, 其是一种 243 个氨基酸的单多肽链 (Brewer et al., 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 et al., 2000, Biophys. J. 79(3):1679-85; Segrest et al., 2000, Curr. Opin. Lipidol. 11(2):105-15; Segrest et al., 1999, J. Biol. Chem. 274(45):31755-58)。

[0015] ApoA-I 包含由连接体部分(经常为脯氨酸)间隔开的 6 至 8 个不同的 22 个氨基酸的 α -螺旋或者功能性重复。该重复单元以两亲的螺旋形构型存在 (Segrest et al., 1974, FEBS Lett. 38:247-53) 并赋予 ApoA-I 的主要生物学活性, 即, 脂质结合和卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 活化。

[0016] ApoA-I 与脂质形成以下三种类型的稳定复合物: 称为前- β -HDL 的、贫脂质的小复合物; 称为前- β -2HDL 的、包含极性脂质(磷脂和胆固醇)的平盘状颗粒; 以及称为球状或成熟 HDL (HDL₃和 HDL₂) 的、包含极性和非极性脂质的球状颗粒。循环群中的大部分 HDL 包含 ApoA-I 和 ApoA-II (“AI/AII-HDL 成分”)。然而, 只包含 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 et al., 1992, Arterioscler. Thromb. 12:701-07; Decossin et al., 1997, Eur. J. Clin. Invest. 27:299-307)。

[0017] HDL 颗粒由几种具有不同尺寸、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特征。例如, 前- β -HDL 成分的特征为具有比成熟 α -HDL 少的表面电荷。由于这种电荷差异, 而使得前- β -HDL 和成熟 α -HDL 在琼脂糖凝胶中具有不同的电泳迁移率 (David et al., 1994, J. Biol. Chem. 269(12):8959-8965)。

[0018] 前- β -HDL 与成熟 α -HDL 的代谢也不同。前- β -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 et al., 2004, J. Lipid Res. 45(4):716-728)。

[0019] 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, 但是仍认为贫脂质的复合物, 前- β -HDL 是从 RCT 中涉及的外周组织转移的胆固醇的优选受体(参见 Davidson et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:22975-82; Bielicki et al., 1992, J. Lipid Res. 33:1699-1709; Rothblat et al., 1992, J. Lipid Res. 33:1091-97; and Kawano et al., 1993, Biochemistry 32:5025-28; Kawano et al., 1997, Biochemistry 36:9816-25)。在胆固醇由细胞表面募集的这种过程中, 前- β -HDL 快速地转化为前- β -2HDL。PLTP 可以增加前- β -2HDL 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- β)HDL和球状的(即成熟)HDL反应,而将卵磷脂或其它磷脂的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。在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。

[0020] 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含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与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 et al., 1996, Science 271:518-20; Xu et al., 1997, Lipid Res. 38:1289-98)。SR-BI在生成类固醇的组织(如,肾上腺)及肝中最大量表达(Landschulz et al., 1996, J. Clin. Invest. 98:984-95; Rigotti et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:33545-49)。对于HDL受体的综述,参见Broutin et al., 1988, Anal. Biol. Chem. 46:16-23。

[0021] 经由ATP-结合盒转运子AI的最初脂化对于血浆HDL的形成以及对于前- β -HDL颗粒的胆固醇外流能力而言是至关重要的(Lee and 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- β -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- β -HDL颗粒更强的胆固醇外流能力。

[0022] 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 and Fielding, 1995, J. Lipid Res. 36:211-28; Barrans et al., 1996, Biochem. Biophys. Acta 1300:73-85; Hirano et al., 1997, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17(6):1053-59)。

[0023] HDL也在其它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分解代谢和排泄。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中。

[0024] 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℃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,每个颗粒包含三分子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复合物,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复合物。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、较大直径的盘状复合物。这些复合物与使用磷脂酰胆碱形成的ApoA-I复合物相比,明显更大、更稳定并且对于变性更具抵抗力。

[0025] 初期胆固醇受体(前- β -HDL以及 γ -迁移ApoE包含脂蛋白)中鞘磷脂(SM)增多,表明SM可以增强这些颗粒促进胆固醇外流的能力(Dass and Jessup, 2000, J. Pharm. Pharmacol. 52:731-61; Huang et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1834-38; Fielding and Fielding 1995, J. Lipid Res. 36:211-28)。

[0026] 3.3. HDL 和 ApoA-I 的保护机制

[0027] 近来对于 HDL 保护机制的研究焦点在于载脂蛋白 A-I (ApoA-I), 即 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 et al., 1983, N. Engl. J. Med. 309:385-89; Sedlis et al., 1986, Circulation 73:978-84)。

[0028] 在实验动物中注入 ApoA-I 或 HDL 可产生显著的生物化学变化, 以及降低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 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。

[0029] 通过 ApoA-I 在体外发挥溶纤维蛋白活性的观察结果进一步强调了 HDL 在动物模型中预防动脉疾病的潜力 (Saku et al., 1985, Thromb. Res. 39:1-8)。Ronneberger (1987, Xth Int. Congr. Pharmacol., Sydney, 990) 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 能够证实在经 ApoA-I 治疗的动物中, 脂质沉积和动脉斑块形成的减少。

[0030] 体外研究表明, ApoA-I 与卵磷脂的复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 et al., 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 et al., 1984, Exp. Mol. Pathol. 41:258-66)。

[0031] 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, 例如, Brewer et al., 2004, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24:1755-1760)。

[0032] 已经分离出 ApoA-I 的两种天然形成的人多态性, 其中精氨酸残基被半胱氨酸取代。在载脂蛋白 A-I_{米兰} (ApoA-I_M) 中, 这种取代出现在残基 173, 而在载脂蛋白 A-I_{巴黎} (ApoA-I_P) 中, 这种取代出现在残基 151 (Franceschini et al., 1980, J. Clin. Invest. 66:892-900; Weisgraber et al., 1983, J. Biol. Chem. 258:2508-13; Bruckert et al., 1997, Atherosclerosis 128:121-28; Daum et al., 1999, J. Mol. Med. 77:614-22; Klon et al., 2000, Biophys. J. 79(3):1679-85)。还已经分离了另外的 ApoA-I 的天然形成的人多态性, 其中亮氨酸在 144 位被精氨酸取代。该多态性已经称为载脂蛋白 A-I Zaragoza (ApoA-I_Z) 且与严重的 α 低脂蛋白血症和高密度脂蛋白 (HDL) 胆固醇逆转运的增强作用相关 (Recalde et al., 2001, Atherosclerosis 154(3):613-623; Fiddymment et al., 2011, Protein Expr. Purif. 80(1):110-116)。

[0033] 包含 ApoA-I_M 或 ApoA-I_P 的二硫化物连接的同源二聚体的重构 HDL 颗粒与包含野生型 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 et al., 1997b, Biochemistry 36:12428-33; Franceschini et al., 1999, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19:1257-62; Daum et al., 1999, J. Mol. Med. 77:614-22)。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 et al., 1980, J. Clin. Invest. 66:892-900; Weisgraber et al., 1983, J. Biol. Chem. 258:2508-13; Bruckert et al., 1997, Atherosclerosis 128:121-28)。尽管包含任一变体的重构 HDL 颗粒与包含野生型 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 et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 232:345-49; Daum et al., 1999, J. Mol. Med. 77:614-22)。

[0034] ApoA-I_M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 et al., 1984, Am. J. Hum. Genet. 37:1083-97)。单个 ApoA-I_M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 (genealogical records) 发现这些受试者受到“保护”而使其免于动脉粥样硬化 (Sirtori et al., 2001, Circulation, 103:1949-1954; Roma et al., 1993, J. Clin. Invest. 91(4):1445-520)。

[0035] ApoA-I_M在突变体载体中的、可能的保护作用机制似乎与 ApoA-I_M突变体的结构修饰有关,而在该结构中,缺失了一个 α -螺旋并且增加了暴露的疏水性残基 (Franceschini et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:1632-35)。多个 α -螺旋紧密结构的缺失使该分子的柔韧性增加,而所述分子与正常的 ApoA-I 相比,更易于与脂质缔合。此外,脂蛋白复合物对变性更敏感,从而表明在突变体中,也可以改善脂质的递送。

[0036] Bielicki 等人 (1997, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17(9):1637-43) 已经证明 ApoA-I_M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_M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 9nm 和 11nm 的复合物。这些观察结果表明,在 ApoA-I 基本序列中 Arg₁₇₃→Cys₁₇₃的取代干扰了细胞胆固醇募集和初生 HDL 组装的正常过程。该突变明显与从细胞除去胆固醇的降低的效力有关。因此,其抗动脉粥样硬化的性质可能与 RCT 无关。

[0037] 归因于 Arg₁₇₃→Cys₁₇₃取代的、最显著的结构变化是 ApoA-I_M的二聚作用 (Bielicki et al., 1997, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17(9):1637-43)。ApoA-I_M可以与自身形成同源二聚体而与 ApoA-II 形成异源二聚体。对于包含载脂蛋白混合物的血液成分的研究表明,循环中二聚体和复合物的存在是造成载脂蛋白消除半衰期延长的原因。已在突变体载体的临床研究中观察到此类消除半衰期的延长 (Gregg et al., 1988, NATO ARW on Human Apolipoprotein Mutants: From Gene Structure to Phenotypic Expression, Limone S G)。其它研究表明, ApoA-I_M二聚体 (ApoA-I_M/ApoA-I_M) 在体外的 HDL 颗粒互变中起抑制因子的作用 (Franceschini et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:12224-31)。

[0038] 3.4. 目前用于血脂异常及相关病症的治疗

[0039] 血脂异常障碍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短暂性脑缺血发作或者间歇性跛行。目前具有大量可用于降低与血脂异常障碍相关的、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限制。

[0040] 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[®], Bristol-Myers Squibb)和盐酸考来替泊(Colestid[®], Upjohn 公司)以及盐酸考来维仑(Welchol[®], Daiichi-Sankyo 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,该副作用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它的药物,因而必需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它的口服药物,从而使得心脏病患者的用药方案复杂化。

[0041] 他汀类药物(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酶,即 HMGCoA 还原酶而阻断胆固醇的合成。他汀类药物有时可结合胆汁酸结合树脂使用,所述他汀类药物的例子如洛伐他汀(Mevacor[®])、辛伐他汀(Zocor[®])、普伐他汀(Pravachol[®])、氟伐他汀(Lescol[®])和阿伐他汀(Lipitor[®])。他汀类药物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 分解代谢增强。包括肝和肾功能障碍的副作用与这些药物的使用有关(The Physicians Desk Reference, 56th Ed., 2002, Medical Economics)。

[0042] 烟酸(尼克酸)是一种水溶性的维生素 B- 复合物,其作为食物添加物和抗高脂血症使用。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[®]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[®])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。

[0043] 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[®])、非诺贝特(Tricor[®])和苯扎贝特(Bezalip[®])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[®]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[®])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 -HDL₂和 HDL₃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无现存冠心病症状的、40-55 岁之间的男性患者中观察到了冠心病的预防作用,但是还不清楚将这些结果以何种程度外推至其它的

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。

[0044] 对于绝经后妇女中的中度的高胆固醇血症，可考虑口服雌激素替代疗法。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。

[0045] 其它可用于治疗高脂血症的药物包括依泽替米贝（Zetia[®]; 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。

[0046] HDL 以及与磷脂复合的、重组形式的 ApoA-I 可用作非极性或两亲性分子的吸收剂 / 清除剂，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、氧化产物和脂多糖（LPS）（参见，如，Casas et al., 1995, J. Surg. Res. Nov59 (5):544-52）。HDL 还可以用作 TNF- α 及其它淋巴因子的清除剂。HDL 还可以用作人血清对氧磷酶的载体，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. 33Suppl: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, Mol. 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, Mol. 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。

[0047] 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 et al., WO 01/13939, 2001 年 3 月 1 日公布）。HDL，特别是 ApoA-I，其已被证明促进败血症产生的脂多糖交换为包含 ApoA-I 的脂质颗粒，从而功能性地中和所述脂多糖（Wright et al., WO9534289, 1995 年 12 月 21 日公布；Wright et al., 1999 年 7 月 27 日发行的美国专利 5,928,624；1999 年 8 月 3 日发行的美国专利 5,932,536）。

[0048] 存在众多可用于体外制备脂蛋白复合物的方法。美国专利 6,287,590 和 6,455,088 公开了如下的方法：将载脂蛋白和脂质溶液在有机溶剂（或者溶剂混合物）中共冷冻干燥并且在冷冻干燥粉末的水合过程中形成荷电的脂蛋白复合物。脂蛋白复合物也可通过洗涤剂透析法来形成；例如，将脂质、脂蛋白和诸如胆酸盐的洗涤剂的混合物进行透析并重构形成复合物（参见，例如 Jonas et al., 1986, Methods Enzymol. 128:553-82）。美国公布文本 2004/0067873 的实施例 1 公开了胆酸盐分散法，其中将脂质分散体与胆酸盐在用于形成为胶束的条件下混合，并且再将这些胶束与载脂蛋白溶液一起孵育以形成复合物。最终，例如通过透析、超滤或者在亲和性珠子或者树脂上吸附将有毒的胆酸盐除去。美国专利 6,306,433 公开了通过使得蛋白和脂质的流体混合物进行高压匀浆化来形成脂蛋白复合物。然而，对于高剪切力敏感的蛋白可能在暴露至高压匀浆时丧失活性。

[0049] 因此，目前可用的制备方法导致起始物质的浪费诸如蛋白降解，和 / 或者需要所

得产物的纯化诸如除去毒性剂,且因此是效率低且开支大的。此外,脂蛋白复合物的制备可为不均一的,其含有尺寸和组成可变的复合物的混合物。参见例如美国专利 5,876,968。因此,需要开发用于产生脂蛋白复合物的有效且获得更均质的复合物(优选具有高纯度)的新的方法。所述方法可允许更经济的大规模生产,而产生具有较低的污染物所导致的副作用风险的更均质的药用产物。

[0050] 此外,然而考虑到产物的低的总产率以及在重组表达的蛋白培养中出现的蛋白降解, ApoA-I、ApoA-I_M、ApoA-I_P和其它变体以及重组的 HDL 目前受到大量的治疗性给药所需的载脂蛋白以及蛋白生产成本的限制(参见,例如 Mallory et al., 1987, J. Biol. Chem. 262(9):4241-4247; Schmidt et al., 1997, Protein Expression & Purification 10:226-236)。早期临床试验已经表明用于治疗心血管疾病的每次输注所给予的蛋白剂量范围为 1.5-4g。完全治疗所需的输注次数是未知的(参见,例如 Eriksson et al., 1999, Circulation 100(6):594-98; Carlson, 1995, Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 5:85-91; Nanjee et al., 2000, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20(9):2148-55; Nanjee et al., 1999, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19(4):979-89; Nanjee et al., 1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(9):1203-14)。

[0051] 重组人 ApoA-I 已经在异源性宿主中表达,然而成熟蛋白的产率不足以用于大规模治疗应用,特别是当与进一步降低产率且产生不纯产物的纯化方法结合时。

[0052] Weinberg et al., 1988, J. Lipid Research 29:819-824 描述了通过反相高效液相色谱由人血浆纯化的载脂蛋白 A-I、A-II 和 A-IV 以及它们的亚型的分离。

[0053] WO 2009/025754 描述了 α -1-抗胰蛋白酶和 ApoA-I 由人血浆的蛋白分离和纯化。

[0054] Hunter et al., 2009, Biotechnol. Prog. 25(2):446-453 描述了大肠杆菌中进行重组表达的 ApoA-I_{米兰}突变体的大规模纯化。

[0055] Caparon et al., 2009, Biotechnol. And Bioeng. 105(2):239-249 描述了 ApoA-I_{米兰}由大肠杆菌宿主的表达和纯化,所述大肠杆菌宿主经遗传性工程化以删除两个宿主细胞蛋白以降低这些蛋白在纯化的载脂蛋白产物中的水平。

[0056] 美国专利 6,090,921 描述了使用阴离子交换色谱法将 ApoA-I 或者载脂蛋白 E(ApoE) 由含有 ApoA-I 和 ApoE 的人血浆成分纯化。

[0057] Brewer et al., 1986, Meth. Enzymol. 128:223-246 描述了使用色谱技术进行载脂蛋白由人血液的分离和表征。

[0058] Weisweiler et al., 1987, Clinica Chimica Acta 169:249-254 描述了使用快速-蛋白液相色谱法进行 ApoA-I 和 ApoA-II 由人 HDL 的分离。

[0059] deSilva et al., 1990, J. Biol. Chem. 265(24):14292-14297 描述了通过免疫亲和色谱法和反相高效液相色谱法进行载脂蛋白 J 的纯化。

[0060] 目前正在开发脂蛋白和脂蛋白复合物用于临床应用,其中临床研究使用不同的基于脂蛋白的试剂,其确立了脂蛋白疗法的可行性(Tardif, 2010, Journal of Clinical Lipidology 4:399-404)。一个研究评价了自体同源的去脂的 HDL(Waksman et al., 2010, J. Am. Coll. Cardiol. 55:2727-2735)。另外的研究评价了 ETC-216, 其为重组 ApoA-I_M和棕榈酰基-油酰基-PC(POPC)的复合物(Nissen et al., 2003, JAMA 290:2292-2300)。CSL-111 为由与大豆磷脂酰胆碱(SBPC)络合的血浆纯

化的重建的人 ApoA-I (Tardif et al., 2007, JAMA 297:1675-1682)。目前的探索药物已经显示出降低动脉粥样硬化斑块的效能,但是该作用伴随有次级效应,诸如转氨酶增加以及 ApoA-I 抗体的形成 (Nanjee et al., 1999, Arterioscler. Vasc. Throm. Biol. 19:979-89; Nissen et al., 2003, JAMA 290:2292-2300; Spieker et al., 2002, Circulation 105:1399-1402; Nieuwdorp et al., 2004, Diabetologia 51:1081-4; Drew et al., 2009, Circulation 119, 2103-11; Shaw et al., 2008, Circ. Res. 103:1084-91; Tardiff et al., 2007, JAMA 297:1675-1682; Waksman, 2008, Circulation 118:S 371; Cho, 美国专利 7,273,849B2, 2007 年 9 月 25 日出版)。例如, ERASE 临床试验 (Tardiff et al., 2007, JAMA 297:1675-1682) 采用两个剂量的 CSL-111:40mg/kg 和 80mg/kg 的 ApoA-I。80mg/kg 剂量组由于肝毒性(已知为严重的转氨酶升高)而需要终止。甚至在 40mg/kg 剂量组中,若干患者经历了转氨酶升高。

[0061] 因此,存在对于更有效地降低血清胆固醇、增加 HDL 血清水平、预防和 / 或者治疗血脂异常和 / 或者与血脂异常相关的疾病、病症和 / 或者障碍的更安全的药物的需要。本领域存在对于不与肝毒性相关且优选仅诱导甘油三酯、LDL-甘油三酯或者 VLDL-甘油三酯的最少量(或者无)的增加的脂蛋白制剂,以及对于可用于可靠地制备这些脂蛋白的商业规模的制剂的稳固生产方法的需要。

4. 发明内容

[0062] 本公开提供了特别适用于治疗和 / 或者预防血脂异常和与血脂异常相关的疾病、障碍和 / 或者病症的包含蛋白部分(例如载脂蛋白部分)和脂质部分的脂蛋白复合物和脂蛋白复合物群体。本公开还发现了本申请所述的具有更高纯度和 / 或者均质性和 / 或者包含特定比例的脂质和蛋白的复合物群体具有增强的动员胆固醇以及降低副作用风险的能力。

[0063] 所述脂蛋白复合物包含蛋白部分(例如载脂蛋白部分)和脂质部分(例如磷脂部分)。所述蛋白部分包含一种或者多种当存在于脂蛋白复合物中时能够动员胆固醇的脂质-结合蛋白,诸如载脂蛋白、肽或者载脂蛋白肽类似物或者模拟物。所述载脂蛋白和载脂蛋白肽的非限制性实例包括前原载脂蛋白、前原 ApoA-I、原 ApoA-I、ApoA-I、前原 ApoA-II、原 ApoA-II、ApoA-II、前原 ApoA-IV、原 ApoA-IV、ApoA-IV、ApoA-V、前原 ApoE、原 ApoE (proApoE)、ApoE、前原 ApoA-I_M、原 ApoA-I_M、ApoA-I_M、前原 ApoA-I_P、原 ApoA-I_P、ApoA-I_P、前原 ApoA-I₂、原 ApoA-I₂和 ApoA-I₂。所述一种或者多种载脂蛋白可为单体、二聚体或者三聚体或者它们的混合物的形式。在一个具体的实施方案中,所述载脂蛋白部分基本上由 ApoA-I 构成,最优选地为单一同等型。脂蛋白复合物中的 ApoA-I 可具有与相应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 的蛋白至少 90%或者至少 95%的序列同一性。任选地, ApoA-I 进一步包含在相应于 SEQ ID NO:1 的全长 ApoA-I 氨基酸 25 的位置(以及成熟蛋白的位置 1)上的门冬氨酸。优选地,至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或者至少 95%的 ApoA-I 为经恰当工程化的成熟蛋白(即,缺失信号和前肽序列)且为未被氧化、被脱去酰胺和 / 或者被截短的。

[0064] 本公开还提供了经工程化以表达 ApoA-I 的哺乳动物宿主细胞、包含 ApoA-I 的细胞培养物以及产生成熟的生物学活性 ApoA-I 的方法。已经发现,工程化哺乳动物宿主细

胞以表达大量的成熟 ApoA-I 是可能的,所述成熟 ApoA-I 基本上不含不成熟的 ApoA-I (原 ApoA-I) 以及经蛋白酶降解所产生的截短形式的 ApoA-I。这些结果是令人意料不到的。首先,预期的是,用于蛋白加工的宿主细胞机制 (machinery) 被异源性蛋白如 ApoA-I 的过表达所压制,这导致未加工的不成熟蛋白的产生。第二,使得分泌至培养基中的 ApoA-I 被蛋白酶降解,而仅在培养基中观察到低水平的截短的 ApoA-I。哺乳动物宿主细胞、细胞培养物和产生 ApoA-I 的方法特别适于以商业上相关的数量产生用于治疗应用中的成熟蛋白。

[0065] 将本申请提供的哺乳动物宿主细胞工程化以表达优选包含氨基酸序列 (或者由氨基酸序列组成) 的蛋白,所述氨基酸序列具有与 SEQ ID NO:1 的位置 25-267 至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或者 100% 的同一性。所述蛋白优选在相应于 SEQ ID NO:1 的位置 25 的位置上具有门冬氨酸残基。所述哺乳动物宿主细胞可任选地进一步分泌所述蛋白。在一些情况下,由哺乳动物宿主细胞表达和 / 或者分泌的蛋白可进一步包含 18 个氨基酸的信号序列 (MKAAVLTALVFLTGSQA, SEQ ID NO:2) 和 / 或者 6 个氨基酸的前肽序列 (RHFQQ, SEQ ID NO:3)。在一些情况下,将所述宿主细胞工程化以表达包含氨基酸序列的蛋白,所述氨基酸序列具有与 SEQ ID NO:1 至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或者 100% 的同一性。

[0066] 所述宿主细胞可来自任何哺乳动物细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢 (例如 CHO-K1 或者 CHO-S)、VERO、BHK、BHK 570、HeLa、COS-1、COS-7、MDCK、293、3T3、PC12 和 W138, 或者来自骨髓瘤细胞或者细胞系 (例如鼠类骨髓瘤细胞或者细胞系)。

[0067] 所述哺乳动物宿主细胞可进一步含有编码 ApoA-I 蛋白的核酸的多个副本,所述 ApoA-I 蛋白为例如包含 SEQ ID NO:1 的位置 25-267 或者由 SEQ ID NO:1 的位置 25-267 组成的蛋白。例如,所述哺乳动物宿主细胞可含有至少约 5、6、7、8 或者更多的核酸副本,且至多约 10、11、12、13 或者 14 个核酸副本。所述核酸可进一步可操作地连接至启动子,所述启动子能够在哺乳动物宿主细胞中高水平地表达所述蛋白,例如,猿猴巨细胞病毒启动子或者更具体为早期猿猴巨细胞病毒启动子。

[0068] 所述哺乳动物宿主细胞优选能够在培养物中产生至少约 0.5、1、2 或者 3g/L ApoA-I 和 / 或者至多约 20g/L ApoA-I,例如至多 4、5、6、7、8、9、10、12 或者 15g/L ApoA-I。所述培养物可为任意规格的,范围为约 150mL 至约 500L、1000L、2000L、5000L、10,000L、25,000L 或者 50,000L 或者更大。在不同的实施方案中,所述培养物体积的范围可为 10L 至 50L、50L 至 100L、100L 至 150L、150L 至 200L、200L 至 300L、300L 至 500L、500L 至 1000L、1000L 至 1500L、1500L 至 2000L、2000L 至 3000L、3000L 至 5000L、5000L 至 7500L、7500L 至 10,000L、10,000L 至 20,000L、20,000L 至 40,000L、30,000L 至 50,000L。在一些情况下,所述培养物为大规格培养物,诸如 15L、20L、25L、30L、50L、100L、200L、300L、500L、1000L、5000L、10,000L、15,000L、20,000L、25,000L、至多 50,000L 或者更大。

[0069] 本公开的哺乳动物宿主细胞可在培养物中生长。因此,本公开进一步提供了哺乳动物细胞培养物,其包含如上所述或者在如下段落 6.1.2 中所述的多个哺乳动物宿主细胞。所述细胞培养物可包括一种或者多种以下特征:(a) 所述培养物 (其任选地为至少 10 升、至少 20 升、至少 30 升、至少 50 升、至少 100 升、300L、500L、1000L、5000L、10,000L、15,000L、20,000L、25,000L、至多 50,000L 的大规格分批培养物,或者为至少 10 升、至少 20 升、至少 30 升、至少 50 升、至少 100 升、300L、500L、1000L、5000L 或者至多 10,000L 的连续

培养物) 包含至少约 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0g/L 或者更多的成熟 ApoA-I 蛋白, 该 ApoA-I 蛋白包含相应于 SEQ IDNO:1 的氨基酸 25-267 的氨基酸序列或者由该氨基酸序列组成; (b) 在所述培养基中的至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或者至少 99% 的蛋白为缺失信号序列的 ApoA-I 蛋白; (c) 在所述培养基中的至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或者至少 99% 的蛋白为缺失信号序列和前肽序列的成熟 ApoA-I 蛋白; 以及 (d) 至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 的成熟 ApoA-I 未被截短、氧化或者被脱去酰胺。

[0070] 本公开还提供了产生成熟的生物学活性 ApoA-I 的方法。一般而言, 所述方法包括在表达和分泌 ApoA-I 的条件下培养如上所述或者在如下段落 6.1.2 中所述的任意哺乳动物宿主细胞。所述方法可进一步包括以下步骤: 由培养的哺乳动物宿主细胞的上清液回收, 并任选地纯化所述成熟的生物学活性 ApoA-I (诸如通过在如下段落 6.1.3 和段落 6.1.4 公开的方法)。

[0071] 通过如上所述的方法获得的或者可获得的 ApoA-I 可进一步与脂质复合以形成本申请所述的脂蛋白复合物, 和 / 或者可以治疗有效量掺入至药物组合物中。所述药物组合物优选为磷酸盐缓冲溶液, 其也含有蔗糖和 / 或者甘露醇作为赋形剂。

[0072] 已经进一步发现, 通过使用色谱法和滤过步骤的新的组合来纯化 ApoA-I, 可产生大量的纯的 ApoA-I, 其含有如下水平的宿主细胞蛋白、宿主细胞 DNA、内毒素和截短形式的所述蛋白, 所述水平足够低以至于产生一种或者多种属性, 包括降低的副作用风险以及低毒性或者无毒性, 这使得所述蛋白特别适用于治疗用途。优选地, 由本申请所述的方法纯化的 ApoA-I 在哺乳动物细胞中重组性产生且分泌至生长培养基中。因此, 本公开涉及纯化 ApoA-I 的方法, 其包括以下步骤: (a) 使含有 ApoA-I 的溶液与阴离子交换基质在使得 ApoA-I 不能与所述基质结合的条件下接触; (b) 经具有足以除去病毒或者病毒颗粒的孔径的膜将步骤 (a) 获得的含有 ApoA-I 的溶液滤过; (c) 在使得 ApoA-I 与基质结合的条件下使得步骤 (b) 获得的滤液经过第一反相色谱柱; (d) 使用增加浓度的有机溶剂梯度由所述第一反相色谱基质洗脱出第一含有 ApoA-I 的反相洗脱液; (e) 在使得 ApoA-I 与基质结合的条件下使得步骤 (d) 的第一 ApoA-I 的反相洗脱液经过第二反相色谱柱; 以及 (f) 使用增加浓度的有机溶剂梯度由所述第二反相色谱基质洗脱出第二含有 ApoA-I 的反相洗脱液。所进行的步骤的顺序不是关键的, 例如, 在示例性实施方案中, 经膜滤过以除去病毒或者病毒颗粒的步骤在上述步骤 (f) 之后进行, 而不是在步骤 (a) 之后进行。

[0073] 本申请还提供了由本申请所述的纯化方法获得的或者可获得的的基本纯的 ApoA-I 产物, 其中 ApoA-I 的浓度为至少 10g/L。所述由本申请所述的纯化方法产生的基本纯的 ApoA-I 产物优选包含小于约 10pg 的宿主细胞 DNA/mg ApoA-I、小于约 100ng 的宿主细胞蛋白 /mg ApoA-I 和 / 或者小于 0.1EU 的内毒素 /mg ApoA-I。所述 ApoA-I 产物可为至少 95% 纯的、至少 96% 纯的、至少 97% 纯的、至少 98% 纯的或者至少 99% 纯的。

[0074] 此外, 所述基本纯的 ApoA-I 产物可掺入至本申请所述的包含 ApoA-I 的任何药物组合物和 / 或者脂蛋白复合物。

[0075] 所述脂质部分通常包含一种或者多种磷脂, 所述磷脂可为中性的、荷负电的、荷正电的或者它们的组合。所述磷脂上的脂肪酸链在长度上优选含有 12-26 或者 16-26 个碳且可在饱和程度上为饱和至单不饱和。示例性磷脂包括小烷基链磷脂、蛋磷脂酰胆碱、大豆磷

脂酰胆碱、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、二油酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰甘油磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油诸如二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰甘油、二油酰磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酸、二棕榈酰磷脂酸、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、脑磷脂酰丝氨酸、脑鞘磷脂、蛋鞘磷脂、乳鞘磷脂、棕榈酰鞘磷脂、植物鞘磷脂、二棕榈酰鞘磷脂、二硬脂酰鞘磷脂、二棕榈酰磷脂酰甘油盐、磷脂酸、半乳糖脑苷脂、神经节苷酯、脑苷脂、二月桂基磷脂酰胆碱、(1,3)-D-甘露糖基-(1,3)甘油二酯、氨基苯基糖苷、3-胆固醇基-6'-(糖基硫基)己基醚糖脂以及胆固醇及其衍生物。包含 SM 和棕榈酰鞘磷脂的磷脂部分可任选地包含少量的任意类型的脂质,包括但不限于溶血磷脂质、除了棕榈酰鞘磷脂之外的鞘磷脂、半乳糖脑苷脂、神经节苷酯、脑苷脂、甘油酯、甘油三酯以及胆固醇及其衍生物。

[0076] 最优选地,所述脂质部分含有至少一种中性磷脂以及任选地一种或者多种负电荷磷脂。在包含中性和负电荷磷脂的脂蛋白复合物中,所述中性和负电荷磷脂可含有具有相同或者不同数目的碳以及相同或者不同程度的饱和度的脂肪酸链。在一些情况下,所述中性和负电荷磷脂将具有相同的酰基末端,例如 C16:0,或者棕榈酰、酰基链。

[0077] 当所述复合物的脂质成分包含中性和负电荷磷脂或者由中性和负电荷磷脂组成时,所述中性与负电荷磷脂的重量-重量(wt:wt)比优选为范围为约 99:1 至约 90:10、更优选约 99:1 至约 95:5 且最优选约 98:2 至约 96:4 的 wt:wt 比。在一个实施方案中,所述一种或多种中性磷脂和一种或多种负电荷磷脂以约 97:3 的一种或多种中性磷脂与一种或多种负电荷磷脂的重量-重量(wt:wt)比存在。

[0078] 所述中性磷脂可为天然的或者合成的。优选地,所述磷脂为鞘磷脂(“SM”),诸如棕榈酰鞘磷脂、植物鞘磷脂、二植物鞘磷脂、磷酸鞘脂或者糖鞘脂,其任选地含有具有 16-26 个碳原子的链长的饱和或者单-不饱和的脂肪酸。SM 可来自任何来源。例如,所述 SM 可由乳、蛋、脑获得或者合成性制备。在一个具体的实施方案中,所述 SM 由鸡蛋获得(“蛋 SM”)。在另一个具体实施方案中,所述 SM 为棕榈酰鞘磷脂。

[0079] 在生理学 pH 带有至少部分负电荷的任何磷脂可用作负电荷磷脂。非限制性实例包括荷负电的形式,例如磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油和磷脂酸的盐。在一个具体的实施方案中,所述负电荷磷脂为 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-[-磷酸-外消旋-(1-甘油)]或者 DPPG、磷脂酰甘油。优选的盐包括钾盐和钠盐。

[0080] 用于制备本公开复合物的磷脂优选为至少 95% 纯的且更优选为至少 99% 纯的,和/或者具有在 4meq O/kg、更优选在 3meq O/kg(例如在 2meq O/kg)的氧化水平。氧和脂肪酸的主要初始反应产物为过氧化氢。使用碘量滴定法,可以通过测定过氧化物在样品中的存在来测量氧化水平。

[0081] 本公开的脂蛋白复合物优选具有载脂蛋白与脂质的比,该比导致更完全和更均质的复合物形成,如下在实施例显示。所述脂蛋白复合物的特征在于范围为 1:80-1:120、1:100-1:115 或者 1:105-1:110 的载脂蛋白部分:脂质部分摩尔比,其中所述载脂蛋白在 ApoA-I 等价物中表达。在一个具体的实施方案中,所述载脂蛋白部分:脂质部分的

摩尔比为 1:80-1:90 (例如 1:82、1:85 或者 1:87)、1:90-1:100 (例如 1:95 或者 1:98)、1:100-1:110 (例如 1:105 或者 1:108)。

[0082] 在一些具体的实施方案中,特别是蛋 SM 用作中性脂质的那些,所述载脂蛋白部分:脂质部分的重量比的范围约为 1:2.7 至约 1:3 (例如 1:2.7)。

[0083] 本公开的脂蛋白复合物也可用作递送疏水性、亲脂性或者非极性活性剂的载体。对于所述应用,所述脂质部分可进一步包含一种或者多种疏水性、亲脂性或者非极性活性剂,或者所述脂蛋白复合物可载入有一种或者多种疏水性、亲脂性或者非极性活性剂,所述活性剂包括但不限于脂肪酸、药物、核酸、维生素和 / 或者营养素。活性剂的具体实例描述于段落 6.2 中。

[0084] 本公开还提供了脂蛋白复合物群体。典型地:

[0085] • 所述群体含有多个脂蛋白复合物,其各自包含蛋白部分和脂质部分;

[0086] • 所述蛋白部分含有如上所述和在段落 6.1 或者 6.5.3 中所述的脂蛋白或者脂蛋白类似物;最优选地,蛋白部分包含脂蛋白 (例如 ApoA-I 蛋白) 或者基本上由脂蛋白 (例如 ApoA-I 蛋白) 构成,所述脂蛋白由段落 6.1.2 所述的方法获得或者可获得,和 / 或者由段落 6.1.4 所述的方法纯化;

[0087] • 所述脂质部分含有如上所述和在段落 6.2 或者 6.5.2 中所述的脂质;

[0088] • 所述脂蛋白复合物优选由在段落 6.5.4 中所述的热循环方法产生。

[0089] 申请人已经发现了若干特征,这些特征被认为在单独或者组合时有助于脂蛋白复合物群体的效能和安全性特性。这些特征包括:

[0090] • 群体中的复合物大小的均一性,其主要范围为 4nm 至 15nm (例如 5nm 至 12nm、6nm 至 15nm 或者 8nm 至 10nm);

[0091] • 用于制备复合物的载脂蛋白的纯度 (例如,缺乏被氧化的、被脱去酰胺的、被截短的和 / 或者不成熟形式的载脂蛋白和 / 或者缺乏内毒素和 / 或者缺乏除了一种或者多种载脂蛋白之外的蛋白 (诸如宿主细胞蛋白),和 / 或者通常存在于重组生产中的宿主细胞 DNA);

[0092] • 群体中复合物本身的纯度 (特征在于缺乏污染物,诸如用于制备复合物的溶剂或者洗涤剂;缺乏氧化的脂质;缺乏被脱去酰胺的、氧化的或者截短的蛋白;和 / 或者降低量的或者缺乏非复合的载脂蛋白和 / 或者脂质)。

[0093] 在这些特征中,认为复合物的均一性以及复合物中成熟的、未修饰的载脂蛋白的普及能够增加效能。载脂蛋白、脂质和复合物的纯度降低了副作用的风险,所述副作用诸如由肝酶 (例如转氨酶) 增加所表现出的肝损伤。此外,发明人已经可以通过导致大部分载脂蛋白掺入复合物中的方法制备脂蛋白复合物群体,并且非复合的载脂蛋白的量的降低也是有益的,这是因为其降低了可由给予异源性蛋白所引起的受试者中免疫源应答的风险。

[0094] 因此,本公开提供了脂蛋白复合物群体,其特征在于以下特征中的一种或者多种或者全部:

[0095] (a) 所述群体中至少 75wt%、至少 80wt%、至少 85wt%、至少 90wt% 或者至少 95wt% 的脂蛋白 (通常为 ApoA-I) 为成熟形式;

[0096] (b) 所述群体中不超过 25wt%、不超过 20wt%、不超过 15wt%、不超过 10wt% 或者不超过 5wt% 的脂蛋白 (通常为 ApoA-I) 为不成熟形式;

[0097] (c) 所述群体含有不超过 100 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I)、不超过 50 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I)、不超过 25 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I)、不超过 10 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I) 或者不超过 5 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I) ;

[0098] (d) 所述群体含有不超过 500 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I)、不超过 200 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I)、不超过 100 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I)、不超过 50 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I) 或者不超过 20 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I) ;

[0099] (e) 所述群体中不超过 25wt%、不超过 20wt%、不超过 15wt%、不超过 10wt% 或者不超过 5wt% 的脂蛋白 (通常为 ApoA-I) 为截短形式 ;

[0100] (f) 所述脂蛋白成分包含成熟 ApoA-I 或者由成熟 ApoA-I 构成, 且所述群体中的所述 ApoA-I 中的不超过 20%、不超过 15%、不超过 10%、不超过 5%、不超过 3%、不超过 2% 或者不超过 1% 的蛋氨酸 112 和蛋氨酸 148 各自被氧化 ;

[0101] (g) 如经凝胶渗透色谱法 (“GPC”) 或者动态光散射 (“DLS”) 所测量, 至少 80%、至少 85%、至少 90% 或者至少 95% 的脂蛋白复合物为具有以下粒度的颗粒形式 : 4nm 至 15nm, 例如 6nm 至 15nm 或者 8nm 至 12nm, 更优选 5nm 至 12nm ;

[0102] (i) 所述群体含有不超过 1EU 内毒素 / 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I)、不超过 0.5EU 内毒素 / 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I)、不超过 0.3EU 内毒素 / 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I) 或者不超过 0.1EU 内毒素 / 毫克脂蛋白 (通常为 ApoA-I) ;

[0103] (j) 所述群体中的脂蛋白 (通常为 ApoA-I) 中的不超过 15%、不超过 10%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2% 或者不超过 1% 的氨基酸被脱去酰胺 ;

[0104] (k) 所述复合物中的脂质部分中的不超过 15wt%、不超过 10wt%、不超过 5wt%、不超过 2wt% 或者 0wt% 的脂质为胆固醇 ;

[0105] (l) 所述群体含有不超过 200ppm、100ppm、50ppm 的非水溶剂 ;

[0106] (m) 所述群体不含有任何洗涤剂 (例如胆酸盐) ;

[0107] (n) 如经凝胶渗透色谱法中群体在单峰中的百分数所测量, 所述群体可为至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99% 均质的 ;

[0108] (o) 所述群体在组合物中, 在所述组合物中, 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或者至少 97% 的蛋白为复合形式 ;

[0109] (p) 所述群体中不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2% 或者不超过 1% 的脂质被氧化 ; 以及

[0110] (q) 所述群体中不超过 15%、不超过 10%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2% 或者不超过 1% 的蛋氨酸和 / 或者色氨酸残基被氧化。

[0111] 在一些具体的实施方案中, 所述群体具有选自以下各组的特征 :

[0112] 组 I : 上述特征 (a)、(b) 和 (e) ;

[0113] 组 II : 上述特征 (c)、(d) 和 (i) ;

[0114] 组 III : 上述特征 (f)、(j)、(e)、(p) 和 (q) ;

[0115] 组 IV : 上述特征 (g)、(n) 和 (o) ;

[0116] 组 V : 上述特征 (l) 和 (m) ; 和

[0117] 组 VI :上述特征 (k)。

[0118] 在某些方面,所述群体的特征在于独立选自组 I 和组 IV 各自的一种或者两种特征;任选地,所述群体的特征在于独立选自组 I 和组 IV 各自的三种特征。所述群体的另外的特征在于独立选自组 II 和 / 或者组 III 各自的一种、两种或者三种特征。所述群体的进一步特征在于独立选自组 V 的一种或者两种特征和 / 或者独立选自组 VI 的一种特征。

[0119] 某些脂质和蛋白成分可形成多种不同的但均质的脂蛋白复合物。因此,本公开还提供了包含两种、三种或者四种脂蛋白复合物群体的组合物,所述脂蛋白复合物包含不同量的载脂蛋白分子(例如两个、三个或者四个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物)。在示例性实施方案中,组合物包含两种脂蛋白复合物群体,其分别为包含每个脂蛋白复合物具有 2 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物的脂蛋白复合物的第一群体,包含每个脂蛋白复合物具有 3 或者 4 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物的脂蛋白复合物的第二群体,以及任选地包含每个脂蛋白复合物具有 4 或者 3 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物的脂蛋白复合物的第三群体。

[0120] 包含两种或者更多种脂蛋白复合物群体的组合物优选具有低水平的非复合的脂蛋白和 / 或者脂质。因此,组合物中优选不超过 15%、不超过 12%、不超过 10%、不超过 9%、不超过 8%、不超过 7%、不超过 6%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2% 或者不超过 1% 的脂质为非复合形式和 / 或者组合物中不超过 15%、不超过 12%、不超过 10%、不超过 9%、不超过 8%、不超过 7%、不超过 6%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2% 或者不超过 1% 的脂蛋白为非复合形式。

[0121] 本公开提供了用于制备脂蛋白复合物的方法。所述方法特别基于这样的发现:使得含有非复合的脂质以及脂质-结合蛋白或者肽的混悬液经历热循环条件会导致脂蛋白复合物的形成,其具有相对于其它方法有利的结果,在所述其它方法中通过将成分在固定温度孵育来产生脂蛋白复合物。

[0122] 本公开提供了用于制备脂蛋白复合物的热循环方法,诸如在段落 6.5.1 至 6.5.4 中所述。典型地,所述方法包括使得包含脂质颗粒(“脂质成分”)和脂质-结合蛋白或者肽(“蛋白成分”)的混悬液进行多个热循环,直到大部分蛋白成分掺入至脂蛋白复合物中。所述方法通常使得所述混悬液在第一较高温度范围内的温度以及第二较低温度范围内的温度之间的温度进行循环,直到形成脂蛋白复合物。所述热循环方法的所述高和低温度范围是基于脂蛋白复合物的脂质和蛋白成分的相转变温度。可选择地,当所述脂质成分不显示确定的或者离散的相转变时(这可在使用具有不饱和的脂肪酸链的磷脂或者磷脂混合物时发生),所述热循环的高和低温度范围的差别为至少约 20°C,至多约 40°C 或者更大。例如,在一些实施方案中,所述低和高温度范围的差别为 20°C -30°C、20°C -40°C、20°C -50°C、30°C -40°C、30°C -50°C、25°C -45°C、35°C -55°C。

[0123] 对于脂质,所述相转变包括由已知为凝胶状态的紧密填充的有序的结构变化为已知为流体状态的松散填充的较无序的结构。脂蛋白复合物通常在本领域中通过以下方法来形成:将脂质颗粒和载脂蛋白在接近使用的具体脂质或者脂质混合物的转变温度进行孵育。所述脂质成分的相转变温度(其可由量热法确定) $\pm 12^{\circ}\text{C}$,更优选地 $\pm 10^{\circ}\text{C}$ 表示本公开方法中的“低”温度范围。在某些实施方案中,所述低温度范围为所述脂质成分的相转变温度的 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 或者 $\pm 8^{\circ}\text{C}$ 。在一个具体实施方案中,所述低温度范围为所述脂

质成分的相转变温度的不小于 -5°C 或者不小于 -10°C 至 $+5^{\circ}\text{C}$ 。

[0124] 对于蛋白,所述相转变温度涉及由三级结构变化为二级结构。所述蛋白成分的相转变温度 $\pm 12^{\circ}\text{C}$,更优选 $\pm 10^{\circ}\text{C}$ 表示本公开的方法中的“高”温度范围。在一些具体的实施方案中,所述高温范围范围为所述蛋白成分的相转变温度的 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 或者 $\pm 8^{\circ}\text{C}$ 。在一个具体实施方案中,所述低温范围范围为所述蛋白成分的相转变温度的 -10°C 至不超过 $+5^{\circ}\text{C}$ 、不超过 $+10^{\circ}\text{C}$ 或者不超过 $+15^{\circ}\text{C}$ 。

[0125] 所述起始混悬液(即并未进行热循环的混悬液)的脂质成分优选包含脂质颗粒,例如主要包含不与脂质-结合蛋白复合的脂质。所述脂质成分的组成通常描述于如下段落 6.5.2。

[0126] 所述起始混悬液的蛋白成分优选含有这样的脂质-结合肽和/或者蛋白,所述脂质-结合肽和/或者蛋白不与脂质复合,或者以与在预期复合物中的蛋白/肽与脂质的比相比大至少 5-倍(例如至少 5-倍、至少 10-倍或者至少 20-倍)的蛋白/肽与脂质的比与脂质组合。所述蛋白成分的组成通常描述于如下段落 6.1 和段落 6.5.3。优选根据在段落 6.1.2 中所述的方法制备所述蛋白成分和/或者根据在段落 6.1.3 或者 6.1.4 中所述的方法纯化所述蛋白成分。

[0127] 在本公开的方法中,将含有所述蛋白成分和脂质成分的混悬液通常在高温范围 and 低温范围之间(优选起始于在高温范围中的温度)进行热循环,直到形成脂蛋白复合物。使用适当量的脂质和蛋白成分(例如如在美国专利公开 2006-0217312A1 中所述,将其内容通过引用的方式并入本申请),在若干循环之后可实现所述脂质和蛋白成分的基本完全复合。适于热循环方法的对于蛋白和脂质化学计量的进一步详述描述于段落 6.5.4 中。

[0128] 由所述方法产生的复合物通常为超分子集合体,其形态为胶束、小泡、球状或者盘状颗粒,其中所述蛋白成分与所述脂质成分在具体的化学计量范围进行物理结合,其具有均匀的粒度分布。本公开的方法有利地导致所述在起始混悬液中的脂质和/或者蛋白基本上完全复合,这获得基本上不含游离脂质和/或者游离蛋白的组合物,如通过分离方法诸如色谱法所观察。因此,本公开的方法可在不存在纯化步骤的情况下进行。

[0129] 在起始混悬液中的脂质成分通常为颗粒形式。优选的是所述颗粒的粒度主要为至少 45nm、至少 50nm、至少 55nm 或者至少 60nm,其粒度范围为至多 65nm、至多 70nm、至多 75nm、至多 80nm、至多 100nm、至多 120nm、至多 150nm、至多 200nm、至多 250nm、至多 300nm、至多 500nm,例如,45nm 至 100nm 或者 45nm 至 250nm,更优选 50nm 至 90nm,且最优选 55nm 至 75nm。在优选的实施方案中,所述脂质颗粒主要包含蛋-鞘磷脂且粒度为 55nm 至 75nm。在另外优选的实施方案中,所述脂质颗粒主要包含一种或者多种合成鞘磷脂(例如棕榈酰鞘磷脂或者植物鞘磷脂)且粒度为 175nm 至 250nm。在另外优选的实施方案中,所述脂质颗粒主要包含一种或者多种合成脂质(例如棕榈酰鞘磷脂或者植物鞘磷脂)且粒度为 250nm 至 1000nm。在另外优选的实施方案中,所述脂质颗粒主要包含一种或者多种合成脂质(例如棕榈酰鞘磷脂或者植物鞘磷脂)且粒度为 1000nm 至 4000nm。本申请所指的粒度为经动态光散射确定的 ζ (Z) 平均粒度。高压匀浆例如微流化(microfluidization)有利地产生具有适当粒度的脂质颗粒。用于形成颗粒的其它方法披露于如下段落 6.5.2 中,且可用作匀浆化的替代方法。如果所述方法产生不在优选的粒度范围内的颗粒,则所述颗粒可进行

粒度滤过以获得具有适当粒度的颗粒。

[0130] 本申请所述的制备脂蛋白复合物的方法有利地产生其粒度分布为均匀的复合物，这避免了对于粒度分级的需要。此外，本公开的方法导致将起始的蛋白基本上完全掺入（例如至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99%）至脂蛋白颗粒中。因此，本公开提供了包含脂蛋白复合物的组合物，且其中在所述组合物中的至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99% 的脂质 - 结合蛋白与脂质复合，例如使用凝胶渗透色谱法所确定。在一些具体的实施方案中，本公开提供了包含脂蛋白复合物的组合物，所述脂蛋白复合物具有以下的 ζ 平均粒度：4nm 至 20nm，例如 4nm 至 20nm、4nm 至 15nm、4nm 至 12nm、5nm 至 15nm、5nm 至 12nm、5nm 至 10nm、5nm 至 20nm、6nm 至 15nm 或者 8nm 至 12nm，且其中所述组合物中的至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99% 的脂质 - 结合蛋白与脂质复合，例如使用凝胶渗透色谱法所确定。根据本申请所述的方法使脂质颗粒与脂蛋白进行热循环通常导致具有以下粒度的脂蛋白颗粒群体：4nm 至 15nm，例如 6nm 至 15nm、5nm 至 12nm 或者 8nm 至 12nm。进行热循环的所述脂质颗粒的粒度的范围可为 50nm 至 250nm。在优选的实施方案中，所述脂质颗粒主要包含蛋 - 鞘磷脂且粒度为 55 至 75nm。在另外优选的实施方案中，所述脂质颗粒主要包含一种或者多种合成鞘磷脂（例如植物鞘磷脂）且粒度为 175nm 至 250nm。

[0131] 在制备脂蛋白复合物的方法中的一个或者多个步骤可在惰性气体下进行。实施该步骤可降低或者防止载脂蛋白和 / 或者脂质的氧化，由此降低副作用诸如肝损伤的风险。适当的惰性气体包括氮气、氦气和氩气。

[0132] 通过如上所述的方法获得的或者可获得的脂蛋白复合物特别适于治疗用途，这是因为在形成复合物后不需要进一步的纯化步骤。

[0133] 本公开还提供了脂蛋白复合物群体和药物组合物，所述药物组合物包含本申请所述的脂蛋白复合物或者其群体，且可任选地包含一种或者多种药用载体、赋形剂和 / 或者稀释剂。在一些实施方案中，将所述药物组合物以适于给药的单位剂量进行包装。例如，在一些实施方案中，所述组合物包含在密封瓶中包装的单位剂量的干燥（例如低压冻干）的脂蛋白复合物。所述组合物适于用水、生理溶液（诸如盐水）或者缓冲剂重建，且经注射给药。所述组合物可任选地包含一种或者多种抗结块剂和 / 或者抗团聚剂以便于所述荷电复合物的重建，或者可包含设计用于调节所述重建混悬液的 pH、渗透度和 / 或者盐度的一种或者多种缓冲剂、等渗剂（例如蔗糖和 / 或者甘露醇）、糖或者盐（例如氯化钠）。如上所述的脂蛋白复合物群体和 / 或者药物组合物可在使得氧化最小化的条件下制备，由此降低由氧化产物所引起的副作用诸如肝损伤的风险。例如，药物组合物可在惰性气体诸如氮气、氦气或者氩气下制备。

[0134] 对于商业应用，有用的是进行脂蛋白复合物和药物组合物的大规格的制备。因此，本公开还提供了包含脂蛋白复合物的至少 1L、2L、5L 或者 10L 且至多 15L、20L、30L、50L 或者更大的制剂（例如 5L 至 30L、10L 至 15L 或者 30L 至 50L 的制剂），其量足以实现脂质 - 结合蛋白的以下浓度：至少约 3mg/mL、至少约 4mg/mL 或者至少约 5mg/mL，且至多约 10mg/mL、约 15mg/mL 或者约 20mg/mL，优选范围为约 8mg/mL 至约 12mg/mL，最优选约 8mg/mL。在一个具体的实施方案中，所述制剂具有 15L 至 25L 的体积且含有约 100g 至约 250g 的 ApoA-I。在另外的具体实施方案中，所述制剂具有 30L 至 50L 的体积且含有约 240g 至约 780g 的

ApoA-I。

[0135] 本申请所述的脂蛋白复合物用于治疗动物最优选人类中的血脂异常障碍。所述病症包括但不限于高脂血症且特别是高胆固醇血症（包括杂合的和纯合的家族性高胆固醇血症），以及心血管疾病诸如动脉粥样硬化（包括治疗和预防动脉粥样硬化）和动脉粥样硬化的众多临床表现诸如中风、缺血性中风（ischemic stroke）、短暂性缺血发作、心肌梗塞、急性冠脉综合征（acute coronary syndrome）、心绞痛、间歇性跛行、严重肢体缺血（critical limb ischemia）、心瓣狭窄（valve stenosis）和房脉瓣硬化（atrial valve sclerosis）；再狭窄（例如预防或者治疗动脉粥样硬化斑块，其作为医学操作诸如气囊血管成形术的结果发展）；以及其它病症诸如内毒素血症，其通常导致感染性休克。

[0136] 已经发现，本申请所述的脂蛋白复合物和组合物当以低于迄今为止所研究的其它脂蛋白复合物所使用的剂量的剂量给药时影响和 / 或者促进胆固醇外流。参见例如 Spieker et al., 2002, *Circulation* 105:1399-1402（使用 80mg/kg 的剂量）；Nissen et al., 2003, *JAMA* 290:2292-2300（使用 15mg/kg 或者 40mg/kg 的剂量）；Tardif et al., 2007 *JAMA* 297:1675-1682（使用 40mg/kg 至 80mg/kg 的剂量），使用范围为 15mg/kg 至 80mg/kg 的剂量。此外，已经发现本申请所述的脂蛋白复合物具有减少的副作用。如下在实施例中所显示，已经发现本公开的脂蛋白复合物在低至 2mg/kg 的剂量有效地动员胆固醇，相反地先前给予人类患者的脂蛋白复合物不显著地提升甘油三酯、VLDL 和肝酶诸如转氨酶的水平（c. f., Nanjee et al., 1999, *Arterioscler. Vasc. Throm. Biol.* 19:979-89）。此外，在具有正常肝和 / 或者肾功能的正常受试者中，即使当剂量增至约 15mg/kg（缺乏甘油三酯升高）或者高达 45mg/kg（缺乏转氨酶增加）时也观察到减少的副作用。因此，本公开复合物的在给药时不产生副作用的能力优选在具有正常肝功能、正常肾功能或者正常肝功能和正常肾功能的个体中进行评估。

[0137] 在不被理论所束缚的情况下，发明人将本公开脂蛋白复合物的益处归因于相比于先前治疗而言复合物的更均匀的粒度分布以及损伤的蛋白和 / 或者脂质（例如氧化的蛋白、被脱去酰胺的蛋白以及氧化的脂质）的降低的量。进一步认为包含负电荷磷脂的所述脂质部分将使得本申请所述的复合物和组合物相比于常规脂蛋白复合物而言具有改善的治疗性质。在小盘状前- β HDL 颗粒（其在肾中降解）和大盘状和 / 或者球状 HDL（其被肝识别，在所述肝中，它们的胆固醇被储存、再循环、代谢（作为胆汁酸）或者清除（在胆汁中））之间的关键差异中的一种是颗粒的电荷。相比于荷负电的大盘状和 / 或者球状 HDL 颗粒而言，所述小盘状前- β HDL 颗粒具有较小的表面负电荷。认为较大的负电荷是引起所述颗粒被肝识别且因此避免所述颗粒被肾分解代谢的因素中的一种。此外，已经显示肾不能容易地吸收荷电颗粒（参见 Hacker et al., 2009, *Pharmacology: Principles and Practice*, 183）。因此，部分由于存在荷电磷脂，认为本申请所述的荷负电的脂蛋白复合物和组合物相比于常规脂蛋白复合物而言在循环中停留更长，或者电荷将以电荷依赖性方式影响所述脂蛋白的半衰期。预期的是，它们的较长的循环（停留）时间以及所述复合物与存在的 HDL 的凝聚和融合的比率和 / 或者程度的降低（作为荷负电的结果）的结合将促进胆固醇动员（通过给予所述复合物更多的蓄积胆固醇的时间）和酯化（通过提供更多的 LCAT 催化酯化反应的时间）。所述电荷也可增加胆固醇捕获和 / 或者除去的比率，由此促进更大量的胆固醇的除去。因此，预期的是本申请所述的荷负电的脂蛋白复合物和组合

物将提供优于常规脂蛋白疗法的治疗益处,这是因为需要给予的复合物和 / 或者组合物较少,且通常在较少地给予时,副作用降低。

[0138] 因此,本申请提供的方法通常包括向受试者给予治疗有效量的本申请所述的脂蛋白复合物、脂蛋白复合物的群体或者药物组合物以治疗或者预防血脂异常障碍。所述脂蛋白复合物每次注射可以以下剂量来给予:范围为约 0.25mg/kg ApoA-I 等价物至约 45mg/kg,例如约 0.5mg/kg 至约 30mg/kg 或者约 1mg/kg ApoA-I 等价物至最多约 15mg/kg ApoA-I 等价物。通过选择使得甘油三酯、VLDL-胆固醇和 / 或者 VLDL-甘油三酯水平增加最小化的剂量,所述剂量可进一步针对待治疗的个体来制定。在一些具体的实施方案中,所述剂量为约 3mg/kg、约 6mg/kg 或者约 12mg/kg。

[0139] 所述方法进一步包括以如下间隔来给予所述脂蛋白复合物:间隔范围为 5 至 14 天,或者 6 至 12 天,诸如一周或者两周。所述方法可进一步包括以如上所述的任意间隔且优选为一周的间隔给予所述脂蛋白复合物 4、5、6、7、8、9、10、11、12 或者至多 52 次。例如,在一个实施方案中,给予所述脂蛋白复合物六次,在每次给药之间的间隔为 1 周。对于慢性病症,可进行多于 52 次给药。任选地,所述方法可由初始诱导期来开始,其中更频繁地给予所述脂蛋白复合物。

[0140] 复合物和 / 或者其药物组合物可经肠胃外给药,例如静脉内给药。静脉内给药可作为历时范围为约 1 至约 24 小时或者约 1 至 4 小时、约 0.5 至 2 小时或者约 1 小时的时间的输注来完成。

[0141] 如下实施例显示在以 30mg/kg 和 45mg/kg 的剂量给药后甘油三酯水平少量增加,这可解释为由高程度的胆固醇动员所导致的 VLDL 和 LDL 的增加。可在治疗过程中控制这些参数,这是因为它们可在医院实验室中使用标准脂质表盘来进行常规测量。基于如下实施例,可实现剂量选择以使得甘油三酯和 VLDL-胆固醇和 VLDL-甘油三酯水平的增加最小化,这取决于患者对药物的反应,其允许个体化类型药物。

[0142] 所述复合物和 / 或者组合物可单独给药(作为单一疗法),或者可选择地,它们可与用于治疗 and / 或者预防血脂异常和 / 或者与其相关的病症、疾病和 / 或者障碍的其它治疗剂一起给药。可与本申请所述的荷负电的脂蛋白复合物和组合物一起给药的所述治疗剂的非限制性实例包括胆汁酸结合树脂、HMGCoA 还原酶抑制剂(他汀类药物)、烟酸、树脂、胆固醇吸收抑制剂、血小板聚集抑制剂、贝特类药物、抗凝血剂、CETP 抑制剂(例如安塞曲匹和达塞曲匹)和 / 或者 PCSK9 抗体或者配体。

5. 附图说明

[0143] 图 1:人前原-载脂蛋白 A-I 的氨基酸序列(SEQ ID NO:1;GenBank 登记号 AAB59514.1)。粗体字体的氨基酸 1-18 相应于 ApoA-I 的信号序列,且下划线标记的氨基酸 19-24 相应于前肽序列。信号序列和前肽序列均在细胞中断开以产生全长成熟人 ApoA-I(氨基酸 25-267)。

[0144] 图 2:在表达 ApoA-I 的重组 S-CHO 细胞的 12 天加料分批培养物中的 ApoA-I 滴定。通过由第 0 代向第 43 代的连续传代将细胞连续培养。在第 4、8、14、19、25、21、36 和 43 代通过反相 HPLC 来监测 ApoA-I 产生。ApoA-I 在培养基中的量在 1259mg/L 至 1400mg/L 变化。

[0145] 图 3A-3B :图 3A 显示在表达 ApoA-I 的重组 S-CHO 细胞的 200L 13 天培养物中的存活细胞密度。在第 9 天观察到存活细胞密度的最大值 33.20×10^5 个细胞 /mL, 存活率为 92.5%。图 3B 显示在 13 天培养中 ApoA-I 在培养基中的浓度。在第 12 天观察到 ApoA-I 在培养基中的浓度的最大值, 约为 2mg/mL。

[0146] 图 4 :通过本申请所述的方法纯化的 ApoA-I 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶。左侧泳道显示分子量标记。右侧泳道显示具有约 28kD 的分子量的纯化的 ApoA-I。

[0147] 图 5A-5D :蛋白 : 脂质重量比为 1:2.5 (式 A ;图 5A)、1:2.7 (式 B ;图 5B)、1:3.1 (式 C ;图 5C) 的原 ApoA-I/SM 复合物的 HPLC 色谱图以及蛋白 : 脂质重量比为 1:2.7 (式 D ;图 5D) 的原 ApoA-I/SM/DPPC 复合物的 HPLC 色谱图。

[0148] 图 6A-6D :分别在 10、20、30 和 60 分钟的式 D 的脂蛋白复合物的 HPLC 色谱图。

[0149] 图 7A-7D :分别在 10、20、30 和 50 分钟的式 B 的脂蛋白复合物的 HPLC 色谱图。

[0150] 图 8A-8D :分别在 20、40、60 和 120 分钟的式 F 的脂蛋白复合物的 HPLC 色谱图。

[0151] 图 9 :随时间推移前-β HDL 复合物的形成的图表, 其示例说明了具有 1:2.7 的脂蛋白 : 总磷脂的 wt:wt 比的脂蛋白复合物的形成, 包括原 ApoA-I 和 SM (式 B) ;原 ApoA-I、SM、DPPC 和 DPPG, 其中 SM:DPPC:DPPG wt:wt 比为 48:48:4 (式 F) ;以及原 ApoA-I、SM、DPPC 和 DPPG, 其中 SM:DPPC:DPPG wt:wt 比为 73:23:4 (式 G)。

[0152] 图 10A-10D :式 E、H、I 和 J 各自的 HPLC 色谱图。

[0153] 图 11 :制备脂蛋白复合物的示例性方法的示意图。

[0154] 图 12 :针对非商业规格热循环运行所使用的示例性热循环装置。

[0155] 图 13A-13E :具有增加数目的热循环的 SM/DPPG/ApoA-I 蛋白复合物的凝胶渗透色谱。使所述成分在 57°C 和 37°C 之间进行热循环, 在每个温度进行 5 分钟, 总计 30 分钟 (图 13A)、60 分钟 (图 13B)、120 分钟 (图 13C)、180 分钟 (图 13D) 或者 210 分钟 (图 13E)。

[0156] 图 14 :SM/ApoA-I 复合物的凝胶渗透色谱。

[0157] 图 15 :N- 棕榈酰-4- 羟基二氢鞘氨醇-1- 磷酸胆碱 (植物 SM 或者植物鞘磷脂的一种形式)/DPPG/ApoA-I 复合物的凝胶渗透色谱。

[0158] 图 16 :合成棕榈酰 SM/DPPG/ApoA-I 复合物的凝胶渗透色谱。

[0159] 图 17 :植物鞘磷脂 /DPPG/ApoA-I 复合物的凝胶渗透色谱。

[0160] 图 18 :SM/DPPC/DPPG/ApoA-I 肽复合物的凝胶渗透色谱。

[0161] 图 19A-19D :使用 Malvern Instruments Zetasizer (Malvern Instruments Inc.) 通过动态光散射系统表征脂质颗粒。在图 19A 中, 所述 Z 平均值为 84.49nm (“84nm 颗粒”) ;在图 19B 中, 所述 Z 平均值为 76.76nm (“77nm 颗粒”) ;在图 19C 中, 所述 Z 平均值为 66.21nm (“66nm 颗粒”) ;以及在图 19D 中, 所述 Z 平均值为 59.50nm (“60nm 颗粒”)。

[0162] 图 20A-20D :具有 84nm (图 20A)、77nm (图 20B)、66nm (图 20C) 和 60nm (图 20D) 的脂质颗粒的复合物在五次热循环后的凝胶渗透色谱图。

[0163] 图 21A-21B :用 450nm (图 21A) 和 40nm (图 21B) 的脂质颗粒开始的复合物在六次热循环后的凝胶渗透色谱图。

[0164] 图 22 :用 65nm 的脂质颗粒开始的复合物在六次热循环后的凝胶渗透色谱, 其中第一循环起始于 37°C 的“低温度”。

[0165] 图 23 :制备包含脂蛋白复合物的药物组合物的示例性实施方案的示意图, 其包括

将经本公开方法产生的脂蛋白复合物配制为商业上有效的药物组合物。

[0166] 图 24 :在输注式 B 和式 H 的脂蛋白复合物后血浆 VLDL- 总胆固醇水平的增加。以 5mg/kg 的剂量将式 H(■) 和式 B(▼) 的脂蛋白复合物输注至禁食的兔子。减去三组的范围为 0.03 至 0.3g/L 的基线值以确定血浆 VLDL- 总胆固醇水平的增加。

[0167] 图 25 :在输注式 B 和式 H 的脂蛋白复合物后血浆甘油三酯水平的增加。以 5mg/kg 的剂量将式 H(■) 和式 B(▲) 的脂蛋白复合物输注至禁食的兔子。减去三组的范围为 0.31 至 0.71g/L 的基线值以确定血浆甘油三酯水平的增加。

[0168] 图 26A-26D :相比于稀释剂(■),在兔子中输注 5mg/kg 或者 20mg/kg 以及 20mg/kg 的 ApoA-I/ 蛋 SM 复合物(●, ▲) 或者 ApoA-I/ 合成 SM 复合物(◆, ▼) 后血浆总胆固醇(图 26A)、甘油三酯(图 26B)、磷脂(图 26C) 和 ApoA-I(图 26D) 的增加。对于不同血浆脂质所测量的基线值的范围如下:对于血浆胆固醇,0.28 至 0.4g/L;对于血浆甘油三酯,0.23 至 0.29g/L;且对于血浆磷脂,0.45 至 0.61g/L。

[0169] 图 27A-27C :相比于稀释剂(■),在兔子中输注 5mg/kg ApoA-I/ 蛋 SM 复合物(●) 以及 ApoA-I/ 合成 SM 复合物(◆) 后血浆 HDL- 总胆固醇(图 27A)、LDL- 总胆固醇(图 27B) 和 VLDL- 总胆固醇(图 27C) 的增加。基线值的范围如下:对于血浆 HDL- 总胆固醇,0.20 至 0.31g/L;对于血浆 LDL- 总胆固醇,0.06 至 0.09g/L;以及对于血浆 VLDL- 总胆固醇,0.007 至 0.011g/L。

6. 具体实施方式

[0170] 本公开提供了脂蛋白复合物、其群体以及制备所述脂蛋白复合物的方法。所述复合物以及其群体和组合物(例如药物组合物)用于治疗 and / 或者预防血脂异常和 / 或者与血脂异常相关的疾病、障碍和 / 或者病症。如在发明内容章节中所讨论的,所述脂蛋白复合物包含优选已确定重量或者摩尔比的两个主要部分,即载脂蛋白部分和磷脂部分,且优选包含特定量的中性磷脂以及任选的一种或者多种负电荷磷脂。

[0171] 6.1. 蛋白部分

[0172] 本公开提供了包含蛋白部分的脂蛋白复合物。本公开进一步提供了制备脂蛋白复合物的方法。所述脂蛋白复合物的蛋白成分对于本发明方法的成功而言不是关键的。事实上,任何提供治疗和 / 或预防益处的脂质-结合蛋白诸如载脂蛋白和 / 或其衍生物或类似物均可包括在该复合物中。此外,由于在与脂质缔合时可活化 LCAT 或者形成盘状颗粒而“模拟”载脂蛋白(例如 ApoA-I)活性的任何 α -螺旋肽或肽类似物或任何其它类型的分子可包含在脂蛋白复合物中,并且涵盖在术语“脂质-结合蛋白”内。

[0173] 6.1.1. 脂质结合蛋白

[0174] 本公开进一步提供了纯化重组产生的蛋白的方法,所述重组产生的蛋白例如用于制备脂蛋白复合物。所述重组产生的蛋白最适当地为载脂蛋白。适当的蛋白包括载脂蛋白 ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoA-V 和 ApoE;优选为成熟形式。脂质-结合蛋白也包括前述载脂蛋白的活性多晶型、同等型、变体和突变体以及截短形式,其中最常见的是载脂蛋白 A-I_{米兰}(ApoA-I_M)、载脂蛋白 A-I_{巴黎}(ApoA-I_P) 和载脂蛋白 A-I_{萨拉戈萨}(ApoA-I_Z)。含有半胱氨酸残基的载脂蛋白突变体也是已知的,且也可使用(参见例如美国公开 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,可使

用 ApoA-I (Duverger et al., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12):1424-29)、ApoA-I_M (Franceschini et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260:1632-35)、ApoA-I_P (Daum et al., 1999, *J. Mol. Med.* 77:614-22)、ApoA-II (Shelness et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(14):8637-46; Shelness et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(15):9929-35)、ApoA-IV (Duverger et al., 1991, *Euro. J. Biochem.* 201(2):373-83)、ApoE (McLean et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258(14):8993-9000)、ApoJ 和 ApoH 的同源二聚体和异源二聚体 (在可行的情况下)。所述载脂蛋白可以包括与促进其分离的元件 (比如 His 标签) 或经设计用于其它目的其它元件相应的残基, 只要当该载脂蛋白包含在复合物中时能够保留一些生物活性即可。

[0175] 如本领域所公知的, 所述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, 参见例如 Chung et al., 1980, *J. Lipid Res.* 21(3):284-91; Cheung et al., 1987, *J. Lipid Res.* 28(8):913-29。也参见美国专利 5,059,528、5,128,318、6,617,134; 美国公开 20002/0156007、2004/0067873、2004/0077541 和 2004/0266660; 以及 PCT 公开 WO/2008/104890 和 WO/2007/023476。纯化的其它方法也是可能的, 例如如下在章节 6.1.3 和 6.1.4 中所述。

[0176] 适合作为载脂蛋白用于本申请所述的复合物及组合物中的、与载脂蛋白相应的肽和肽类似物以及模拟 ApoA-I、ApoA-I_M、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 6,004,925、6,037,323 和 6,046,166 (授予 Dasseux et al.)、美国专利 5,840,688 (授予 Tso)、美国公开 2004/0266671、2004/0254120、2003/0171277 和 2003/0045460 (Fogelman 的)、美国公开 2003/0087819 (Bielicki 的) 以及 PCT 公开 WO/2010/093918 (Dasseux et al. 的), 将它们的内容通过引用的方式并入本申请。这些肽和肽类似物可包括 L-氨基酸或者 D-氨基酸或者 L-和 D-氨基酸的混合物。它们也可包括一种或者多种非肽或酰胺键, 诸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所述“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 6,004,925、6,037,323 和 6,046,166 中描述的技术。

[0177] 所述复合物可包括单一类型的脂质-结合蛋白, 或者两种或者更多种不同的脂质-结合蛋白的混合物, 其可以源自相同或不同的物种。尽管不必需, 但是所述脂蛋白复合物仍优选包含源自受治疗动物物种的脂质-结合蛋白或者氨基酸序列与受治疗动物物种相对应的脂质-结合蛋白, 以避免诱导对治疗的免疫应答。因此, 对于人类患者的治疗, 人源的脂质-结合蛋白优选用于本公开的复合物中。肽模拟物载脂蛋白的使用也可降低或避免产生免疫应答。

[0178] 在某些优选的实施方案中, 所述脂质-结合蛋白为具有与成熟人 ApoA-I 蛋白至少 95% 序列同一性的氨基酸序列的蛋白, 例如具有相应于 SEQ ID NO:1 的位置 25-267 的氨基酸序列的蛋白。在某些实施方案中, 所述成熟人 ApoA-I 蛋白具有与 SEQ ID NO:1 的位置 25-267 至少 96%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, 所述成熟人 ApoA-I 蛋白具有在位置 1 (即相应于 SEQ ID NO:1 的位置 25 的位置) 上具有门冬氨酸的氨基酸序列。在一个具体的实施方案中, 所述成熟人 ApoA-I 蛋白具有相应于 SEQ ID NO:1 的位置 25-267 的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中, 所述 ApoA-I 蛋白在哺乳动物宿主细胞最优选为中国仓鼠卵巢 (“CHO”) 细胞中重组产生, 如在

下述小章节中所述。

[0179] 6.1.2. 载脂蛋白的重组表达

[0180] 本公开提供了用于产生脂质结合蛋白诸如 ApoA-I 的重组表达方法,以及相关的核酸、哺乳动物宿主细胞、细胞培养物。如本申请所述,可将所得的重组脂质结合蛋白纯化和 / 或者掺入脂蛋白复合物。

[0181] 一般而言,对于重组产生,将编码脂质 - 结合蛋白或者肽的多核苷酸序列插入适当的表达媒介物中,所述媒介物即为含有所插入的编码序列的转录和翻译所必需元件的载体,或者在 RNA 病毒载体的情况下,其为复制和翻译所必需的元件。所述表达载体可衍生自病毒诸如腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、逆转录病毒或者慢病毒。然后将表达媒介物转染至适当靶标细胞,该细胞表达蛋白或者肽。适当的宿主细胞包括但不限于细菌类、哺乳动物或者昆虫宿主细胞系统,包括杆状病毒系统(参见例如 Luckow et al., Bio/Technology, 6, 47 (1988)) 以及确立的细胞系诸如 293、COS-7、C127、3T3、CHO、HeLa、BHK 等。取决于所使用的表达系统,然后将所表达的肽通过本领域熟知的操作分离。重组蛋白和肽产生的方法为本领域熟知的(参见,例如 Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; 以及 Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 将其各自的内容通过引用的方式并入本申请)。

[0182] 当 ApoA-I 为脂质结合蛋白时, ApoA-I 蛋白由编码 ApoA-I 的重组核苷酸序列表达。在一些实施方案中,编码 ApoA-I 的核苷酸序列来自人类。人 ApoA-I 核苷酸序列的非限制性实例披露于美国专利 5,876,968 ; 5,643,757 ; 和 5,990,081 以及 WO 96/37608 ; 将其各自的内容通过引用的方式并入本申请。在某些实施方案中,所述核苷酸序列编码成熟 ApoA-I 蛋白的氨基酸序列,其优选可操作地连接至用于从宿主细胞分泌 ApoA-I 的信号序列(例如 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-18) 和 / 或者前蛋白序列(例如 SEQ ID NO:1 的氨基酸 19-25)。适用于定向分泌 ApoA-I 的其它信号序列可对于 ApoA-I 例如人白蛋白信号肽或者人 IL-2 信号肽是异源性的,或者对于 ApoA-I 是同源性的。

[0183] 优选地,所述核苷酸序列编码成熟人 ApoA-I 多肽,例如具有与相应于 SEQ ID NO:1 的位置 25-267 的氨基酸序列至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99% 相同的氨基酸序列的多肽,任选地其中所述氨基酸序列在位置 25 包含门冬氨酸。在优选的实施方案中,所述核苷酸序列编码具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的多肽。所述核苷酸序列也可编码具有与人 ApoA-I 蛋白的氨基酸序列至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99% 相同的氨基酸序列的多肽,所述人 ApoA-I 蛋白的氨基酸序列阐述于 GenBank 登记号 NP_000030、AAB59514、P02647、CAA30377、AAA51746 或者 AAH05380.1 中的一种,其任选地在相应于成熟人 ApoA-I 蛋白的第一氨基酸的位置包含门冬氨酸。

[0184] 所述 ApoA-I 编码多核苷酸可为针对在重组宿主细胞中表达所优化的密码子。优选的宿主细胞为哺乳动物宿主细胞,包括但不限于中国仓鼠卵巢细胞(例如 CHO-K1 ; ATCC No. CCL 61 ; CHO-S (GIBCO Life Technologies Inc., Rockville, MD, 目录 #11619012))、VERO 细胞、BHK (ATCC No. CRL 1632)、BHK 570 (ATCC No. CRL 10314)、HeLa 细胞、COS-1 (ATCC No. CRL 1650)、COS-7 (ATCC No. CRL 1651)、MDCK 细胞、293 细胞 (ATCC No. CRL 1573 ; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977)、3T3 细胞、骨髓瘤细胞(特别是鼠类)、PC12 细胞和

W138 细胞。在某些实施方案中,所述哺乳动物细胞诸如 CHO-S 细胞 (Invitrogen™, Carlsbad CA) 适于在无血清培养基中生长。另外适当的细胞系为本领域已知的且获自公共储藏室诸如 American Type Culture Collection, Manassas, Va。

[0185] 对于 ApoA-I 的重组表达,编码 ApoA-I 的多核苷酸可操作地连接至一个或者多个控制序列例如启动子或者终止子,其调节 ApoA-I 在感兴趣的宿主细胞中的表达。所述一个或者多个控制序列可对于 ApoA-I- 编码序列而言是天然的或者外源的,且也对于其中表达 ApoA-I 的宿主细胞而言是天然的或者外源的。控制序列包括但不限于启动子、核糖体结合位点、先导序列、多腺苷酸化序列、前肽序列、信号肽序列和转录终止子。在一些实施方案中,所述控制序列包括启动子、核糖体结合位点以及转录和翻译终止信号。所述控制序列也可包括用于引入特定限制位点的目的的一种或者多种衔接物,这促进所述控制序列与编码 ApoA-I 的核苷酸序列的编码区的连接。

[0186] 驱动 ApoA-I 的重组表达的启动子可为构成性启动子、调节性启动子或者诱导性启动子。适当的启动子序列可获自编码细胞外或者细胞内多肽的基因,其对于宿主细胞而言是内源性或者异源性的。用于具有可变长度的启动子的分离、鉴别和处理的方法可在本领域中获得或者可从本领域容易地修改。参见例如 Nevoigt et al. (2006) Appl. Environ. Microbiol. 72:5266-5273,将其内容通过引用的方式并入本申请。

[0187] 一种或者多种控制序列可衍生自病毒来源。例如,在某些方面,启动子衍生自多瘤或者腺病毒主要后期启动子。在其它方面,所述启动子衍生自猿猴病毒 40 (SV40),其可作为还含有 SV40 病毒复制起始区的片段来获得 (Fiers et al., 1978, Nature, 273:113-120) 或者来自巨细胞病毒例如猿猴巨细胞病毒立即早期启动子 (参见美国专利 4,956,288)。其它适当的启动子包括来自金属硫蛋白基因的那些 (参见美国专利 4,579,821 和 4,601,978)。

[0188] 本申请还提供了重组 ApoA-I 表达载体。重组表达载体可为可通过重组 DNA 技术来处理以便于异源性 ApoA-I 在重组宿主细胞中的表达的任何载体,例如质粒或者病毒。可将所述表达载体整合至重组宿主细胞的染色体中且其包含一种或者多种可操作地连接至一种或者多种用于产生 ApoA-I 的控制序列的异源性基因。在其它实施方案中,所述表达载体为染色体外复制的 DNA 分子,例如线性或者闭合的环状质粒,发现其具有低拷贝数 (例如约 1 至约 10 个拷贝 / 基因组当量) 或者高拷贝数 (例如多于约 10 个拷贝 / 基因组当量)。在多个实施方案中,所述表达载体包括可选标记,诸如使得包含所述载体的重组宿主有机体具有抗菌素抗性 (例如氨苄西林、卡那霉素、氯霉素或者四环素抗药性) 的基因。在具体的方面,所述 DNA 构成物、载体和多核苷酸适于 ApoA-I 在哺乳动物细胞中的表达。用于 ApoA-I 在哺乳动物细胞中的表达的载体可包含与宿主细胞系统相容的复制起始区、启动子以及任何必需的核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止子序列。在某些方面,所述复制起始区对于宿主细胞是异源性的,例如其为病毒来源 (例如 SV40、Polyoma、Adeno、VSV、BPV)。在其它方面,复制起始区通过宿主细胞染色体复制机制来提供。

[0189] 用于将外源 DNA 引入至哺乳动物宿主细胞中的方法、试剂和工具为本领域已知的且包括但不限于磷酸钙 - 介导的转染 (Wigler et al., 1978, Cell 14:725; Corsaro et al., 1981, Somatic Cell Genetics 7:603; Graham et al., 1973, Virology 52:456)、电穿孔 (Neumann et al., 1982, EMBO J. 1:841-5)、DEAE- 葡聚糖介导的转染 (Ausubel et al. (eds.), Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (John Wiley & Sons

1995)) 和脂质体介导的转染 (Hawley-Nelson et al., 1993, Focus 15:73; Ciccarone et al., 1993, Focus 15:80)。

[0190] 对于高产率的生产, ApoA-I 的稳定表达是优选的。例如, 在将外源 DNA 引入至宿主细胞之后, 所述宿主细胞可在富集培养基中生长 1-2 天, 然后将其更换至选择性培养基中。并非使用含有病毒复制起始区的表达载体, 宿主细胞可使用具有包含 ApoA-I 编码序列的核苷酸序列的载体进行转化, 其通过适当的表达控制元件和可选标记来控制。所述载体中的可选标记赋予对选择的抗性且允许细胞稳定地将载体整合至它们的染色体中且生长以形成集落 (foci), 所述集落继而可被克隆且扩大至细胞系中。可使用众多选择系统, 包括但不限于可分别在 tk、hgprt 或者 aprt 细胞中采用的单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler et al., 1977, Cell 11:223)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (Szybalska&Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026) 和腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) 基因。同样地, 抗代谢药物抗性可用作选择基础, 其通过使用例如, dhfr, 其赋予对甲氨蝶呤的抗性 (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, 其赋予对麦考酚酸的抗性 (Mulligan&Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, 其赋予对氨基糖苷 G-418 的抗性 (Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); 和 / 或者 hyg, 其赋予对潮霉素的抗性 (Santerre et al., 1984, Gene 30:147)。

[0191] 稳定的高产率的表达也可通过使用整合至宿主细胞基因组的逆转录病毒载体来实现 (参见, 例如美国专利公开 2008/0286779 和 2004/0235173)。可选择地, ApoA-I 的稳定的高产率的表达可通过基因激活方法来实现, 其引起在所选的哺乳动物细胞的基因组 DNA 中的内源性 ApoA-I 基因的激活表达且将其扩增, 例如在 WO 1994/012650 中所述。增加 ApoA-I 基因 (含有 ApoA-I 编码序列和一种或者多种控制元件) 的拷贝数可促进 ApoA-I 的高产率表达。优选地, 其中表达 ApoA-I 的哺乳动物宿主细胞具有至少 2、至少 3、至少 4 或者至少 5 的 ApoA-I 基因拷贝指数。在一些具体的实施方案中, 其中表达 ApoA-I 的哺乳动物宿主细胞具有至少 6、至少 7、至少 8、至少 9 或者至少 10 的 ApoA-I 基因拷贝指数。

[0192] 在某些实施方案中, 所述哺乳动物细胞适于产生至少 0.5g/L、至少 1g/L、至少 1.5g/L、至少 2g/L、至少 2.5g/L、至少 3g/L、至少 3.5g/L 且任选地至多 4g/L、至多 4.5g/L、至多 5g/L、至多 5.5g/L 或者至多 6g/L 的量的 ApoA-I。所述哺乳动物宿主细胞优选能够在培养物中产生至少约 0.5、1、2 或者 3g/L 的 ApoA-I 和 / 或者在培养物中产生至多约 20g/L 的 ApoA-I, 例如在培养物中产生至多 4、5、6、7、8、9、10、12 或者 15g/L 的 ApoA-I。

[0193] 在某些实施方案中, 所述哺乳动物细胞适于在无血清培养基中生长。在这些实施方案中, 所述 ApoA-I 由所述细胞分泌。在其它实施方案中, 所述 ApoA-I 不由所述细胞分泌。

[0194] 本申请提供的哺乳动物宿主细胞可用于产生 ApoA-I。一般而言, 所述方法包括在表达 ApoA-I 的条件下培养本申请所述的哺乳动物宿主细胞。此外, 所述方法可包括由所述哺乳动物细胞培养物的上清液回收且任选纯化成熟 ApoA-I。

[0195] 所述培养条件 (包括培养基、温度、pH) 可适合待培养的哺乳动物宿主细胞以及所选的培养方式 (摇瓶、生物反应器、滚瓶等)。哺乳动物细胞可以在大规模分批培养物、连续培养物或者半连续培养物中生长。

[0196] 本申请还提供了哺乳动物细胞培养物, 其包含多个本申请所述的 ApoA-I 产生的

哺乳动物宿主细胞。在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞培养物包括至少 0.5g/L、至少 1g/L、至少 1.5g/L、至少 2g/L、至少 2.5g/L、至少 3g/L、至少 3.5g/L 且任选地至多 4g/L、至多 4.5g/L、至多 5g/L、至多 5.5g/L 或者至多 6g/L 的 ApoA-I。所述培养物可为任何规模,其范围为约 150mL 至约 500mL、1L、10L、15L、50L、100L、200L、250L、300L、350L、400L、500L、750L、1000L、1500L、2000L、2500L、3000L、5000L、7500L、10000L、15000L、20000L、25000L、50000L 或者更大。在一些情况下,所述培养物为大规模培养物,诸如 15L、20L、25L、30L、50L、100L、200L、300L、500L、1000L、5000L、10000L、15000L、20000L、25000L、至多 50000L 或者更大。

[0197] 6.1.3. 载脂蛋白的纯化

[0198] 本公开涉及获得高度纯化的载脂蛋白的方法,其用于制备本申请所述的脂蛋白复合物及其组合物。所述方法可应用于任何载脂蛋白,包括但不限于 ApoA-I、-II、-III 或者 -IV; ApoB48 和 ApoB100; ApoC-I、-II、-III 或者 -IV; ApoD; ApoE、ApoH; ApoJ。更具体地,本公开涉及获得高度纯化的 ApoA-I 的方法。在一些实施方案中,所述 ApoA-I 为具有选自(但不限于)下述序列的人蛋白:在 Genbank 登记号 NP_000030、AAB59514、P02647、CAA30377、AAA51746 和 AAH05380.1 中阐述的序列。在某些实施方案中,所述 ApoA-I 为如上在段落 6.1.2 中所述的人蛋白。在其它实施方案中,本公开的方法可用于纯化由非人动物(参见,例如美国公开 2004/0077541)例如,牛、马、羊、猴、狒狒、山羊、兔、狗、刺猬、獾、小鼠、大鼠、猫、豚鼠、仓鼠、鸭、鸡、鲑鱼和鳗鱼获得的 ApoA-I (Brouillette et al., 2001, *Biochim. Biophys. Acta.* 1531:4-46; Yu et al., 1991, *Cell Struct. Funct.* 16(4):347-55; Chen and Albers, 1983, *Biochim Biophys Acta.* 753(1):40-6; Luo et al., 1989, *J Lipid Res.* 30(11):1735-46; Blaton et al., 1977, *Biochemistry* 16:2157-63; Sparrow et al., 1995, *J Lipid Res.* 36(3):485-95; Beaubatie et al., 1986, *J. Lipid Res.* 27:140-49; Januzzi et al., 1992, *Genomics* 14(4):1081-8; Goulinet and Chapman, 1993, *J. Lipid Res.* 34(6):943-59; Collet et al., 1997, *J Lipid Res.* 38(4):634-44; 以及 Frank and Marcel, 2000, *J. Lipid Res.* 41(6):853-72)。

[0199] 可通过本申请披露的方法纯化的 ApoA-I 蛋白的实例包括但不限于前原载脂蛋白形式的 ApoA-I、原形式和成熟形式的 ApoA-I, 以及活化的多晶型、同等型、变体和突变体以及截短形式,例如 ApoA-I_M、ApoA-I_Z和 ApoA-I_P。ApoA-I_M为 ApoA-I 的 R173C 分子变体(参见,例如 Parolini et al., 2003, *J Biol Chem.* 278(7):4740-6; Calabresi et al., 1999, *Biochemistry* 38:16307-14; 以及 Calabresi et al., 1997, *Biochemistry* 36:12428-33)。ApoA-I_P为 ApoA-I 的 R151C 分子变体(参见,例如 Daum et al., 1999, *J Mol Med.* 77(8):614-22)。ApoA-I_Z为 ApoA-I 的 L144R 分子变体(参见 Recalde et al., 2001, *Atherosclerosis* 154(3):613-623; Fiddymment et al., 2011, *Protein Expr. Purif.* 80(1):110-116)。含有半胱氨酸残基的载脂蛋白 A-I 突变体也是已知的,并且也可通过本申请所述的方法纯化(参见,例如美国公开 2003/0181372)。用于本申请所述的方法的 ApoA-I 可为单体、同源二聚体或异源二聚体。例如,可制备的原 -ApoA-I 和成熟 ApoA-I 的同源二聚体和异源二聚体包括 ApoA-I (Duverger et al., 1996, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16(12):1424-29)、ApoA-I_M (Franceschini et al., 1985, *J Biol Chem.* 260:1632-35) 和 ApoA-I_P (Daum et al., 1999, *J Mol Med.* 77:614-22) 等。

[0200] 本申请所述的纯化方法可以适于本领域从业者的任何规模来进行。

[0201] 在某些方面,可通过本申请所述的方法纯化的 ApoA-I 蛋白具有与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或者至少 100% 相同的氨基酸序列。

[0202] 载脂蛋白可来自任何来源,包括血液血浆或者原核细胞或者真核细胞的重组表达。在一些具体的实施方案中,所述载脂蛋白为 ApoA-I,例如人 ApoA-I。在某些方面,所述 ApoA-I 在原核或者真核宿主细胞的细胞质或者周质中表达。在这些实施方案中,在纯化 ApoA-I 前,将所述细胞破裂以将 ApoA-I 释放至上清液。细胞破裂方法为本领域熟知的。使细胞破裂的示例性方法包括但不限于酶方法、声裂法、洗涤剂方法和机械法。在某些优选的方面,ApoA-I 在哺乳动物细胞优选 CHO 细胞中表达,且分泌至生长培养基。在这些实施方案中,ApoA-I 由澄清的无细胞培养基纯化。应该理解的是,尽管所述纯化方法在本申请中与人 ApoA-I 结合来更详细地描述,但是本领域技术人员能够使得所述纯化条件适于其它载脂蛋白以及非人 ApoA-I;ApoA-I 或者其它载脂蛋白的多晶型、同等型、变体和突变体以及截短形式,这取决于可由本领域技术人员容易确定的特定蛋白特征(例如分子量、等电点、斯托克斯半径、疏水性、多聚体状态等)。

[0203] 当 ApoA-I 由血浆制备时,其可通过任何已知的方法包括但不限于冷分级分离方法由血浆分离,诸如描述于 Cohn et al., 1946, J. Am. Chem. Soc. 68:459-475 (“Cohn 方法”) 或者 Oncley et al., 1949, J. Am. Chem. Soc. 71:541-550 (“Cohn-Oncley 方法”)。用于由血浆分离载脂蛋白的其它方法包括 Cohn 和 Cohn-Oncley 方法的变化形式,诸如 Kistler-Nitschmann 方法(参见 Nitschmann et al., 1954, Helv. Chim. Acta 37:866-873; Kistler et al., 1962, Vox Sang. 7:414-424)。

[0204] 在这些实施方案中,载脂蛋白通过由血浆用冷的醇例如乙醇进行沉淀来获得。用于血浆的冷分级分离的其它醇包括 C1-C6 直链或者支链醇,诸如甲醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、仲丁醇、异丁醇和叔丁醇。在多个实施方案中,除了醇之外的降低蛋白溶解性的试剂可用于由血浆来沉淀载脂蛋白。所述试剂包括但不限于乙醚(ether)、硫酸铵、7-乙氧基吡啶-3,9-二胺(雷佛奴尔)和聚乙二醇。沉淀的蛋白可通过本领域任何已知的方法由上清液分离,所述方法包括但不限于沉积、离心和滤过。

[0205] ApoA-I 可由含有蛋白的血浆的任何部分回收。在一些实施方案中,ApoA-I 由人血浆的血清部分回收,其中纤维蛋白原的量通过用约 8% (w/w) 的乙醇沉淀而降低。在其它实施方案中,载脂蛋白由人血浆的血清部分回收,其中其它血清蛋白(例如 β -球蛋白和 γ -球蛋白)的浓度已经通过用约 25% (w/w) 的乙醇沉淀而降低。在其它实施方案中,载脂蛋白作为由人血清的沉淀物来回收,其通过将乙醇浓度增加至约 38% 至约 42% (w/w) 而获得。在一个具体的实施方案中,载脂蛋白作为由人血清的沉淀物来回收,其通过将乙醇浓度增加至约 40% (w/w) 而获得(Cohn 部分 IV)。沉淀的 ApoA-I 可通过本领域任何已知的方法包括但不限于离心和滤过由血清部分回收。

[0206] 在一些实施方案中,血浆部分(载脂蛋白由该部分回收)的温度足够低以防止蛋白变性。在这些实施方案中,ApoA-I 部分的温度的范围为约 -10°C 至约 0°C ,诸如约 -8°C 至约 -2°C 。在多个实施方案中,血浆部分(ApoA-I 由该部分回收)的 pH 的范围防止蛋白变

性。在这些实施方案中,含有 ApoA-I 的部分的 pH 范围为约 5 至约 7,诸如约 5.5 至约 6.5。

[0207] 6.1.4. 改善的脂蛋白纯化方法

[0208] 申请人已经进一步发现产生成熟、完整且基本上不含污染物的脂蛋白的改善的纯化方法,其如下描述且在实施例示例说明。本申请所述的纯化方法可以适于本领域从业者的任何规模来进行。

[0209] 所述方法可应用于任何载脂蛋白,包括但不限于 ApoA-I、-II、-III 或者 -IV; ApoB48 和 ApoB100; ApoC-I、-II、-III 或者 -IV; ApoD; ApoE、ApoH; ApoJ。更具体地,本公开涉及获得高度纯化的 ApoA-I 的方法。在一些实施方案中,所述 ApoA-I 为具有选自(但不限于)下述序列的人蛋白:在 Genbank 登记号 NP_000030、AAB59514、P02647、CAA30377、AAA51746 和 AAH05380.1 中阐述的序列。在某些实施方案中,所述 ApoA-I 为如上在段落 6.1.2 中所述的人蛋白。在其它实施方案中,本公开的方法可用于纯化由非人动物(参见,例如美国公开 2004/0077541)例如,牛、马、羊、猴、狒狒、山羊、兔、狗、刺猬、獾、小鼠、大鼠、猫、豚鼠、仓鼠、鸭、鸡、鲑鱼和鳗鱼获得的 ApoA-I (Brouillette et al., 2001, Biochim Biophys Acta. 1531:4-46; Yu et al., 1991, Cell Struct Funct. 16(4):347-55; Chen and Albers, 1983, Biochim Biophys Acta. 753(1):40-6; Luo et al., 1989, J Lipid Res. 30(11):1735-46; Blaton et al., 1977, Biochemistry 16:2157-63; Sparrow et al., 1995, J Lipid Res. 36(3):485-95; Beaubatie et al., 1986, J Lipid Res. 27:140-49; Januzzi et al., 1992, Genomics 14(4):1081-8; Goulinet and Chapman, 1993, J Lipid Res. 34(6):943-59; Collet et al., 1997, J Lipid Res. 38(4):634-44; 以及 Frank and Marcel, 2000, J Lipid Res. 41(6):853-72)。

[0210] 可通过本申请披露的方法纯化的 ApoA-I 蛋白的实例包括但不限于前原载脂蛋白形式的 ApoA-I、原形式和成熟形式的 ApoA-I, 以及活化的多晶型、同等型、变体和突变体以及截短形式,例如 ApoA-I_M、ApoA-I_Z和 ApoA-I_P。含有半胱氨酸残基的载脂蛋白 A-I 突变体也是已知的,并且也可通过本申请所述的方法纯化(参见,例如美国公开 2003/0181372)。用于本申请所述的方法的 ApoA-I 可为单体、同源二聚体或异源二聚体。例如,可制备的原 ApoA-I 和成熟 ApoA-I 的同源二聚体和异源二聚体包括 ApoA-I (Duverger et al., 1996, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 16(12):1424-29)、ApoA-I_M (Franceschini et al., 1985, J Biol Chem. 260:1632-35) 和 ApoA-I_P (Daum et al., 1999, J Mol Med. 77:614-22) 等。

[0211] 在某些方面,可通过本申请所述的方法纯化的 ApoA-I 蛋白具有与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或者至少 100% 相同的氨基酸序列。

[0212] 载脂蛋白可来自任何来源,包括血液血浆或者原核细胞或者真核细胞的重组表达。在一些具体的实施方案中,所述载脂蛋白为 ApoA-I, 例如人 ApoA-I。在某些方面,所述 ApoA-I 在原核或者真核宿主细胞的细胞质或者周质中表达。在这些实施方案中,在纯化 ApoA-I 前,将所述细胞破裂以将 ApoA-I 释放至上清液。细胞破裂方法为本领域熟知的。使细胞破裂的示例性方法包括但不限于酶方法、声裂法、洗涤剂方法和机械法。在某些优选的方面,ApoA-I 在哺乳动物细胞优选 CHO 细胞中表达,且分泌至生长培养基。在这些实施方案

中,ApoA-I 由澄清的无细胞培养基纯化。应该理解的是,尽管所述纯化方法在本申请中与人 ApoA-I 结合来更详细地描述,但是本领域技术人员能够使得所述纯化条件适于其它载脂蛋白以及非人 ApoA-I ;ApoA-I 或者其它载脂蛋白的多晶型、同等型、变体和突变体以及截短形式,这取决于可由本领域技术人员容易确定的特定蛋白特征(例如分子量、等电点、斯托克斯半径、疏水性、多聚体状态等)。

[0213] 一般而言,所述纯化方法包括以下步骤:(a) 在使得 ApoA-I 不与基质结合的条件下使得含有 ApoA-I 的溶液与阴离子交换基质接触;(b) 经具有足以除去病毒或者病毒颗粒的孔径的膜将步骤(a)获得的含有 ApoA-I 的溶液滤过;(c) 在使得 ApoA-I 与基质结合的条件下使得步骤(b)获得的滤液经过第一反相色谱柱;(d) 使用增加浓度的有机溶剂梯度由第一反相色谱基质洗脱出第一含有 ApoA-I 的反相洗脱液;(e) 在使得 ApoA-I 与基质结合的条件下使得步骤(d)获得的第一 ApoA-I 的反相洗脱液经过第二反相色谱柱;以及(f) 使用增加浓度的有机溶剂梯度由第二反相色谱基质洗脱出第二含有 ApoA-I 的反相洗脱液。所述步骤所进行的顺序不是关键的。对于本领域技术人员显而易见的是,所述步骤的顺序的众多排列是可能的,其中一些如下描述。

[0214] 在某些方面,调整所述含有 ApoA-I 的溶液,之后使其与步骤(a)的阴离子交换基质接触。进行调整以调节所述蛋白溶液的 pH,以使得其处于其中 ApoA-I 不与步骤(a)的阴离子交换基质结合的范围(即所述蛋白不具有净负电荷且步骤(a)以阴性方式进行)。在这些方面,含有 ApoA-I 的溶液的 pH 为约 5 至约 7,优选约 5.0 至约 5.6。在具体的方面,所述 pH 为约 5.1 至约 5.5。在其它方面,所述 pH 为约 5.3。可通过加入适当的酸(例如盐酸)或者碱(例如氢氧化钠)来进行 pH 的调节,直到获得预期范围内的 pH。在一些实施方案中,将含有 ApoA-I 的溶液滤过以移去细胞和细胞碎片,之后进行调整步骤。在其它实施方案中,当不存在调整步骤时,在进行步骤(a)之前,任选地将含有 ApoA-I 的溶液滤过,以移去细胞和细胞碎片。

[0215] 在一些实施方案中,使得含有 ApoA-I 的溶液与阴离子交换基质接触的步骤(a)通过使蛋白溶液经过色谱柱来进行。在这些实施方案中,所述柱装填的底料高度为约 10cm 至约 50cm,优选约 10cm 至约 30cm,且更优选约 20cm。在某些方面,所述柱装载有包含约 10g 至约 50g 诸如约 10g 至约 30g、诸如约 25g 至约 35g 的 ApoA-I/L 的蛋白溶液。在一些具体的实施方案中,所述柱装载有包含至多约 32g 的 ApoA-I/L 的蛋白溶液。在其它实施方案中,步骤(a)以分批方式进行,即,将阴离子交换基质加入至烧瓶中的蛋白溶液中,混合充足的时间以将污染物与基质结合,然后例如通过滤过或者离心将基质物质由蛋白溶液分离。在某些实施方案中,将所述蛋白溶液滤过以除去溶液中的颗粒,之后使其与阴离子交换基质接触。

[0216] 本申请所述的方法的步骤(a)中所用的阴离子交换基质可为本领域已知的任何阴离子交换基质。适当的阴离子交换基质包括但不限于 Q-Sepharose FF、Q-Spherosil、DEAE-Sepharose FF、Q-Cellulose、DEAE-Cellulose 和 Q-Spherox. 在一个具体的实施方案中,所述阴离子交换基质为 Q-Sepharose FF(GE Healthcare)。在某些方面,在使得步骤(a)的蛋白溶液与阴离子交换基质接触之前,将所述基质在具有如上讨论的使得 ApoA-I 不与所述基质结合的优选的范围内 pH 的缓冲剂中平衡。用于在步骤(a)之前平衡阴离子交换基质且用于进行步骤(a)的缓冲剂对于技术人员是已知的。在一些具体的实施方案中,

所述缓冲剂为 TAMP A (20mM 磷酸钠, pH 5.3)。

[0217] 在多个实施方案中,步骤(a)用于针对除了 ApoA-I 之外的蛋白(例如宿主细胞蛋白)、宿主细胞 DNA 和内毒素纯化 ApoA-I,所述除了 ApoA-I 之外的蛋白(例如宿主细胞蛋白)、宿主细胞 DNA 和内毒素结合至阴离子交换基质且由此与 ApoA-I 分离, ApoA-I 在如上所述的 pH 和盐条件下不与基质结合。在某些方面,由阴离子交换步骤回收在起始溶液中的至少 75%、至少 80%、至少 85% 或者至少 90% 或者更大的量的 ApoA-I。

[0218] 在多个实施方案中,所述纯化方法包括步骤(b),其中使用滤器将步骤(a)的 ApoA-I 溶液滤过,所述滤器具有足以捕获病毒和病毒颗粒的孔径。任选地,经膜滤过以除去病毒或者病毒颗粒的步骤(b)在如上步骤(f)后进行,而不是在步骤(a)后进行。在某些方面,在病毒滤过步骤(b)之前通过加入氢氧化钠或者其它适当的碱来调节来自阴离子交换基质的洗脱液的 pH。将步骤(a)的含有 ApoA-I 的溶液调节为约 7.8 至约 8.2 的 pH。在具体的方面,将含有 ApoA-I 的溶液调节为约 8.0 的 pH。步骤(b)中使用的滤器可为具有用于捕获病毒的适当孔径例如约 15nm 至约 75nm 的孔径的任何滤器。在一些具体的实施方案中,所述滤器的孔径为约 20nm(例如 Planova 20N, Asahi Kasei Medical)。技术人员应该认识到蛋白溶液经过病毒滤器的流速由所述溶液的性质(例如其粘性、颗粒的浓度等)来确定。对于病毒滤过的典型流速为约 12.5L/h/m²,然而,所述流速可被调节更高或者更低以保持 1 巴或者更低的滤器压力。步骤(b)的滤液含有 ApoA-I。在某些方面, ApoA-I 由病毒滤过步骤的回收率为步骤(a)的阴离子交换洗脱液中的 ApoA-I 量的至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或者至少 98% 或者更大。

[0219] 在一些具体的实施方案中,本申请所述的纯化方法包括步骤(b)之后的步骤(c),其中在允许载脂蛋白 A-I 与基质结合的缓冲剂和盐条件下使得步骤(b)的滤液经过第一反相色谱柱。在这些实施方案中,使用增加浓度的有机溶剂的梯度将所述 ApoA-I 针对宿主细胞 DNA、宿主细胞蛋白、内毒素和截短形式进行纯化。反相色谱法可使用本领域已知的多种基质进行,所述基质包括但不限于硅胶、聚苯乙烯或者交联琼脂糖培养基(在所述培养基上接枝 C4-C18 疏水性配体)。用于本申请所述的方法中的可商购得到的疏水性基质包括但不限于 Butyl Sepharose-FF、Octyl Sepharose-FF、Dianon HP20ss、C18Hypersil 和 Source 30RPC。在一些具体的实施方案中,步骤(c)中使用的基质为 Source 30RPC(GE Healthcare)。在某些方面,所述反相色谱柱具有约 10cm 至约 50cm 诸如约 10cm 至约 30cm 的底料高度。在具体的方面,所述反相色谱柱具有约 25cm 的底料高度。

[0220] 在一些实施方案中,将病毒滤过步骤(b)的 ApoA-I 滤液以每升约 1 至约 20g ApoA-I 诸如约 1.5g 至约 5g ApoA-I 且更优选约 2.5g 至约 3.5g ApoA-I 的浓度载入至反相柱上。在具体的方面,将步骤(b)的 ApoA-I 滤液以约 3.4gApoA-I/L 的浓度载入至反相柱上。可用于在载入 ApoA-I 之前平衡所述反相柱且保证所述蛋白在载入后将结合至所述柱上的缓冲条件将对于本领域技术人员而言是可容易确定的。优选地,所述柱平衡缓冲剂为强的缓冲剂,其可将柱 pH 降低至约 9.5。在某些实施方案中,所述平衡缓冲剂为 TAMP D (20mM 碳酸铵)。优选地,在平衡后,将步骤(b)的含有 ApoA-I 的滤液(pH 为约 8.0)以约 0.5cm 至约 5.0cm/分钟诸如约 2.0cm 至约 4.0cm/分钟的流速载入至柱上。在一个具体的实施方案中,将含有 ApoA-I 滤液以约 2.8cm/分钟的流速载入至柱上。

[0221] 在步骤(c)中将 ApoA-I 结合至反相基质后,通过暴露于增加浓度的有机溶剂在缓

冲剂中的梯度诸如约 35%至约 50%乙腈在 TAMP D 缓冲剂中的梯度将蛋白在步骤 (d) 中洗脱出。在某些方面,历时约 60 至约 90 分钟诸如约 70 分钟或者更优选约 80 分钟的时间内约 35%至约 50%乙腈的线性梯度可用于将 ApoA-I 由所述柱洗脱出。在某些方面,在线性梯度之后进行使用 50%乙腈的约 10 分钟的等度洗脱。用于将 ApoA-I 由所述反相柱洗脱出的确切条件将对于本领域技术人员是可容易确定的。在多个实施方案中,柱负载中的约 60%诸如约 65%、约 70%、约 75%或者约 80%或者更多的 ApoA-I 存在于步骤 (d) 的柱洗脱液中。

[0222] 在某些方面,本申请所述的纯化方法进一步包括在步骤 (d) 后的步骤 (e),其中使得步骤 (d) 的载脂蛋白 A-I 反相洗脱液经过第二反相色谱柱以进一步由全长蛋白中除去 DNA、宿主细胞蛋白和截短形式的 ApoA-I。优选地,在允许所述载脂蛋白 A-I 结合至基质的条件下将步骤 (d) 的反相洗脱液载入至第二反相柱上。用于步骤 (e) 的反相基质可为与步骤 (d) 所用的相同类型的基质或者不同类型的基质。在一些具体的实施方案中,步骤 (e) 中所用的反相基质为 C18 硅胶基质诸如 Daisogel SP-300-BIO C18 基质 (300 Å, 10 μm; Daiso Co., Ltd.)。可用于在载入 ApoA-I 之前平衡所述 C18 柱且保证所述蛋白在载入后将结合至所述柱上的缓冲条件将对于本领域技术人员而言是可容易确定的。优选地,所述柱平衡缓冲剂为强缓冲剂,其可将柱 pH 降低至约 9.5。在某些实施方案中,所述平衡缓冲剂为 TAMP E (100mM 碳酸铵)。在多个实施方案中,在本申请所述的纯化方法的步骤 (e) 中所用的反相柱具有约 10cm 至约 50cm 诸如约 10cm 至约 30cm 的底料高度。在一些具体的实施方案中,步骤 (e) 中所用的反相柱具有约 25cm 的底料高度。

[0223] 在多个实施方案中,将步骤 (d) 的 ApoA-I 洗脱液以每升约 0.5g 至约 30g ApoA-I 诸如约 1g 至约 10g ApoA-I 且更优选约 4g 至约 5g ApoA-I 的浓度载入至 C18 反相柱上。在一些具体的实施方案中,将步骤 (d) 的 ApoA-I 洗脱液以约 4.7g ApoA-I/L 的浓度载入至 C18 柱上。优选地,在平衡后,将步骤 (d) 的含有 ApoA-I 的洗脱液以约 0.5cm 至约 5.0cm/分钟诸如约 1.0cm 至约 3.0cm/分钟的流速载入至柱上。在一个具体的实施方案中,将含有 ApoA-I 的滤液以约 2.1cm/分钟的流速载入至柱上。

[0224] 在 ApoA-I 结合至步骤 (e) 的反相基质中后,使用增加浓度的有机溶剂在缓冲剂中的梯度诸如约 40%至约 50%乙腈在 TAMP E 缓冲剂中的梯度将蛋白在步骤 (f) 洗脱出。在某些方面,历时约 40 至约 80 分钟诸如约 50 分钟、约 60 分钟或者约 70 分钟的时间内约 40%至约 50%乙腈的线性梯度用于将 ApoA-I 由所述柱洗脱出。在一些具体的实施方案中,历时约 60 分钟的时间内约 40%至约 50%乙腈在 TAMP E 缓冲剂中的线性梯度用于将 ApoA-I 由所述反相基质洗脱出。在某些方面,线性梯度之后进行使用 50%乙腈的约 15 分钟的等度洗脱。用于将 ApoA-I 由所述反相柱洗脱出的确切条件将对于本领域技术人员而言是容易确定的。在多个实施方案中,在柱负载中的约 60%诸如约 65%、约 70%、约 75%或者约 80%或者更多的 ApoA-I 在步骤 (f) 的柱洗脱液中回收。

[0225] 在某些实施方案中,将有机溶剂由本申请所述方法的步骤 (f) 获得的含有 ApoA-I 的洗脱液除去。溶剂除去可通过本领域已知的任何方法来完成,包括但不限于将步骤 (f) 获得的含有 ApoA-I 的洗脱液浓缩并将所述浓缩液渗滤至含水缓冲剂中。在某些实施方案中,将步骤 (f) 的洗脱液浓缩约 2-倍、约 2.5-倍、约 3-倍、约 3.5-倍、约 4-倍、约 4.5-倍或者约 5-倍 (相比于步骤 (f) 的反相柱中洗脱液的体积)。在一个具体的实施方案中,将

洗脱液浓缩约 2.5- 倍,然后经约 10、15 或者 20 体积,优选 15 体积的适当含水缓冲剂渗滤。适当的含水缓冲剂为本领域已知的。特别优选的缓冲剂为 TAMP C(3mM 磷酸钠, pH 8.0)。

[0226] 在一些实施方案中,色谱柱的顺序是可颠倒的。

[0227] 任选地,在浓缩和缓冲剂交换后,将含水 ApoA-I 溶液进一步经阴离子交换色谱法以阴性模式(即在其中 ApoA-I 不结合至阴离子交换基质的条件下)纯化,以除去残留的 DNA 和其它荷负电的污染物诸如宿主细胞蛋白(步骤(g))。在一些实施方案中,所述阴离子交换步骤以分批模式进行。在其它实施方案中,所述阴离子交换步骤经柱色谱法进行。用于分批模式或者柱色谱法中的适当的阴离子交换基质包括但不限于 Q Sepharose-FF 或者如上在步骤(a)中所讨论的任何阴离子交换基质。在具体的方面,所述阴离子交换步骤通过以下方法实施:使得 ApoA-I 溶液经过阴离子交换膜诸如具有大的表面积和强的阳离子电荷的膜,例如 Sartobind Q 或者 Mustang Q。优选地,使用 Mustang Q 阴离子交换膜(Pall Life Sciences)来进行所述阴离子交换步骤。在某些方面,将所述含水 ApoA-I 溶液的 pH 降低至约 5.5、约 6.0 或者约 6.5,之后使用任何适当的酸进行该阴离子交换步骤。在具体的方面,使用稀磷酸将所述含水 ApoA-I 溶液的 pH 降低至约 6.0。在优选的实施方案中,使得所述 ApoA-I 溶液以约 12.5L/m²/h 经过 Mustang Q 柱。

[0228] 在一些实施方案中,将所述阴离子交换膜滤液浓缩并任选地渗滤,以将溶剂变换为适于储存或者进一步加工所述 ApoA-I 的溶剂,所述加工诸如与在如下段落 6.5.1 中所述的脂质复合和/或者如以下段落 6.6 中所述配制在药物组合物中。用于储存或者进一步加工 ApoA-I 的适当的缓冲剂对于本领域技术人员而言是容易确定的。在一些具体的实施方案中,将所述纯化的 ApoA-I 交换至 TAMP C 缓冲剂中。任何超滤膜可用于该步骤中,条件是所述膜具有低于全长成熟 ApoA-I 的分子量的分子量截止值以使得其允许缓冲剂经过而不允许蛋白经过。在一些具体的实施方案中,使用 10,000 额定分子量截止值的聚醚砜膜(例如 Filtron Omega 系列)。优选地,在超滤后所述溶液中的 ApoA-I 浓度为至少 10g/L、至少 12g/L、至少 15g/L、至少 20g/L、至少 25g/L、至少 30g/L、至少 35g/L、至少 40g/L、至少 45g/L 或者至少 50g/L。

[0229] 6.1.5. 载脂蛋白产物

[0230] 本公开还提供了基本纯的成熟全长载脂蛋白。本申请使用的术语“基本纯的”是指至少 95% 纯的蛋白。在某些实施方案中,所述基本纯的蛋白为至少 96% 纯的、至少 97% 纯的、至少 98% 纯的、至少 99% 纯的、至少 99.5% 纯的、至少 99.9% 纯的或者 100% 纯的。在某些方面,使用光源对照白色背景进行视觉观察时,由本申请所述的纯化方法产生的基本纯的载脂蛋白产物为不含可见颗粒的澄清至略微乳色溶液。在多个实施方案中,由如上在段落 6.1.4 中所述的方法获得或者可获得的基本纯的载脂蛋白包括少量或者检测不到的量的一种或者多种宿主细胞 DNA、除了载脂蛋白之外的蛋白(例如宿主细胞蛋白)、内毒素、残留的溶剂以及低生物负载(即在样品上或者样品中的少量的微生物),如下进一步详述。载脂蛋白产物的纯度可由本领域已知的任何方法来确定,包括但不限于 N-末端 Edman 序列测定、MALDI-MS、凝胶电泳、HPLC 和/或者免疫测定。

[0231] 在多个实施方案中,由本申请所述的方法获得的基本纯的载脂蛋白为具有约 28.1 千道尔顿的质量的全长成熟人 ApoA-I。该产物中的 ApoA-I 的质量可由本领域已知的任何方法来确定,包括但不限于 MALDI-MS。在多个实施方案中,产物中至少 75%、至少 80%、至

少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99% 的 ApoA-I 蛋白为成熟全长 ApoA-I (例如包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 的 ApoA-I)。在某些方面,所述基本纯的 ApoA-I 产物含有约 15wt% 或者更低、约 10wt% 或者更低、约 5wt% 或者更低、约 4wt% 或者更低、约 3wt% 或者更低、约 2wt% 或者更低或者约 1wt% 或者更低的 N-末端延长的 ApoA-I 同等型(例如原 ApoA-I)。本领域技术人员应该认识到,产物中任何 N-末端延长的 ApoA-I 将在给药后在血液中快速地转化为成熟 ApoA-I。在多个实施方案中,所述 ApoA-I 产物含有约 25wt% 或者更低、约 20wt% 或者更低、约 15wt% 或者更低、约 10wt% 或者更低、约 5wt% 或者更低、约 4wt% 或者更低、约 3wt% 或者更低、约 2wt% 或者更低、约 1wt% 或者更低、约 0.75wt% 或者更低、约 0.5wt% 或者更低、约 0.25wt% 或者更低或者约 0.1wt% 或者更低的截短形式的 ApoA-I。截短的或者延长的 ApoA-I 的量可通过例如 N-末端 Edman 序列测定和 / 或者 MALDI-MS 和 / 或者运行和扫描 SDS-PAGE 凝胶来确定,以确定纯化的 ApoA-I 谱带面积(如果存在)的强度与所有谱带的总强度的比例。在多个实施方案中,所述 ApoA-I 产物含有约 20wt% 或者更低、约 10wt% 或者更低、约 5wt% 或者更低、约 4wt% 或者更低、约 3wt% 或者更低、约 2wt% 或者更低、约 1wt% 或者更低、约 0.75wt% 或者更低、约 0.5wt% 或者更低、约 0.25wt% 或者更低或者约 0.1wt% 或者更低的氧化形式的 ApoA-I,特别是在位置 Met₁₁₂ 和 / 或者 Met₁₄₈ 氧化的 ApoA-I。

[0232] 在某些实施方案中,由本申请所述的方法产生的基本纯的载脂蛋白包含以小于约 100ppm(例如 ng/mg) 诸如小于约 75ppm、小于约 50ppm、小于约 40ppm、小于约 30ppm、小于约 20ppm 或者小于约 10ppm 的量存在的宿主细胞蛋白。在一些具体的实施方案中,所述基本纯的载脂蛋白产物包含小于约 20ppm 的宿主细胞蛋白。更优选地,所述载脂蛋白产物包含小于约 10ppm 的宿主细胞蛋白。载脂蛋白样品中的宿主细胞蛋白的存在和量可由本领域已知的任何方法来确定。当载脂蛋白在例如哺乳动物细胞中重组产生时,可商购得到的 ELISA 试剂盒(例如 Kit F015,来自 Cygnus Technologies)可用于检测和定量宿主细胞蛋白水平。

[0233] 在某些方面,如本申请所述纯化的基本纯的载脂蛋白产物包含以小于约 50pg/mg 的载脂蛋白诸如小于约 40pg/mg、小于约 30pg/mg、小于约 20pg/mg、小于约 10pg/mg 或者小于约 5pg/mg 的载脂蛋白的量存在的宿主细胞 DNA。在优选的实施方案中,基本纯的载脂蛋白产物包含小于约 10pg 的宿主细胞蛋白 /mg 的载脂蛋白。宿主细胞 DNA 在载脂蛋白样品中的存在和量可由本领域已知的任何方法来确定,包括实时-PCR 或者使用抗-SSB 抗体(Glycotype Biotechnology)的具有单链结合蛋白的复合物的检测,优选通过定量 PCR。

[0234] 在某些实施方案中,由本申请所述的方法产生的基本纯的载脂蛋白产物包含小于约 0.5EU/mg 的载脂蛋白诸如小于约 0.4EU/mg、小于约 0.3EU/mg、小于约 0.2EU/mg 或者小于约 0.1EU/mg 的载脂蛋白的量的内毒素。优选地,本申请所述的基本纯的载脂蛋白产物包含小于约 0.1EU 的内毒素 /mg 的载脂蛋白。内毒素的检测和定量可由本领域已知的任何方法来实现,例如使用针对革兰氏阴性细菌内毒素(Cambrex;敏感性 0.125EU/mL)的鲎阿米巴样细胞溶解物(Limulus Amebocyte Lysate, LAL)定性测试。

[0235] 本申请所述的基本纯的载脂蛋白产物具有低生物负载。术语“生物负载”是指产物中的需氧菌、厌氧菌、酵母以及霉菌的水平。在多个实施方案中,如本申请所述纯化的基

本纯的载脂蛋白产物的生物负载为小于约 1CFU/mL。生物负载测试可根据任何已知方法进行,例如根据 European Pharmacopoeia Chapter 2.6.12.B, 2.6.1 以及 USP Chapter 61 统一方法。

[0236] 本申请所述的基本纯的载脂蛋白产物包含少量的残留溶剂。在一些具体的实施方案中,残留溶剂以针对 10mg/L 的载脂蛋白而言小于约 50ppm、小于约 45ppm、小于约 40ppm、小于约 35ppm、小于约 30ppm、小于约 25ppm、小于约 20ppm、小于约 15ppm 或者小于约 10ppm 的量存在。优选地,残留溶剂以针对 10mg/L 的载脂蛋白而言小于约 41ppm 的量存在。残留溶剂的量可由本领域已知的任何方法来测定,包括但不限于 GC-MS 和 HPLC。

[0237] 优选地,所述载脂蛋白为 ApoA-I (例如包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 的 ApoA-I)。在一些实施方案中,所述成熟人 ApoA-I 蛋白具有在位置 1 (即,相应于 SEQ ID NO:1 的位置 25 的位置) 具有门冬氨酸的氨基酸序列。

[0238] 6.2. 脂质部分

[0239] 本公开的脂蛋白复合物和组合物包含脂质部分。所述脂质部分包含一种或者多种脂质。在多个实施方案中,一种或者多种脂质可为饱和和 / 或者不饱和的,以及天然或者合成的脂质。所述脂质部分优选包含至少一种磷脂。

[0240] 可存在于脂质部分中的适当的脂质包括但不限于小烷基链磷脂、蛋磷脂酰胆碱、大豆磷脂酰胆碱、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、二油酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰甘油磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油诸如二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰甘油、二油酰磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酸、二棕榈酰磷脂酸、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、脑磷脂酰丝氨酸、脑鞘磷脂、棕榈酰鞘磷脂、二棕榈酰鞘磷脂、蛋鞘磷脂、乳鞘磷脂、植物鞘磷脂、二硬脂酰鞘磷脂、二棕榈酰磷脂酰甘油盐、磷脂酸、半乳糖脑苷脂、神经节苷酯、脑苷脂、二月桂基磷脂酰胆碱、(1,3)-D- 甘露糖基 -(1,3) 甘油二酯、氨基苯基糖苷、3- 胆固醇基 -6' - (糖基硫基) 己基醚糖脂以及胆固醇及其衍生物。合成的脂质诸如合成的棕榈酰鞘磷脂或者 N- 棕榈酰 -4- 羟基二氢鞘氨醇 -1- 磷酸胆碱 (植物鞘磷脂形式) 可用于使得脂质氧化最小化。包含棕榈酰鞘磷脂的磷脂部分可任选地包括少量的任何类型的脂质,包括但不限于溶血磷脂、除了棕榈酰鞘磷脂之外的鞘磷脂、半乳糖脑苷脂、神经节苷酯、脑苷脂、甘油酯、甘油三酯和胆固醇及其衍生物。

[0241] 在优选的实施方案中,所述脂质部分包含两种类型的磷脂:鞘磷脂 (SM) 和负电荷磷脂。SM 为“中性”磷脂,是在生理 pH 条件下净电荷约为零的磷脂。使用的 SM 的特性并不是成功的关键所在。因此,如本申请所用,“SM”的表达不仅包括衍生自或者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

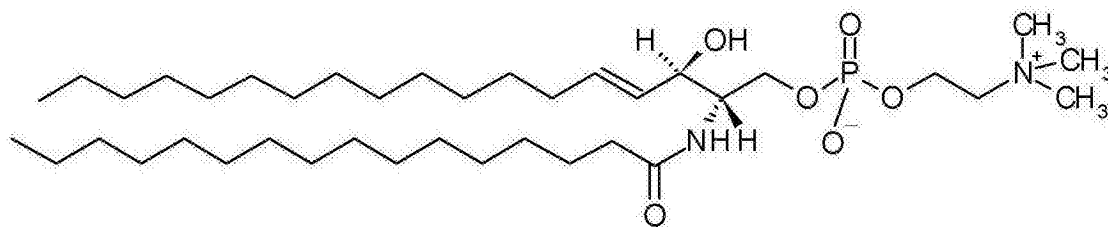
不被水解,因此其在循环中可滞留更长的时间。预期这种特征可使本申请所述的荷负电的脂蛋白复合物具有更长的药理作用(胆固醇的流动)持续时间,并且其与不包括 SM 的载脂蛋白复合物相比,能够获取更多的脂质,尤其是胆固醇。这种作用可以使包括 SM 的脂蛋白复合物与不包括 SM 的脂蛋白复合物相比,治疗所需的次数更少或者剂量更低。

[0242] 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、N-棕榈酰-4-羟基二氢鞘氨醇-1-磷酸胆碱(一种形式的植物鞘磷脂)、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。可使用合成的 SM 诸如合成的棕榈酰鞘磷脂或者 N-棕榈酰-4-羟基二氢鞘氨醇-1-磷酸胆碱(植物鞘磷脂),以产生更均质的复合物以及更少的污染物和/或者氧化产物(相比于动物来源的鞘磷脂)。

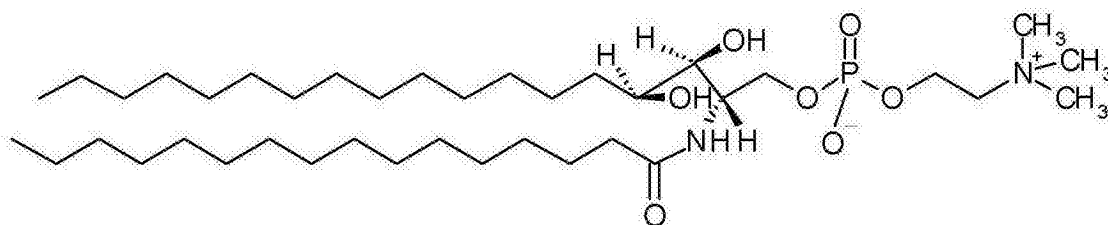
[0243] 示例性鞘磷脂,即棕榈酰鞘磷脂和植物鞘磷脂如下显示。

[0244]

棕榈酰 SM



植物 SM



[0245] 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,乳鞘磷脂(Avanti Phospholipid, Alabaster, Ala.)的特征为具有饱和的长酰基链(即,具有20个或更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%的乳鞘磷脂包括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乳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。

[0246] 为使 SM 具有特定的酰基链,其可以是半合成的。例如,首先可将乳鞘磷脂从乳品纯化,然后可将一种特定的酰基链如 C16:0 酰基链裂解并替换为另一酰基链。SM 也可以完全通过例如大规模合成来进行合成。参见,例如 Dong et al., 美国专利 5,220,043, 标题为 Synthesis of D-erythro-sphingomyelins, issued Jun. 15, 1993; Weis, 1999, Chem. Phys. Lipids 102(1-2):3-12。

[0247] 可以选择性地改变构成半合成或合成 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 包含混合的酰基链,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。在其它实施方案中,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,构成半合成或合成 SM 的酰基链是相同的。在一个具体的实施方案中,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。在另外的实施方案中,使用具有饱和或者不饱和官能链的 SM。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 提供了可以包含在半合成和合成 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:

[0248]

表 1	
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 Δ^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 ω -3 脂肪酸)

[0249] 在优选的实施方案中,所述 SM 为棕榈酰 SM 诸如合成的棕榈酰 SM,其具有 C16:0 酰基链,或者其为蛋 SM,其包含作为主要成分的棕榈酰 SM。

[0250] 在一个具体的实施方案中,使用官能化的 SM 诸如植物鞘磷脂。

[0251] 所述脂质部分优选包含负电荷磷脂。本申请使用的“负电荷磷脂”为在生理 pH 条件下具有负的净电荷的磷脂。所述负电荷磷脂可包含单一类型的负电荷磷脂,或者两种或者更多种不同的荷负电的磷脂的混合物。在一些实施方案中,所述荷电磷脂为荷负电的甘油磷脂。所述一种或者多种荷电磷脂的特性并不是成功的关键所在。适当的负电荷磷脂的具体实例包括但不限于 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3-[- 磷酸 - 外消旋 -(1- 甘油)]、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸和磷脂酸。在一些实施方案中,所述负电荷磷脂包含一种或者多种磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油和 / 或者磷脂酸。在一个具体的实施方案中,所述负电荷磷脂由 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3-[- 磷酸 - 外消旋 -(1- 甘油)] 或者 DPPG 构成。

[0252] 与 SM 一样,负电荷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。在本申请描述的荷电脂蛋白复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。在一些实施方案中,SM 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,所述一种或者多种负电荷磷脂和 / 或 SM 均具有 C16:0 或 C16:1 酰基链。在特定的实施方案中,所述 SM 的脂肪酸部分主要为 C16:1 棕榈酰。在一个特定的实施方案中,所述一种或者多种荷电的磷脂和 / 或 SM 的酰基链与棕榈酸的酰基链一致。

[0253] 使用的磷脂优选为至少 95% 纯的和 / 或者具有降低水平的氧化剂。由天然来源获得的脂质优选具有较少的多不饱和脂肪酸部分和 / 或者不易于氧化的脂肪酸部分。样品的氧化水平可使用碘量法来确定, 其提供了过氧化值, 表示为每千克样品的分离的碘的毫当量数, 缩写为 meq O/kg。参见例如 Gray, J. I., Measurement of Lipid Oxidation: A Review, Journal of the American Oil Chemists Society, Vol. 55, p. 539-545 (1978); Heaton, F. W. and Uri N., Improved Iodometric Methods for the Determination of Lipid Peroxides, Journal of the Science of food and Agriculture, vol 9. P, 781-786 (1958)。优选地, 所述氧化水平或者过氧化物水平是低的, 例如小于 5meq O/kg、小于 4meq O/kg、小于 3meq O/kg 或者小于 2meq O/kg。

[0254] 包含 SM 和棕榈酰鞘磷脂的脂质部分可任选地包含少量的额外的脂质。实际上, 可使用任何类型的脂质, 包括但不限于溶血磷脂质、半乳糖脑苷脂、神经节苷酯、脑苷脂、甘油酯、甘油三酯和胆固醇及其衍生物。

[0255] 当包括在内时, 所述任选的脂质通常包含小于约 15wt% 的脂质部分, 尽管在一些情况下可包含更任选的脂质。在一些实施方案中, 任选的脂质为小于约 10wt%、小于约 5wt% 或者小于约 2wt%。在一些实施方案中, 所述脂质部分不包含任选的脂质。

[0256] 在一个具体的实施方案中, 所述磷脂部分含有重量比 (SM: 负电荷磷脂) 范围为 90:10 至 99:1、更优选范围为 95:5 至 98:2 的蛋 SM、棕榈酰 SM 或者植物鞘磷脂以及 DPPG。在一个实施方案中, 所述重量比为 97:3。

[0257] 本公开的脂蛋白复合物也可用作载体来递送疏水性、亲脂性或者非极性活性剂以用于各种治疗或者诊断应用。对于所述应用, 所述脂质部分可进一步包含一种或者多种疏水性、亲脂性或者非极性活性剂, 包括但不限于脂肪酸、药物、核酸、维生素和 / 或者营养素。适当的疏水性、亲脂性或者非极性活性剂并不限于治疗类别, 且可为例如镇痛药、抗炎剂、驱虫药、抗心律不齐药、抗菌剂、抗病毒剂、抗凝血剂、抗抑郁药、抗糖尿病药、抗癫痫剂、抗真菌剂、抗痛风药、抗高血压剂、抗疟药、抗偏头痛药、抗毒蕈碱剂、抗肿瘤药、勃起机能障碍改善剂、免疫抑制剂、抗原虫剂、抗甲状腺剂、抗焦虑剂、镇静药、安眠药、神经镇静药、 β -阻滞剂、心脏收缩药 (cardiac inotropic agents)、皮质类固醇 (corticosteroids)、利尿剂、抗帕金森综合征剂、胃肠药、组胺受体拮抗剂、角质层分离剂、脂质调节剂、抗心绞痛药、cox-2 抑制剂、白三烯抑制剂、大环内酯类、肌肉松弛药 (muscle relaxants)、营养剂、核酸 (例如小干扰 RNA)、阿片样物质镇痛药、蛋白酶抑制剂、性激素类、兴奋药、肌肉松弛药、抗骨质疏松药 (anti-osteoporosis agents)、减肥药、认知增强药、抗尿失禁药、营养油、抗良性前列腺肥大药、必需脂肪酸、非必需脂肪酸以及它们的混合物。

[0258] 适当的疏水性、亲脂性或者非极性活性剂的具体非限制性实例为: 阿昔曲丁 (acetrelin)、阿苯达唑 (albendazole)、沙丁胺醇 (albuterol)、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、胺碘酮 (amiodarone)、氨氯地平 (amlodipine)、安非他命 (amphetamine)、两性霉素 B (amphotericin B)、阿托伐他汀 (atorvastatin)、阿托伐醌 (atovaquone)、阿奇霉素 (azithromycin)、巴氯芬 (baclofen)、倍氯米松 (beclomethasone)、贝那普利 (benazepril)、苯佐那酯 (benzonatate)、倍他米松 (betamethasone)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、布地奈德 (budesonide)、安非他酮 (bupropion)、白消安 (busulfan)、布替萘芬 (butenafine)、骨化二醇 (calcifediol)、

卡泊三烯 (calcipotriene)、骨化三醇 (calcitriol)、喜树碱 (camptothecin)、坎地沙坦 (candesartan)、辣椒碱 (capsaicin)、卡马西平 (carbamazepine)、胡萝卜素类 (carotenes)、塞来考昔 (celecoxib)、西立伐他汀 (cerivastatin)、西替利嗪 (cetirizine)、氯苯那敏 (chlorpheniramine)、胆钙化甾醇 (cholecalciferol)、西洛他唑 (cilostazol)、西咪替丁 (cimetidine)、桂利嗪 (cinnarizine)、环丙沙星 (ciprofloxacin)、西沙必利 (cisapride)、克拉霉素 (clarithromycin)、氯马斯汀 (clemastine)、氯米芬 (clomiphene)、氯米帕明 (clomipramine)、氯吡格雷 (clopidogrel)、可待因 (codeine)、辅酶 Q10 (coenzyme Q10)、环苯扎林 (cyclobenzaprine)、环孢菌素 (cyclosporin)、达那唑 (danazol)、丹曲林 (dantrolene)、右氯苯那敏 (dexchlorpheniramine)、双氯芬酸 (diclofenac)、双香豆素 (dicoumarol)、地高辛 (digoxin)、脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone)、二氢麦角胺 (dihydroergotamine)、双氢速甾醇 (dihydrotachysterol)、地红霉素 (dirithromycin)、多奈哌齐 (donepezil)、依法韦仑 (efavirenz)、头孢他定 (eposartan)、麦角钙化醇 (ergocalciferol)、麦角胺 (ergotamine)、必需脂肪酸来源 (essential fatty acid sources)、依托度酸 (etodolac)、依托泊苷 (etoposide)、法莫替丁 (famotidine)、非诺贝特 (fenofibrate)、芬太尼 (fentanyl)、非索非那定 (fexofenadine)、非那雄胺 (finasteride)、氟康唑 (fluconazole)、氟比洛芬 (flurbiprofen)、氟伐他汀 (fluvastatin)、磷苯妥英 (fosphenytoin)、夫罗曲普坦 (frovatriptan)、呋喃唑酮 (furazolidone)、加巴喷丁 (gabapentin)、吉非贝齐 (gemfibrozil)、格列本脲 (glibenclamide)、格列吡嗪 (glipizide)、格列本脲 (glyburide)、格列美脲 (glimepiride)、灰黄霉素 (griseofulvin)、卤泛群 (halofantrine)、布洛芬 (ibuprofen)、厄贝沙坦 (irbesartan)、伊立替康 (irinotecan)、硝酸异山梨酯 (isosorbide dinitrate)、异维 A 酸 (isotretinoin)、伊曲康唑 (itraconazole)、伊维菌素 (ivermectin)、酮康唑 (ketoconazole)、酮咯酸 (ketorolac)、拉莫三嗪 (lamotrigine)、兰索拉唑 (lansoprazole)、来氟米特 (leflunomide)、赖诺普利 (lisinopril)、洛哌丁胺 (loperamide)、氯雷他定 (loratadine)、洛伐他汀 (lovastatin)、L- 甲状腺素 (L-thyroxine)、叶黄素 (lutein)、番茄红素 (lycopene)、甲羟孕酮 (medroxyprogesterone)、米非司酮 (mifepristone)、甲氟喹 (mefloquine)、醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、美沙酮 (methadone)、甲氧沙林 (methoxsalen)、甲硝唑 (metronidazole)、咪康唑 (miconazole)、咪达唑仑 (midazolam)、米格列醇 (miglitol)、米诺地尔 (minoxidil)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、孟鲁司特 (montelukast)、萘丁美酮 (nabumetone)、纳布啡 (nalbuphine)、那拉曲坦 (naratriptan)、奈芬纳韦 (nelfinavir)、硝苯地平 (nifedipine)、尼索地平 (nilsolidipine)、尼鲁米特 (nilutamide)、呋喃妥因 (nitrofurantoin)、尼扎替丁 (nizatidine)、奥美拉唑 (omeprazole)、奥普瑞白介素 (oprelvekin)、甾二醇 (oestradiol)、奥沙普秦 (oxaprozin)、紫杉醇 (paclitaxel)、旁卡西醇 (paracalcitol)、帕罗西汀 (paroxetine)、喷他佐辛 (pentazocine)、吡格列酮 (pioglitazone)、pizofetin、普伐他汀 (pravastatin)、泼尼松龙 (prednisolone)、普罗布考 (probucol)、黄体酮 (progesterone)、伪麻黄碱 (pseudoephedrine)、吡斯的明 (pyridostigmine)、雷贝拉唑 (rabeprazole)、雷洛昔芬 (raloxifene)、

罗非考昔 (rofecoxib)、瑞格列奈 (repaglinide)、利福布汀 (rifabutine)、利福喷汀 (rifapentine)、利美索龙 (rimexolone)、利托那韦 (ritanovir)、利扎曲普坦 (rizatriptan)、罗格列酮 (rosiglitazone)、沙奎那韦 (saquinavir)、舍曲林 (sertraline)、西布曲明 (sibutramine)、枸橼酸西地那非 (sildenafil citrate)、辛伐他汀 (simvastatin)、西罗莫司 (sirolimus)、螺内酯 (spironolactone)、舒马普坦 (sumatriptan)、他克林 (tacrine)、他克莫司 (tacrolimus)、他莫昔芬 (tamoxifen)、坦洛新 (tamsulosin)、塔革雷汀 (targretin)、他扎罗汀 (tazarotene)、替米沙坦 (telmisartan)、替尼泊苷 (teniposide)、特比萘芬 (terbinafine)、特拉唑嗪 (terazosin)、四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol)、噻加宾 (tiagabine)、噻氯匹定 (ticlopidine)、 tirofibrin、替扎尼定 (tizanidine)、托吡酯 (topiramate)、托泊替康 (topotecan)、托瑞米芬 (toremifene)、曲马多 (tramadol)、维 A 酸 (tretinoin)、曲格列酮 (troglitazone)、曲伐沙星 (trovafloxacin)、泛癸利酮 (ubidecarenone)、缬沙坦 (valsartan)、文拉法辛 (venlafaxine)、维替泊芬 (verteporfin)、氨己烯酸 (vigabatrin)、维生素 A(vitamin A)、维生素 D(vitamin D)、维生素 E(vitamin E)、维生素 K(vitamin K)、扎鲁司特 (zafirlukast)、齐留通 (zileuton)、佐米曲坦 (zolmitriptan)、唑吡坦 (zolpidem) 和佐匹克隆 (zopiclone)。也可使用上面所列的试剂的盐、异构体和衍生物,以及它们的混合物。

[0259] 6.3. 脂蛋白复合物

[0260] 本公开提供了包含蛋白部分和脂质部分的脂蛋白复合物,其各自的组成已经如上分别在章节 6.1 和 6.2 中描述。

[0261] 一般而言,所述蛋白部分包含一种或者多种提供治疗和 / 或者预防益处的脂质 - 结合蛋白诸如载脂蛋白和 / 或者其衍生物或者类似物。所述复合物可包含单一类型的脂质 - 结合蛋白,或者可衍生自相同或者不同种类的两种或者更多种不同的脂质 - 结合蛋白的混合物。适当的脂质 - 结合蛋白如上在段落 6.1 中描述。尽管不必需,但是所述脂蛋白复合物将优选包含衍生自待治疗的动物物种的脂质 - 结合蛋白或者相应于待治疗的动物物种的氨基酸序列的脂质 - 结合蛋白,以避免产生对治疗免疫应答的诱导作用。因此,对于治疗人类患者,人源的脂质 - 结合蛋白优选用于本公开的复合物。肽模拟载脂蛋白的使用也可降低或者避免免疫应答。

[0262] 认为具有高纯度 (例如成熟且未被截短、未氧化、未被脱去酰胺的,未污染有内毒素和 / 或者未污染有其它蛋白或者核酸) 的载脂蛋白增强了治疗效能和 / 或者增强脂蛋白复合物的安全性。因此,所述蛋白部分可包含至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 成熟的全长 ApoA-I,其任选具有不超过 25%、不超过 20%、不超过 15%、不超过 10%、不超过 5% 或者约 0% 的氧化的蛋氨酸 -112 或者蛋氨酸 -148 和 / 或者不超过 15%、不超过 10%、不超过 5% 或者约 0% 的脱胺的氨基酸。所述载脂蛋白可根据本申请所述的任何方法来纯化。任选地,所述载脂蛋白可如在段落 6.1.4 中所述来制备。

[0263] 在一个具体的实施方案中,所述蛋白部分包含 ApoA-I 或者基本上由 ApoA-I 构成,例如,所述 ApoA-I 为基本纯的成熟的全长 ApoA-I,如上在段落 6.1.5 中所述。

[0264] 所述脂质部分包含一种或者多种脂质,其可为饱和的、不饱和的、天然和合成的

脂质和 / 或者磷脂。适当的脂质包括但不限于小烷基链磷脂、蛋磷脂酰胆碱、大豆磷脂酰胆碱、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、二油酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰甘油磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油诸如二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰甘油、二油酰磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酸、二棕榈酰磷脂酸、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、脑磷脂酰丝氨酸、脑鞘磷脂、二棕榈酰鞘磷脂、二硬脂酰鞘磷脂、二棕榈酰磷脂酰甘油盐、磷脂酸、半乳糖脑苷脂、神经节苷脂、脑苷脂、二月桂基磷脂酰胆碱、(1, 3)-D- 甘露糖基-(1, 3) 甘油二酯、氨基苯基糖苷、3- 胆固醇基-6'-(糖基硫基) 己基醚糖脂以及胆固醇及其衍生物。包含 SM 和棕榈酰鞘磷脂的磷脂部分可任选地包含少量的任何类型的脂质, 包括但不限于溶血磷脂质、除了棕榈酰鞘磷脂之外的鞘磷脂、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。合成的脂质为优选的, 诸如合成的棕榈酰鞘磷脂或者 N- 棕榈酰-4- 羟基二氢鞘氨醇-1- 磷酸胆碱 (植物鞘磷脂)。上面在段落 6.2 中描述了其它脂质。优选地, 脂蛋白复合物包含鞘磷脂。

[0265] 任选地, 本公开的脂蛋白复合物可负载有助于多种治疗或者诊断应用的疏水性、亲脂性或者非极性活性剂, 包括但不限于脂肪酸、药物、核酸、维生素和 / 或者营养素。适当的试剂如上描述于段落 6.2 中。

[0266] 所述脂蛋白复合物可使用本申请所述的任何方法来制备。优选地, 所述复合物如在段落 6.5.1-6.5.4 中所述的来制备。

[0267] 本申请所述的荷负电的脂蛋白复合物中脂质部分与蛋白部分的摩尔比可以改变, 并且除了其它因素之外, 该摩尔比取决于构成所述蛋白部分的载脂蛋白的特性、构成所述脂质部分的荷电磷脂的特性和数量以及荷电脂蛋白复合物的期望尺寸。由于认为载脂蛋白 (诸如 ApoA-I) 的生物活性受构成载脂蛋白的两亲性螺旋介导, 因此可方便地使用 ApoA-I 蛋白质当量来表示脂质: 载脂蛋白摩尔比的载脂蛋白部分。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。可以 ApoA-I 当量来表示其它的载脂蛋白, 根据它们含有的两亲性螺旋数目。例如, 可将通常以二硫桥键二聚体存在的 ApoA-I_M 表示为 2 当量的 ApoA-I, 原因是每分子 ApoA-I_M 含有的两亲性螺旋是每分子 ApoA-I 的两倍。相反, 可将含有一个两亲性螺旋的肽载脂蛋白表示为 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, 脂蛋白复合物 (此处定义为“R_i”) 中脂质:ApoA-I 当量的摩尔比范围为约 105:1 至 110:1。在一些实施方案中, R_i 约为 108:1。对于磷脂, 使用约为 650-800 的 MW 可以获得重量比。

[0268] 在一些实施方案中, 脂质:ApoA-I 等价物的摩尔比 (“RSM”) 的范围为约 80:1 至约 110:1, 例如约 80:1 至约 100:1。在一个具体的实例中, 脂蛋白复合物的 RSM 可为约 82:1。

[0269] 可以使用任何本领域已知的、可检测的标记物对构成荷电脂蛋白复合物的各种载脂蛋白和 / 或磷脂分子进行标记, 所述标记物包括稳定的同位素 (如, ¹³C、¹⁵N、²H 等)、放射性同位素 (如, ¹⁴C、³H、¹²⁵I 等)、荧光团、化学发光物或酶标记物。

[0270] 在优选的实施方案中, 所述脂蛋白复合物为荷负电的脂蛋白复合物, 其包含蛋白

部分和脂质部分,所述蛋白部分优选为成熟的全长 ApoA-I,且所述脂质部分包含中性磷脂、鞘磷脂 (SM) 和负电荷磷脂。

[0271] 已经发现,构成脂蛋白复合物的脂质部分的 SM 和负电荷磷脂的组成以及相对量影响构成所述复合物的组合物的均质性和稳定性。如在实施例章节所示例说明,相比于类似的组合物(其中除了 SM 之外,脂质部分包含 DPPC)而言,脂质部分包含 SM 和负电荷磷脂的构成复合物的组合物为更均质的且更稳定的。

[0272] 因此,含有 SM 和荷负电的脂质的本公开的复合物优选在不存在卵磷脂的情况下形成以改善它们的均质性和稳定性。一旦形成均质的含有 SM 和荷负电的脂质的复合物,可掺入另外的脂质诸如卵磷脂。

[0273] 当包括在内时,任选的脂质将通常构成小于约 15% 的脂质部分,尽管在一些情况下可包括更任选的脂质。在一些实施方案中,任选的脂质为小于约 10%、小于约 5% 或者小于约 2% wt%。在一些实施方案中,荷负电的脂蛋白复合物的脂质部分不包含任选的脂质。

[0274] 在一个具体的实施方案中,所述磷脂部分含有重量比范围为 90:10 至 99:1、更优选范围为 95:5 至 98:2 例如 97:3 (SM: 负电荷磷脂) 的蛋 SM、棕榈酰 SM 或者植物 SM 以及 DPPG。

[0275] 一些载脂蛋白在体内从一种脂蛋白复合物交换至另一种(对于载脂蛋白 ApoA-I 而言,这是真实存在的)。在所述交换的过程中,所述载脂蛋白通常携带一种或者多种磷脂分子。由于这种性质,预期的是,本申请所述的荷负电的脂蛋白复合物将负电荷磷脂“接种”于内源性 HDL,由此将它们转化为对肾消除更具抗性的 α 颗粒。因此,预期的是,给予本申请所述的荷负电的脂蛋白复合物和组合物将增加 HDL 的血清水平和 / 或者改变内源性 HDL 半衰期以及内源性 HDL 代谢作用。预期的是这将导致胆固醇代谢的改变和逆转脂质转运。

[0276] 如在实施例章节所示例说明,相比于具有其它重量:重量比的类似的组合物而言,ApoA-I:SM 和 DPPG 磷脂的重量比为约 1:2.7 的构成复合物的组合物为更均质的且更稳定的。因此,本公开提供了脂蛋白组合物,其中所述蛋白:脂质重量比针对均质的复合物群体的形成进行优化。对于 ApoA-I、SM 和 DPPG 的复合物以及具有相似分子量组成的复合物而言,该重量:重量比的范围为 1:2.6 至 1:3,且优选为 1:2.7。在一些具体的实施方案中,ApoA-I 蛋白部分与脂质部分的比的范围通常为约 1:2.7 至约 1:3,其中 1:2.7 是优选的。这相应于 ApoA-I 蛋白与磷脂的摩尔比为约 1:90 至 1:140。因此,本公开提供了复合物,其中所述蛋白与脂质的摩尔比为约 1:90 至约 1:120、约 1:100 至约 1:140 或者约 1:95 至约 1:125。具体地在处于该优选比时,所述 ApoA-I 蛋白部分以及 SM 和 DPPG 脂质部分形成基本上均质的复合物,其具有与天然 HDL 相同的粒度和电荷特征,如经柱色谱法和凝胶电泳所分别测定。

[0277] 荷负电的脂蛋白复合物粒度可通过改变 R_i 来控制。也就是说, R_i 越小,圆盘越小。例如,大的盘状圆盘一般具有的 R_i 的范围为约 200:1 至 100:1,而小的盘状圆盘一般具有的 R_i 的范围为约 100:1 至 30:1。

[0278] 在一些具体实施方案中,所述荷负电的脂蛋白复合物为大的盘状圆盘,其含有 2-4 个 ApoA-I 等价物(例如 2-4 个 ApoA-I 分子、1-2 个 ApoA-I_M 二聚体分子或者 12-40 个单螺旋肽分子)、1 个负电荷磷脂分子和 400 个 SM 分子。在其它具体实施方案中,所述荷负电的脂蛋白复合物为小的盘状圆盘,其含有 2-4 个 ApoA-I 等价物;1-10 个、更优选 3-6 个负电

荷磷脂分子；以及 90-225 个、更优选 100-210 个 SM 分子。

[0279] 6.3.1. 复合物和粒度的测量

[0280] 脂蛋白复合物的组成以及它们的粒度和在制备所述脂蛋白复合物中所用的脂质颗粒的粒度可使用本领域已知的各种技术来确定。

[0281] 溶液中的脂蛋白复合物的蛋白和脂质浓度可由本领域已知的任何方法来测量，包括但不限于蛋白和磷脂测定、色谱法诸如 HPLC、凝胶过滤、GC，所述 GC 偶联有各种检测器包括质谱检测、UV 或者二极管阵列、荧光、弹性光散射等。脂质和蛋白的完整性也可通过相同的色谱技术以及肽作图、SDS-PAGE 凝胶电泳、ApoA-I 的 N- 和 C- 末端序列测定以及用于确定脂质氧化的标准测定来确定。

[0282] 脂蛋白复合物以及在制备所述脂蛋白复合物中所用的脂质颗粒的粒度范围如本申请所述。脂质粒度和 / 或者脂质和蛋白复合物粒度可使用本领域已知的方法来确定。示例性方法包括动态光散射和凝胶渗透色谱法。

[0283] 动态光散射 (DLS)，也称为光子相关光谱学，其测量轰击在溶液中经布朗运动移动的颗粒的光束的波长位移。具体地，当被激光照明时所述移动的颗粒散射光以及所导致的所述散射光的强度波动可用于计算溶液中的球状粒度分布。参见，Zetasizer Nano Series User Manual, MAN0317 Issue 2.1 (July 2004)。DLS 确定了溶液中的颗粒的强度分布以及平均值，基于此，可计算颗粒体积和数目分布以及平均值。DLS 技术可用于确定用于制备脂蛋白复合物的脂质颗粒的粒度以及脂蛋白复合物本身的粒度。适当的 DLS 仪器为 Zetasizer Nano by Malvern Instruments。

[0284] 凝胶渗透色谱法 (GPC) 也可用于确定含有蛋白的复合物的粒度。基于分子大小，凝胶渗透色谱法将混合物中的成分分离。脂质 - 蛋白复合物的粒度可通过以下方法来确定：将复合物的洗脱特征与已知的标准或者参比样品的洗脱特征进行比较，通常通过与校正曲线比较。参比样品为可商购得到的且可包括蛋白和非蛋白标准品，诸如白蛋白、铁蛋白和维生素 B₁₂。Current Protocols in Molecular Biology (1998), Section IV, 10.9.1-10.9.2。

[0285] 用于制备本公开的脂蛋白复合物的脂质颗粒的粒度可为至少 45nm、至少 50nm、至少 55nm、至少 60nm，如经 DLS (例如使用基于强度的测量) 测量。此外，脂质颗粒的粒度可为至多 65nm、至多 70nm、至多 80nm、至多 90nm、至多 100nm、至多 120nm、至多 150nm、至多 200nm、至多 250nm、至多 300nm 或者至多 500nm，如经 DLS 测量。

[0286] 本公开的脂蛋白复合物的粒度范围可为 4nm 至 15nm、6nm 至 15nm、4nm 至 12nm、5 to 12nm、6nm 至 12nm、8nm 至 12nm 或者 8nm 至 10nm，如经本申请所述的技术测量。

[0287] 6.4. 脂蛋白复合物群体

[0288] 本公开进一步提供了本申请所述的脂蛋白复合物群体。所述群体包含多个本申请所述的脂蛋白复合物，其各自包含蛋白部分和脂质部分，所述蛋白部分和脂质部分例如如本申请段落 6.3 中所述。申请人已经发现了认为单独地或者组合地对于脂蛋白复合物群体的效能和安全性特征起作用的若干特征。脂蛋白复合物群体可结合本申请所述的单独的或者组合的任何数目的特征。

[0289] 首先，认为群体中的脂蛋白复合物的均一性 (即群体中的一种或者多种离散的脂蛋白复合物的普及性，如经群体中的脂蛋白复合物的一个或者多个离散的峰所表示) 以及

成熟的未修饰的载脂蛋白的脂蛋白复合物的普及性增强了效能。因此,所述脂蛋白复合物的群体可包含蛋白部分以及脂质部分,所述蛋白部分包含载脂蛋白例如 ApoA-I 或者基本上由载脂蛋白例如 ApoA-I 构成,且其中所述群体为至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99% 均质的,如经凝胶渗透色谱法的单峰中的群体百分数所测量。

[0290] 在一些实施方案中,群体中的脂蛋白复合物的粒度的范围可为 4nm 至 15nm,例如 5nm 至 12nm、6nm 至 15nm 或者 8nm 至 10nm。

[0291] 群体中的载脂蛋白例如 ApoA-I 可为成熟的优选全长(未截短的)ApoA-I,且所述群体可含有至少 75wt%、至少 80wt%、至少 85wt%、至少 90wt%、至少 95wt%、至少 96wt%、至少 97wt%、至少 98wt%、至少 99wt% 的成熟的优选全长(未截短的)ApoA-I。在一些实施方案中,所述群体包含不超过 25wt%、不超过 20wt%、不超过 15wt%、不超过 10wt% 或者不超过 5wt% 的不成熟或者不完全加工的 ApoA-I 和 / 或者不超过 20wt%、不超过 15wt%、不超过 10wt% 或者不超过 5wt% 的截短的 ApoA-I。

[0292] 第二,复合物中的载脂蛋白和脂质的纯度以及脂蛋白复合物中的污染物的相对缺失,也称为脂蛋白复合物的纯度,被认为降低副作用诸如肝酶(例如转氨酶)增加所反映的肝损伤的风险。载脂蛋白的纯度可由氧化和 / 或者脱酰胺作用的相对缺失来测量。因此,在某些实施方案中,脂蛋白复合物群体可具有降低量的氧化的载脂蛋白,诸如不超过 20%、不超过 15%、不超过 10%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%、不超过 1% 的氧化的蛋氨酸,具体为蛋氨酸 -112 或者蛋氨酸 -148,或者不超过 15%、不超过 10%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2% 或者不超过 1% 的氧化的色氨酸。脂蛋白复合物群体也可具有降低的百分比的被脱去酰胺的氨基酸,例如不超过 15%、不超过 10%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2% 或者不超过 1% 的脱氨氨基酸。

[0293] 还希望控制脂蛋白复合物中的脂质纯度。因此,在一些实施方案中,所述群体中不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2% 或者不超过 1% 的脂质被氧化。

[0294] 复合物及其群体的纯度的另外的测量为由产生或者纯化载脂蛋白的方法或者制备所述脂蛋白复合物本身的方法所产生的污染物的减少或者缺失。因此,当所述载脂蛋白由宿主细胞例如哺乳动物宿主细胞纯化时,所述脂蛋白复合物群体优选不含宿主细胞 DNA 或者蛋白。在一些具体的实施方案中,所述群体含有不超过 500 纳克、不超过 200 纳克、不超过 100 纳克、不超过 50 纳克或者不超过 20 纳克的宿主细胞蛋白 / 毫克的脂蛋白,和 / 或者不超过 100 皮克、不超过 50 皮克、不超过 25 皮克、不超过 10 皮克或者不超过 5 皮克的宿主细胞 DNA / 毫克的脂蛋白,通常为 ApoA-I。

[0295] 可产生并且应避免的其它污染物为内毒素以及溶剂和洗涤剂,所述内毒素可存在于细胞培养物和血浆样品等中,且所述溶剂和洗涤剂可取决于用于制备和 / 或者纯化所述脂蛋白复合物的方法而存在。脂蛋白复合物群体可含有至多约 1EU、约 0.5EU、约 0.3EU 或者约 0.1EU 的内毒素 / 毫克的脂蛋白例如 ApoA-I。脂蛋白复合物群体也可被限制为含有不超过 200ppm、250ppm、100ppm 的非水溶剂。在一个具体的实施方案中,所述群体不含有任何洗涤剂,例如胆酸盐。

[0296] 此外,使用本申请公开的方法,将大多数载脂蛋白起始物质掺入至复合物中是可能的,从而限制存在于群体中的非复合的载脂蛋白的量。非复合的载脂蛋白的量的降低

是有益的,这是因为其降低由于暴露至异源性蛋白所导致的免疫源应答的风险。所述脂蛋白复合物的群体可具有以下组成:其中至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或者 100%的蛋白存在于脂蛋白复合物(即复合形式)中。任选地,所述脂蛋白复合物的群体可具有以下组成:其中至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或者 100%的脂质存在于脂蛋白复合物中。

[0297] 任选地,所述群体可包含这样的复合物,其中所述脂质部分包含占脂质重量不超过 15%、不超过 10%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%、不超过 1%或者 0%的胆固醇。

[0298] 某些脂质和蛋白成分可形成多个不同的但均质的脂蛋白复合物。因此,本公开还提供了组合物,其包含两个、三个或者四个脂蛋白复合物群体,所述脂蛋白复合物包含不同量的载脂蛋白分子(例如两个、三个或者四个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物)。在示例性实施方案中,组合物包含两个脂蛋白复合物群体,即分别为包含具有 2 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物/脂蛋白复合物的脂蛋白复合物的第一群体,包含具有 3 或者 4 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物/脂蛋白复合物的脂蛋白复合物的第二群体,以及任选的包含具有 4 或者 3 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物/脂蛋白复合物的脂蛋白复合物的第三群体。

[0299] 包含两个或者更多个脂蛋白复合物群体的组合物优选具有低水平的非复合的脂蛋白和/或者脂质。因此,组合物中优选不超过 15%、不超过 12%、不超过 10%、不超过 9%、不超过 8%、不超过 7%、不超过 6%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%或者不超过 1%的脂质为非复合形式,和/或者组合物中不超过 15%、不超过 12%、不超过 10%、不超过 9%、不超过 8%、不超过 7%、不超过 6%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%或者不超过 1%的脂蛋白为非复合形式。

[0300] 本申请还提供了特别用于商业应用的脂蛋白复合物或者其群体的大规模制备,诸如用于治疗目的的脂蛋白复合物的大规模制备。本申请涵盖的制剂包括脂蛋白复合物的群体,例如本申请所述的荷负电的脂蛋白复合物。

[0301] 本申请提供了制剂,其脂蛋白复合物的体积、量和所得浓度适于按照商业规模制备组合物例如药物组合物和剂型。典型的制剂体积的范围为约 5L 至约 50L,或者更多,例如,约 10L 至约 40L、约 15L 至约 35L、约 15L 至约 30L、约 20L 至约 40L、约 20L 至约 30L、约 25L 至约 45L、约 25L 至约 35L。制剂体积可为约 5L、约 6L、约 7L、约 8L、约 9L、约 10L、约 11L、约 12L、约 13L、约 14L、约 15L、约 16L、约 17L、约 18L、约 19L、约 20L、约 25L、约 30L、约 35L、约 40L、约 45L 或者约 50L。在一个优选的实施方案中,所述制剂具有约 20L 的体积。

[0302] 制剂进一步含有脂蛋白复合物或者其群体,其量足以实现范围为约 5mg/mL 至多至约 15mg/mL、5mg/mL 至约 10mg/mL、约 10mg/mL 至约 15mg/mL 或者约 8mg/mL 至约 12mg/mL 的载脂蛋白的载脂蛋白浓度。取决于制剂的体积,所述量的范围可为约 25g 至多至约 350g,其表示为在制剂中载脂蛋白例如 ApoA-I 的量。在一个具体的实施方案中,所述制剂含有约 8mg/mL 的 ApoA-I。

[0303] 在一个具体的实施方案中,所述制剂具有 15L 至 25L 的体积且含有约 100g 至约 250g 的 ApoA-I。在另外的具体实施方案中,所述制剂具有 30L 至 50L 的体积且含有约 240g 至约 780g 的 ApoA-I。

[0304] 6.5. 制备脂蛋白复合物的方法

[0305] 6.5.1. 基于热循环的制备脂蛋白复合物的方法

[0306] 已经发现,使用本申请所述的蛋白和脂质成分的热循环的方法可用于产生脂蛋白复合物且具有优于其它方法的优势。在本申请提供的热循环方法中,蛋白成分和脂质成分经历热循环,直到大部分蛋白成分(例如至少 60%、至少 70%、至少 80%或者至少 90%)与脂质成分复合,从而形成脂蛋白复合物。本领域技术人员应该认识到,该方法优于用于产生脂蛋白复合物的其它方法的优势包括:导致基本上均质的且纯的终产物的高复合效能,在所得的产物中存在极少的副产物至没有副产物(例如非复合的蛋白)或者制备杂质(例如洗涤剂或者表面活性剂、降解蛋白、氧化成分),从而避免对于高成本和高消耗的纯化步骤的需求。因此,所述方法是有效的且导致起始物质极少-至-无浪费。此外,所述方法易于扩大规模且具有低仪器消耗。不使用工业溶剂而进行这些方法的能力使得它们也是环境友好的。

[0307] 优选地,为了使得蛋白和脂质成分的氧化最小化,复合物形成(包括脂质成分的均质化)的一个、多于一个或者所有步骤在惰性气体(例如氮气、氩气或者氦气)层下进行。

[0308] 6.5.2. 脂质成分

[0309] 本公开的热循环方法可采用单独或者组合的多种脂质,包括饱和的、不饱和的、天然的和合成的脂质和/或者磷脂,如上在段落 6.2 中所述。

[0310] 可使用产生脂质颗粒的任何方法制备脂质,用于与蛋白成分一起热循环,诸如多层脂囊(“MLV”)、小单层脂囊(“SUV”)、大单层脂囊(“LUV”)、胶束、分散体等。

[0311] 用于产生脂质颗粒的一系列技术是已知的。已经使用各种规程产生脂质颗粒,形成不同类型的脂囊。优选的是在本公开热循环方法中使用的颗粒的粒度范围主要为 45-80nm,最优选 55nm 至 75nm。

[0312] 高压匀浆例如微流化有利地产生具有适当粒度的颗粒。所述匀浆压力优选为至少 1,000 巴、至少 1,200 巴、至少 1,400 巴、至少 1,600 巴、至少 1,800 巴,且最优选至少 2,000 巴,例如至少 2,200 巴、至少 2,400 巴、至少 2,600 巴、至少 2,800 巴、至少 3,000 巴、至少 3,200 巴、至少 3,400 巴、至少 3,600 巴、至少 3,800 巴或者至少 4,000 巴。在一些具体的实施方案中,所述匀浆压力的范围为前述数值的任意一对之间,例如 1,600 至 3,200 巴;1,800 至 2,800 巴;1,900 至 2,500 巴;2,000 至 2,500 巴;2,000 至 3,000 巴;2,400 至 3,800 巴;2,800 至 3,400 巴等。1 巴等于 100kPa、1,000,000 达因/平方厘米(巴)、0.987atm(大气压)、14.5038psi、29.53inHg 和 750.06 托。

[0313] 在一种适当的匀浆方法中,将脂质的乳液转移至 Microfluidizer Model110Y(Microfluidics Inc, Newton, Mass.) 的填料容器中。将所述单元浸没在浴中以在匀浆过程中保持工艺温度(例如 55℃、58℃、62℃等),且将其在使用前用惰性气体诸如氩气冲洗。启动后,使得所述乳液以连续的再循环和跨越相互作用顶部的压力梯度经过匀浆器,历时 5-20 分钟。在不存在蛋白成分的情况下所述脂质成分的匀浆防止所述蛋白成分被匀浆技术中使用的高剪切破坏。

[0314] 也可适当使用其它方法,条件是可获得具有适当粒度的颗粒。例如,脂质通过含水溶液的水合可导致脂质的分散和多层脂囊(“MLV”)的自发形成。MLV 为具有围绕中心含水核心的多个脂质双层的颗粒。这些类型的颗粒大于小单层脂囊(SUV)且直径可为

350-400nm。MLV 可通过以下方法来制备：将脂质在圆底烧瓶中在氯仿中溶解，并蒸发所述氯仿，直到所述脂质在烧瓶壁上形成薄层。加入所述含水溶液并使得所述脂质层再水化。在烧瓶旋动或者涡旋时形成脂囊。Deamer et al., 1983, in *Liposomes* (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York (citing Bangham et al., 1965, *J. Mol. Biol.* 13:238)。该方法也可用于产生单一片状脂囊。Johnson et al., 1971, *Biochim. Biophys. Acta* 233:820。

[0315] 小单层脂囊 (SUV) 为具有封闭含水核心的单一脂质双层的颗粒。取决于用于产生 SUV 的方法，它们的粒度的直径范围为 25-110nm。第一 SUV 通过以下方法制备：将在氯仿中的磷脂制剂在氮气下干燥，加入水层以产生毫摩尔范围的脂质浓度，并在 45℃ 超声所述溶液至澄清。Deamer et al., 1983, in *Liposomes* (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York。以该方式制备的 SUV 获得直径范围为 25-50nm 的颗粒。

[0316] 制备 SUV 的另外的方法为将乙醇 / 脂质溶液快速注射至含水溶液以包囊。Deamer et al., 1983, in *Liposomes* (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York (citing Batzri et al., 1973, *Biochim. Biophys. Acta* 298:1015)。由该方法产生的 SUV 的粒度的直径范围为 30-110nm。

[0317] SUV 也可通过以下方法来制备：使得多层脂囊在 20,000psi 经过 French Press 达四次。所产生的 SUV 的粒度的直径范围为 30-50nm。Deamer et al., 1983, in *Liposomes* (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York (citing Barenholz et al., 1979, *FEBS Letters* 99:210)。

[0318] 多层和单层磷脂脂囊也可通过将磷脂的含水制剂在高压经过小孔膜挤出来形成 (Hope et al., 1996, *Chemistry and Physics of Lipids*, 40:89-107)。

[0319] 大单层脂囊与 SUV 类似，原因在于它们均为围绕所述中心含水核心的单一脂质双层，但 LUV 远大于 SUV。取决于它们的组成部分以及用于制备它们的方法，LUV 的粒度的直径范围为 50-1000nm。Deamer et al., 1983, in *Liposomes* (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York。通常使用以下三种方法中的一种来制备 LUV：洗涤剂稀释、反相蒸发以及输注。

[0320] 在洗涤剂稀释技术中，洗涤剂溶液诸如胆酸盐、脱氧胆酸盐、辛基葡糖苷、庚基葡糖苷和 Triton X-100 用于形成来自脂质制备的胶束。然后将所述溶液透析以除去所述洗涤剂。Deamer et al., 1983, in *Liposomes* (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York。

[0321] 所述反相蒸发技术将脂质在含水非极性溶液中溶解，形成倒置的胶束。将所述非极性溶剂蒸发并将所述胶束凝聚以形成 LUV。该方法通常需要大量脂质。

[0322] 所述输注方法将溶解在非极性溶液中的脂质注射至水溶液中以包囊。当所述非极性溶液蒸发时，在气体 / 液体界面上收集脂质。当气体鼓泡经过所述水溶液时，所述脂质片形成 LUV 和少层颗粒。将颗粒滤过以划分粒度。Deamer et al., 1983, in *Liposomes* (Ostro, Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York (citing Deamer et al., 1976, *Biochim. Biophys. Acta* 443:629 and Schieren et al., 1978, *Biochim. Biophys. Acta* 542:137)。

[0323] 可表征所得的脂质制剂的等分溶液以证实所述脂质颗粒适用于作为本申请公开的热循环方法中的脂质成分。脂质制剂的表征可使用本领域已知的任何方法来进行，包括但不限于尺寸排阻过滤、凝胶过滤、柱过滤、凝胶渗透色谱法以及非变性凝胶电泳。

[0324] 6.5.3. 蛋白成分

[0325] 脂蛋白复合物的蛋白成分并不是本公开热循环方法成功的关键所在。事实上,提供治疗和/或预防益处的任何脂质-结合蛋白诸如载脂蛋白和/或其衍生物或类似物均可包括在该复合物中。此外,由于在与脂质缔合时可活化 LCAT 或形成盘状的颗粒而“模拟”载脂蛋白(诸如 ApoA-I)活性的任何 α 螺旋肽或肽类似物或任何其它类型的分子可包括在脂蛋白复合物中,并且由此而包括在“脂质-结合蛋白”的定义内。可在热循环方法中使用的脂质-结合蛋白包括如上在段落 6.1 中所述的那些。所述脂质-结合蛋白可如上在段落 6.1.2 中所述重组产生。所述脂质-结合蛋白可通过本申请所述的任何方法纯化,包括如上在段落 6.1.3 或者段落 6.1.4 中所述的方法。

[0326] 本领域熟知的是,所述蛋白成分可由动物来源(且具体地来自人来源)纯化,化学合成或者重组产生,参见例如 Chung et al., 1980, J. Lipid Res. 21(3):284-91; Cheung et al., 1987, J. Lipid Res. 28(8):913-29。也参见美国专利 5,059,528、5,128,318、6,617,134;美国公开 20002/0156007、2004/0067873、2004/0077541 和 2004/0266660;以及 PCT 公开 WO/2008/104890 和 WO/2007/023476。

[0327] 所述蛋白成分可包含脂质,其中蛋白/肽与脂质的比为在预期复合物中的蛋白/肽与脂质的比的至少 5-倍(例如至少 5-倍、至少 10-倍或者至少 20-倍)。例如,为了产生其中预期的蛋白与脂质比为 1:200(基于摩尔浓度)的脂蛋白复合物,所述蛋白成分中的蛋白可与脂质以例如 1:10 至 1:20 的比例混合,所述脂质通常为仅表示最终复合物中的脂质的少部分的脂质。并未暗示任何机制,当预期的复合物具有多于一种类型的脂质时,所述蛋白与少量的脂质的该“前-”复合是有用的,这允许在由热循环产生的脂蛋白复合物中以少量(例如在预期的脂蛋白复合物中,占总脂质的重量的 10%或者更低、5%或者更低、3%或者更低、2%或者更低或者 1%或者更低)存在的脂质的更均匀的分布。

[0328] 6.5.4. 由热循环产生脂蛋白复合物

[0329] 所述方法通常使得包含脂质颗粒和脂质结合蛋白的混悬液在“高”温度范围和“低”温度范围之间进行热循环,直到形成脂蛋白复合物。

[0330] 进行热循环的混悬液含有脂质成分和蛋白成分,其优选在高温度范围内的温度混合在一起以形成“起始”混悬液,然后使其进行热循环。

[0331] 起始混悬液中的脂质和蛋白的最佳比例可由在待产生的最终脂蛋白复合物中的成分的预期化学计量来确定。本领域技术人员应该认识到,除了其它因素之外,脂质部分与蛋白部分的摩尔比将取决于蛋白成分中的蛋白和/或者肽的性质、脂质部分中的脂质的性质和量以及脂蛋白复合物的预期粒度。脂蛋白复合物中的适当的脂质与蛋白比可以使用本领域已知的任何数目的功能性测定来确定,所述功能性测定包括但不限于凝胶电泳迁移率测定、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测定来确定复合物中脂质成分与蛋白成分的最佳比例。当本公开的方法所产生的复合物荷电(作为在脂质成分中包含磷脂的结果)时,应将所述复合物设计成类似于天然前- β -HDL 或 α -HDL 颗粒的电泳迁移率。因此,在一些实施方案中,可将天然前- β -HDL 或 α -HDL 颗粒用作确定复合物的迁移率的标准品。

[0332] 在优选的实施方案中,最终复合物具有至少一种载脂蛋白或者载脂蛋白模拟物(最优选分别为成熟人 ApoA-I 或者 ApoA-I 肽)、至少一种中性脂质以及至少一种荷负电的

脂质,诸如在 PCT W02006/100567 中所述的那些,将其内容通过引用的方式并入本申请。

[0333] 由于认为载脂蛋白(诸如 ApoA-I)的生物活性受构成载脂蛋白的两亲性螺旋介导,因此可方便地使用 ApoA-I 蛋白当量来表示脂质:载脂蛋白摩尔比的载脂蛋白部分。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 当量来表示其它的载脂蛋白。例如,通常以二硫桥键二聚体存在的 ApoA-I_M可表示为 2 当量的 ApoA-I,原因是每分子 ApoA-I_M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。

[0334] 一般而言,脂蛋白复合物的脂质:ApoA-I 当量摩尔比(本申请定义为“Ri”)的范围为约 2:1 至 200:1。在一些实施方案中,所述 Ri 为约 50:1 至 150:1,或者 75:1 至 125:1、10:1 至 175:1。对于磷脂,可使用约 650-800 的 MW 获得重量比。

[0335] 在某些实施方案中,所述成分的摩尔比为 2-6(荷负电的脂质,例如 DPPG):90-120(中性脂质,例如 SM):1(ApoA-I 等价物)。在一个具体的实施方案中,如在实施例 1 中所述,所述复合物包含以约 108:1 的脂质与蛋白摩尔比的 DPPG、SM 和 ApoA-I,其中 DPPG 表示 3wt% (+/-1%) 的总脂质且 SM 表示 97wt% (+/-5%) 的脂质。

[0336] 在开始热循环之前,起始混悬液中的脂质和蛋白成分的浓度的范围可为 1 至 30mg/ml 浓度的 ApoA-I 等价物以及 1 至 100mg/ml 浓度的脂质。在一些具体的实施方案中,蛋白成分的浓度选自 1 至 30mg/ml、2 至 20mg/ml、5 至 20mg/ml、2 至 10mg/ml、5 至 15mg/ml、5 至 20mg/ml 和 10 至 20mg/ml,且脂质成分的浓度独立选自 10 至 100mg/ml、10 至 75mg/ml、25 至 50mg/ml、10 至 75mg/ml、25 至 100mg/ml、25 至 75mg/ml 和 1 至 75mg/ml。

[0337] 热循环方法的高和低度范围是基于脂蛋白复合物的脂质和蛋白成分的相转变温度。可选择地,当脂质成分不显示限定的或者离散的相转变时,如可在使用具有不饱和脂肪酸链的磷脂或者磷脂混合物时所发生,热循环的高和低度范围的差异在于至少约 20℃,至多至约 40℃或者更大。例如,在一些实施方案中,所述高和低度范围的差异为 20℃-30℃、20℃-40℃、20℃-50℃、30℃-40℃、30℃-50℃、25℃-45℃、35℃-55℃。

[0338] 对于脂质,相转变包括由紧密填充的有序结构(已知为凝胶状态)向疏松填充的较无序结构(已知为流体状态)的变化。脂蛋白复合物通常在本领域中通过以下方法形成:将脂质颗粒和载脂蛋白在接近使用的具体脂质或者脂质混合物的转变温度的温度孵育。脂质成分的相转变温度(其可由量热法确定)+/-5℃-10℃表示在本公开的方法中的“低”温度范围。

[0339] 对于蛋白,相转变温度包括由折叠的三维结构向二维结构的变化。对于脂质,相转变包括由紧密填充的有序结构(已知为凝胶状态)向疏松填充的较无序结构(已知为流体状态)的变化。脂蛋白复合物通常在本领域中通过以下方法形成:将脂质颗粒和载脂蛋白在接近使用的具体脂质或者脂质混合物的转变温度的温度孵育。

[0340] 脂质成分的相转变温度(其可由量热法确定)+/-12℃、更优选 +/-10℃表示在本公开的方法中的“低”温度范围。在某些实施方案中,所述低度范围为脂质成分的相转变温度 +/-3℃、+/-5℃或者 +/-8℃。在一个具体实施方案中,所述低度范围为所述脂质成分的相转变温度的不小于 -5℃或者不小于 -10℃至所述脂质成分的相转变温度的 +5℃。

[0341] 对于蛋白,相转变温度包括由三级结构向二级结构的变化。蛋白成分的相转变温

度 $\pm 12^{\circ}\text{C}$ 、更优选 $\pm 10^{\circ}\text{C}$ 表示在本公开的方法中的“高”温度范围。在一些具体的实施方案中,所述高温范围度为蛋白成分的相转变温度 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 或者 $\pm 8^{\circ}\text{C}$ 。在一个具体实施方案中,所述低温范围度为低于所述蛋白成分的相转变温度达 10°C 至高于所述蛋白成分的相转变温度达不超过 5°C 、不超过 10°C 或者不超过 15°C 。

[0342] 使得起始混悬液在高温度和低温度之间、优选起始于高温度来进行热循环,直到将起始混悬液中至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99% 的蛋白掺入至脂蛋白复合物中。使用适当的化学计量的脂质和蛋白成分,可在若干循环之后实现脂质和蛋白成分的基本上完全复合。循环的次数取决于蛋白和脂质成分、循环的持续时间,但通常基本上完全复合将需要 5 次或者更多次循环、10 次或者更多次循环或者 15 次或者更多次循环(在高和低温度)。所述循环的范围通常为 2 分钟至 60 分钟。在一些具体的实施方案中,在每个温度,所述循环的范围为 5 至 30 分钟、10 至 20 分钟、5 至 20 分钟、2 至 45 分钟或者 5 至 45 分钟。

[0343] 由所述方法产生的复合物通常为超分子集合物,其形态为胶束、脂囊、球状或者盘状颗粒且具有均匀的粒度分布,其中所述蛋白成分以所述磷脂和蛋白之间的具体化学计量范围物理结合至所述磷脂。本方法有利地导致起始混悬液中的脂质和 / 或者蛋白的基本上完全复合,产生基本上不含脂质和 / 或者不含蛋白的组合物,如经分离方法诸如色谱法所观察。因此,本公开的方法可在不存在纯化步骤的情况下进行。

[0344] 本公开的方法有利地产生粒度分布均匀的复合物,这避免了对于粒度分级的需求。

[0345] 在本公开的一些实施方案中,所述脂蛋白复合物将含有多于一种类型的脂质,包含相对少量(例如小于 10%、小于 5%、小于 3% 或者小于 1% 的脂质成分)的一种或者多种脂质。为了优化分散,以少量使用的脂质可预先与蛋白成分共混,而不是掺入至脂质成分中的脂质颗粒。

[0346] 可对所得的脂蛋白复合物的等分溶液进行表征以证实所述复合物具有预期的特征,例如所述蛋白成分基本上完全的(例如 $>90\%$ 、 $>95\%$ 、 $>97\%$ 或者 $>98\%$) 掺入至所述脂质成分中。复合物的表征可使用本领域已知的任何方法来进行,包括但不限于尺寸排阻过滤、凝胶过滤、柱过滤、凝胶渗透色谱法以及非变性凝胶电泳。

[0347] 本申请所述的脂蛋白复合物或者组合物的均质性和 / 或者稳定性可由本领域已知的任何方法来测量,所述方法包括但不限于色谱方法诸如凝胶过滤色谱法。例如,在一些实施方案中,单峰或者有限数目的峰可与稳定的复合物相关。所述复合物的稳定性可通过监测随时间推移新的峰的出现来确定。新的峰的出现为由于颗粒的不稳定性所导致的复合物的重组的征象。

[0348] 优选地,为了使得蛋白和脂质成分的氧化最小化,所述热循环在惰性气体层(例如氮气、氩气或者氦气)下进行。

[0349] 6.5.5. 制备脂蛋白复合物的其它方法

[0350] 可以将本申请所述的脂蛋白复合物(包括荷负电的脂蛋白复合物)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。除了如上所述的热循环方法之外,可以使用本领域技术人员公知的多种方法来制备所述脂蛋白复合物。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)以形成复合物。可选择地,载脂蛋白例如 ApoA-I 可以与预成型的脂质囊泡组合以便自发形成脂蛋白复合物。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复合物,所述洗涤剂透析法例如将载脂蛋白、荷电的磷脂和 SM 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负电的脂蛋白复合物(参见,例如 Jonas et al., 1986, Methods in Enzymol. 128:553-82)。

[0351] 在一些实施方案中,复合物通过使用高压(例如约 32000p. s. i.)进行均化达约 40、约 50 或者约 60 分钟来制备。在一个具体的实施方案中,包含 ApoA-I、SN 和 DPPG 的复合物如下制备。将 ApoA-I 溶解于磷酸盐缓冲剂中,并在 50℃ 与 DPPG 在磷酸盐缓冲剂中的分散液(使用高剪切混合器制备)一起孵育。然后将所述 ApoA-I/DPPG 混合物与 SM 的分散液混合,并在高于 30,000p. s. i. 的压力在 30-50℃ 均化,直到复合物形成基本上完成,如经动态光散射或者凝胶渗透色谱法监测。

[0352] 在一些实施方案中,通过美国公开 2004/0067873 的实施例 1 中描述的胆酸盐分散法来制备脂蛋白复合物,将其内容通过引用的方式并入本申请。简要地,将干燥的脂质在 NaHCO₃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,同时周期性进行涡旋和超声,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 NaHCO₃缓冲液,并将该溶液在约 37℃ -50℃ 孵育 1 小时。

[0353] 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®** (Bio-Rad 实验室)加于荷负电的脂蛋白复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,比如脂蛋白复合物与胆酸盐的胶束制剂通过填装有亲合珠的柱子。

[0354] 在一个具体的实施方案中,通过将该制剂装载于注射器内的 **BIO-BEADS®** 上而由脂蛋白复合物制剂除去胆酸盐。然后使用隔膜密封该注射器并于 4℃ 摇摆孵育过夜。使用前,通过将该溶液注射通过 **BIO-BEADS®** 而除去胆酸盐,胆酸盐在 **BIO-BEADS®** 中被所述珠吸附。

[0355] 当具有类似于 HDL,特别是类似于前-β-1 或前-β-2HDL 群中的 HDL 的尺寸与密度时,本申请所述的脂蛋白复合物诸如荷负电的脂蛋白复合物预期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。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 ApoA-I-脂质复合物。简要地,共冷冻干燥步骤包括将 ApoA-I 和脂质的混合物一起溶解于有机溶剂或溶剂混合物中,或者将 ApoA-I 和脂质单独溶解后再把它们混合到一起。用于共冷冻干燥的溶剂或溶剂混合物的期望特征包括:(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,以及由此更少的冷冻干燥器损耗。在一些实施方案中,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。

[0356] 然后将 ApoA-I-脂质溶液进行冷冻干燥以获得均质的粉末。可以对冷冻干燥的条件进行优化以获得溶剂的快速蒸发,并使冷冻干燥的载脂蛋白-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。

[0357] 所述冷冻干燥的脂蛋白复合物可用于制备用于药物再配制的散装供应品 (bulk supplies), 或者制备可以重构以获得脂蛋白复合物的溶液或者混悬液的单独等分部分或剂量单位。对于重构, 使用水溶液将冷冻干燥的粉末再水化为适当的体积 (例如 5mg 多肽 / ml, 其便于静脉内注射)。在一些实施方案中, 使用磷酸盐缓冲盐水或者生理盐水溶液将冷冻干燥的粉末再水化。可将所述混合物振摇或者涡旋以便于再水化。重构步骤可在等于或者大于复合物的脂质成分的相转变温度的温度进行。

[0358] 在冷冻干燥的载脂蛋白-脂质粉末与具有合适 pH 和渗透压的水性介质进行水合后可自发形成 ApoA-I-脂质复合物。在一些实施方案中, 该水合介质含有稳定剂, 选自但不限于蔗糖、海藻糖和甘油。在一些实施方案中, 为了形成复合物, 将该溶液加热超过脂质的转变温度几次。脂质与蛋白的比可为 1:1 至 200:1 (摩尔 / 摩尔), 且优选 3:1 至 2:1 的脂质:蛋白 (w/w), 更优选 2.7:1 至 2.1:1 的脂质:蛋白 (w/w), 例如 7:1 的脂质:蛋白 (w/w)。将粉末进行水合以获得最终的复合物浓度, 其以蛋白当量表示为约 5-30mg/ml。

[0359] 在多个实施方案中, 通过将多肽溶液的 NH_4CO_3 水溶液进行冷冻干燥而获得 ApoA-I 粉末。然后 ApoA-I 与脂质 (例如鞘磷脂) 的均匀溶液通过以下方法形成: 将脂质粉末与 ApoA-I 粉末溶解于冰醋酸中。然后将该溶液进行冻干, 并通过使所得的粉末与水性介质水合而形成类似于 HDL 的载脂蛋白-脂质复合物。

[0360] 在一些实施方案中, 可以通过将磷脂与蛋白溶液或混悬液进行共冷冻干燥而形成 ApoA-I-脂质复合物。可以将 ApoA-I 和脂质 (例如磷脂) 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 ApoA-I-脂质复合物。用于该方法的有机溶剂和溶剂混合物的实例包括但不限于乙酸、乙酸 / 二甲苯混合物、乙酸 / 环己烷混合物以及甲醇 / 二甲苯混合物。

[0361] 可对所得的重构制剂的等分溶液进行表征以证实所述复合物具有预期的粒度分布; 例如, HDL 的粒度分布。用于表征所述粒度的示例性方法为凝胶过滤色谱法。具有已知分子量和斯托克斯直径的一系列蛋白以及人 HDL 可用作用于定标所述柱的标准物。

[0362] 在其它实施方案中, 重组 ApoA-I-脂质复合物通过将 ApoA-I 与脂质复合来制备, 如在美国专利公开 2006/0217312 和国际公开 WO 2006/100567 (PCT/IB2006/000635) 所披露, 将其内容通过引用方式并入本申请。

[0363] 美国专利 6,004,925、6,037,323、6,046,166 和 6,287,590 (将其内容通过引用方式并入本申请) 公开了一种用于制备具有类似于 HDL 性质的荷负电的脂蛋白复合物的简单方法。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中形成荷负电的脂蛋白复合物, 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复合物, 因而避免了对于其它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复合物, 因而使所得的复合物可以在即将使用前进行重构; (5) 所得的复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)。

[0364] 其它适当的方法描述于美国公开的申请 2006/0217312 和国际公开 WO 2006/100567 (PCT/IB 2006/000635), 将其各自的内容通过引用的方式并入本申请。

[0365] 优选地, 为了使得蛋白和脂质成分的氧化最小化, 复合物形成的一个、多于一个或者所有步骤在惰性气体 (例如氮气、氩气或者氦气) 层下进行。

[0366] 可以通过本领域已知的任何方法来测量载脂蛋白-脂质颗粒溶液中的蛋白与脂质浓度, 所述方法包括但不限于蛋白与磷脂测定以及色谱法, 诸如 HPLC、凝胶过滤、与各种检测器连接的 GC, 而所述检测器包括质谱、UV 或二极管阵列、荧光、弹性光散射及其它。还可以通过相同的色谱技术以及肽作图、SDS-PAGE 凝胶电泳、N- 和 C- 末端的 ApoA-I 序列测定以及用于确定脂质氧化的标准测定来确定脂质与蛋白的完整性。

[0367] 6.6. 药物组合物

[0368] 本公开所涵盖的药物组合物包括作为活性成分的荷负电的脂蛋白复合物, 该复合物包含在药用的、适用于体内给药和递送的载体中。由于肽可以包含酸性和 / 或碱性的端链和 / 或侧链, 因此肽模拟的载脂蛋白可以游离酸或碱的形式、或者以药用盐形式包括在该组合物中。还可以使用改性的蛋白, 如酰胺化、酰化、乙酰化或聚乙二醇化的蛋白。任选地, 所述药物组合物可包含加载有一种或者多种疏水性、亲脂性或者非极性活性剂的脂蛋白复合物, 如上在段落 6.2 和 6.3 中所述。

[0369] 可注射的组合物包括活性成分在水性或油性媒介物中的无菌混悬液、溶液或乳剂。该组合物还可包含多种配方成分, 如助悬剂、稳定剂和 / 或分散剂。在一些实施方案中, 可注射的组合物包含在磷酸盐缓冲盐水 (10mM 磷酸钠, 80mg/mL 蔗糖, pH 8.2) 中的荷负电的脂蛋白复合物。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, 该输液袋由与荷负电的脂蛋白复合物相容的材料制成, 如乙烯乙酸乙烯酯或本领域已知的任何其它相容的材料。

[0370] 适当的剂型包含最终浓度为约 5mg/mL 至约 15mg/mL 的脂蛋白的荷负电的脂蛋白复合物。在一个具体的实施方案中, 所述剂型包含最终浓度为约 8mg/mL 至约 10mg/mL 的载脂蛋白 A-I、优选约 8mg/mL 的荷负电的脂蛋白复合物。

[0371] 优选地, 为了使得蛋白和脂质成分的氧化最小化, 所述药物组合物在惰性气体 (例如氮气、氩气或者氦气) 层下配制和 / 或者填充。

[0372] 6.7. 治疗方法

[0373] 事实上, 本申请所述的脂蛋白复合物例如荷负电的脂蛋白复合物和组合物可以用于脂蛋白复合物的各种显示为有用的目的。脂蛋白复合物诸如荷负电的脂蛋白复合物有效地动员胆固醇, 甚至在以显著低于目前可用的治疗方案所需的载脂蛋白的量的剂量给药 (每 2-5 天给予 20mg/kg 至 100mg/kg, 1.4g 至 8g/ 平均身高的人类) 时。

[0374] 因此, 本公开的复合物和组合物特别用于治疗或者预防心血管疾病、障碍和 / 或者相关病症。治疗或者预防受试者中的心血管疾病、障碍和 / 或者相关病症的方法通常包括向所述受试者给予低 (<15mg/kg) 剂量或者量的本申请所述的脂蛋白复合物或者药物组合物, 其根据有效治疗或者预防具体适应症的治疗方案。

[0375] 以足以或者有效提供治疗益处的量给予脂蛋白复合物。在治疗心血管疾病、障碍和 / 或者相关病症的情境下, 可推断出治疗益处, 条件是出现以下的一种或者多种: 相比于

基线而言胆固醇动员的增加、动脉粥样硬化斑块体积的降低、相比于基线水平而言游离胆固醇的高密度脂蛋白 (HDL) 部分的增加,而没有平均血浆甘油三酯浓度的增加或者肝转氨酶 (或者丙氨酸氨基转移酶) 水平的正常范围之上的增加。尽管希望完全治愈,但是完全治愈不是存在治疗益处所必需。

[0376] 在一些实施方案中,所述脂蛋白复合物以每次注射约 2mg/kg ApoA-I 等价物至约 12mg/kg ApoA-I 等价物的剂量给予。在一些实施方案中,所述脂蛋白复合物以约 3mg/kg ApoA-I 等价物的剂量给予。在一些实施方案中,所述脂蛋白复合物以约 6mg/kg ApoA-I 等价物的剂量给予。在一些实施方案中,所述脂蛋白复合物以约 12mg/kg ApoA-I 等价物的剂量给予。

[0377] 待治疗的受试者为患有心血管疾病、障碍和 / 或者相关病症的个体。可使用本申请所述的脂蛋白复合物和组合物治疗或者预防的所述心血管疾病、障碍和 / 或者相关病症的非限制性实例包括外周血管性疾病、再狭窄、动脉粥样硬化以及动脉粥样硬化的众多临床表现诸如中风、缺血性中风、短暂性缺血发作、心肌梗塞、急性冠脉综合征、心绞痛、间歇性跛行、严重肢体缺血、心瓣狭窄和房脉瓣硬化。受试者可为具有急性冠脉综合征诸如心肌梗塞 (具有或者不具有 ST 升高) 或者不稳定心绞痛的先前发病的个体。所治疗的受试者可为任意动物例如哺乳动物,具体为人类。

[0378] 在一个实施方案中,所述方法涵盖治疗或者预防心血管疾病的方法,包括以在给予后不改变患者的基线 ApoA-I 的量向受试者给予本申请所述的荷电的脂蛋白复合物或者组合物。

[0379] 在其它实施方案中,所述方法涵盖治疗或者预防心血管疾病的方法,包括向受试者给予有效量的本申请所述的脂蛋白复合物 (例如荷电的复合物) 或者组合物,以便在给药约 2 小时后,获得比给药前基线 (最初的) 浓度高出约 5mg/dL 至 100mg/dL 的游离或复合的载脂蛋白血清浓度,和 / 或者在给药后约 24 小时后,获得比给药前基线 (最初的) 浓度高出约 5mg/dL 至 20mg/dL 的游离或复合的载脂蛋白血清浓度。

[0380] 在另一个实施方案中,该方法包括治疗或预防心血管疾病的方法,其包括向受试者给予本申请所述的、有效量的脂蛋白复合物 (例如荷电的复合物) 或者组合物,以便在给药后至少一天内,获得比给药前最初的 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。

[0381] 在另一个实施方案中,该方法包括治疗或预防心血管疾病的方法,其包括向受试者给予本申请所述的、有效量的脂蛋白复合物 (例如荷电的复合物) 或者组合物,以便在给药后的 5 分钟到 1 天之间,获得 30 至 300mg/dL 的 HDL- 胆固醇成分的循环血浆浓度。

[0382] 在另一个实施方案中,该方法包括治疗或预防心血管疾病的方法,其包括向受试者给予本申请所述的、有效量的脂蛋白复合物 (例如荷电的复合物) 或者组合物,以便在给药后的 5 分钟到 1 天之间,获得 30 至 300mg/dL 的胆固醇酯的循环血浆浓度。

[0383] 在另外的实施方案中,该方法包括治疗或预防心血管疾病的方法,其包括向受试者给予本申请所述的、有效量的脂蛋白复合物 (例如荷电的复合物) 或者组合物,以便在给药后至少一天内,获得比给药前的基线 (最初的) 浓度高至少约 10% 的增加的粪便胆固醇分泌。

[0384] 本申请所述的脂蛋白复合物 (包括荷负电的脂蛋白复合物) 或者组合物可以单独

使用或与用于治疗或预防前述病症的其它药物进行联合治疗。这样的治疗包括但不限于所包括药物的同时或依序给药。例如,在高胆固醇血症诸如家族性高胆固醇血症(纯合或者杂合)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、他汀类药物、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别有益的疗效,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;他汀类药物抑制胆固醇的合成,减少 LDL 群(并且也许增加 LDL 受体的表达);而本申请所述的脂蛋白复合物(包括荷负电的脂蛋白复合物)影响 RCT,增加 HDL 并促进胆固醇外流。

[0385] 在另外的实施方案中,本申请所述的脂蛋白复合物(包括荷负电的脂蛋白复合物)或者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、再狭窄、血管或外周血管疾病、动脉粥样硬化(包括治疗和预防动脉粥样硬化);如下描述了示例性制剂和治疗方案。

[0386] 本申请所述的脂蛋白复合物(包括荷负电的脂蛋白复合物)或者组合物可以以增加小 HDL 成分的剂量给药,所述小 HDL 成分例如前- β 、前- γ 和前- β 状 HDL 成分、 α 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 的那些参数以及斑块的脂质组成和钙化。

[0387] 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)。

[0388] 通过肠胃外的给药途径可实现最佳的给药,其包括静脉内注射(IV)、肌肉注射(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、吸入器或导管进行给药。在一些实施方案中,该脂蛋白复合物例如荷负电的脂蛋白复合物以获得与通过肠胃外给药获得的循环血清浓度相等的循环血清浓度的量,通过注射、皮下植入泵或贮库制品进行给药。例如,该复合物还可吸收在支架或其它的装置中。

[0389] 可以通过多种不同的治疗方案来实现给药。例如,可以在一天内定期地给药几次静脉内注射,其中累积的注射总体积不能达到每日毒性剂量。所述方法包括以 6、7、8、9、10、11 或者 12 天的间隔给药脂蛋白复合物。在一些实施方案中,所述脂蛋白复合物以一周的间隔给药。

[0390] 所述方法可进一步包括以如上所述的任何间隔给予所述脂蛋白复合物 4、5、6、7、8、9、10、11 或者 12 次。例如,在一个实施方案中,给予脂蛋白复合物六次,在每次给药之间的间隔为 1 周。在一些实施方案中,给药可如下完成:给予一系列注射,然后停止注射达 6 个月至 1 年,然后再开始另外一系列的注射。然后可在每年或者每 3-5 年给予维持的系列注射。可历时一天(灌注以保持复合物的特定血浆水平)、若干天(例如历时 8 天的时间内四次注射)或者若干周(例如历时 4 周的时间内四次注射)完成所述系列注射,然后在六个月至一年后重新开始。对于慢性病症,可在发展基础上进行给药。任选地,所述方法可在诱导期后实施,当更频繁地给予脂蛋白复合物时。

[0391] 在又一备选方案中,可以给药渐增的剂量,开始时以每次给药 50-200mg 之间的剂

量给药约 1 至 5 次,随后每次给药时重复 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给药,通过 1 小时或更少时间的快速输注进行给药,或者通过一次快速推注给药。

[0392] 可以使用细胞培养中的标准药物规程或者使用确定 LD50 (群体 50% 的致死剂量) 和 ED50 (群体 50% 的治疗有效剂量) 的实验动物来确定各种脂蛋白复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脂蛋白复合物诸如荷负电的脂蛋白复合物。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同化如此大的量。由于胆固醇从红细胞的动员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。

[0393] 患者可以在采取医疗措施之前接受数天至数周的治疗 (如,预防性治疗)、或在采取医疗措施之中或之后接受数天至数周的治疗。所述给药可以与另一种有创疗法相伴或同时进行,所述有创疗法如血管成形术、颈动脉消融术、rotoblader 或器官移植 (如,心脏、肾、肝等)。

[0394] 在某些实施方案中,将荷负电的脂蛋白复合物给药于胆固醇合成受他汀类药物或胆固醇合成抑制剂控制的患者。在其它实施方案中,将荷负电的脂蛋白复合物给药于接受结合树脂 (例如,半合成树脂如消胆胺) 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。

[0395] 6.8. 其它用途

[0396] 可以在体外检测中使用本申请所述的脂蛋白复合物例如荷负电的脂蛋白复合物和组合物来测量血清 HDL,例如,出于诊断的目的。由于 ApoA-I、ApoA-II 和 Apo 肽与血清中的 HDL 组分缔合,因此荷负电的脂蛋白复合物可作为 HDL 群和前- β 1 以及前- β 2HDL 群的“标记物”使用。此外,该荷负电的脂蛋白复合物可作为在 RCT 中有效的 HDL 亚群的标记物使用。为此,可将荷负电的脂蛋白复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负电的脂蛋白复合物来分析 HDL 组分。这可通过使用标记的荷负电的脂蛋白复合物 (如,放射性标记、荧光标记、酶标记、染料等) 实现,或者通过使用对荷负电的脂蛋白复合物具有特异性的抗体 (或抗体片段) 的免疫测定实现。

[0397] 可选择地,成像法 (如, CAT 扫描、MRI 扫描) 可以使用标记的荷负电的脂蛋白复合物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。

[0398] 与某种原 ApoA-1 脂质复合物的制备和表征相关的实施例以及数据在美国专利公开 2004/0067873 中描述,将其内容通过引用的方式并入本申请。

[0399] 在使用某种原 ApoA-1 脂质复合物的动物模型系统中获得的数据在美国专利公开 2004/0067873 中描述,将其内容通过引用的方式并入本申请。

[0400] 7. 实施例 1: ApoA-I 表达系统的开发

[0401] 7.1. 人 ApoA-I 在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中的克隆和表达

[0402] 7.1.1. ApoA-I 表达载体的制备

[0403] 前原 ApoA-I 基因序列由 NCBI (P02647) 获得且加入侧翼序列以便易于克隆和改善表达。合成了具有侧翼序列的编码前原 ApoA-I 的 DNA 并将其克隆至 Bluescript KS+ 载体

中。所述 5' 侧翼序列含有优化的 Kozak 翻译序列。将前原 ApoA-I 插入物由 Bluescript KS+ 载体用 Hind III 和 Bgl II 限制酶切割。将该片段经凝胶纯化并连接至带有如下遗传成分的逆转录病毒表达载体：与莫洛尼小鼠肉瘤病毒 5' LTR 融合的人巨细胞病毒启动子、MoMuLV/SV 包装区域、即早猿猴巨细胞病毒启动子、多克隆位点、MoMuLV 的 3' LTR 以及细菌复制起始区和 β -内酰胺酶基因。将所得结构的克隆经基因和侧翼区进行序列确定。根据与预测的 DNA 序列的一致性来选择最终的克隆（克隆 #17）。然后使用共转染有用于水泡性口膜炎病毒包装糖蛋白的表达质粒的 293GP 细胞来制备用于转导的 Retrovector。由共转染的细胞回收并浓缩的上清液用于如下在段落 7.1.2 中所述的 CHO-S 转导步骤。

[0404] 7.1.2. 用于表达 ApoA-I 的哺乳动物细胞系的产生

[0405] 使用如上在段落 7.1.1 中所述的逆转录病毒载体使得适于在无血清培养基中生长的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-S) 进行三次转导 (1X、2X 和 3X)。将收集的群体扩大以用于在每次转导后的深低温保藏并使得细胞样品进行基因拷贝分析。基因拷贝指数显示于如下表 2 中。针对在 16- 天加料分批测试（一式两份）中在 125mL 烧瓶中的生产率对 3X 转导的细胞系进行分析。结果显示于表 3 中。

[0406]

表 2 ApoA-I 表达细胞系的基因拷贝指数结果		
转导次数	转导后的细胞系名称	基因拷贝指数
1	* CHO-S-ApoA-I-R (1X)	2.53
1	* CHO-S-ApoA-I-R (1X)	
2	** CHO-S-ApoA-I-R (2X)	5.50
2	** CHO-S-ApoA-I-R (2X)	
3	* CHO-S-ApoA-I-R (3X)	7.23

[0407] * 在进行产生 2X 细胞系之前将 1X 细胞系混合

[0408] ** 在进行产生 3X 细胞系之前将 2X 细胞系混合

[0409] 表 3

[0410] CHO-S-ApoA-I-R (3X) 的加料分批生产率数据

[0411]

3X 收集的群体	天数					
	2	4	6	8	10	12
VCD* (x 10 ⁵ 个细胞/mL)	10.49	**	66.33	69.10	74.73	51.74
μ g/mL (经 ELISA)	89	459	1339	2755	2775	2658

[0412] * 存活细胞密度

[0413] ** 由于收集误差未经 d4 细胞计数

[0414] 7.1.3. 表达 ApoA-I 的细胞系的稳定性

[0415] 非 GMP 表征研究在 CHO-S-ApoA-I-R (3X) 克隆 (17, 其为产生 ApoA-I 的原始细胞库) 上进行, 以评估其在存活率、生长率、基因插入物的保存以及在长期培养过程中的一致产物分泌方面的稳定性。

[0416] 将细胞系由原始细胞库解冻并使用 PF CHO LS 培养基 (HyClone, Logan UT) 在 125mL 摇瓶中培养。通过由第 0 代至第 43 代的连续传代将细胞连续培养。在第 4、8、14、19、25、31、36 和 43 代, 将细胞样品冷冻。在培养结束时, 将来自所有代的细胞样品解冻并用

于终末培养以比较在相同试验中不同代的细胞系的 ApoA-I 蛋白产生。在第 12 天使用反相 HPLC 分析测试来自每个样品的上清液以确定 ApoA-I 产生的水平。发现各个样品的 ApoA-I 浓度由 1259mg/L 变化至 1400mg/L (图 2)。

[0417] 为了比较基因插入物的稳定性,将第 0、4、14、25、36 和 43 代的 CHO 细胞样品用于 DNA 分离。使用对基因组 DNA 的实时 PCR 来确定用于每个样品的遗传插入物的数目。如在表 3 中显示,根据在第 0 代至第 43 代之间的重叠的标准偏差,拷贝数的基于 PCR 的指数并非显著不同。发现 ApoA-I 的产生以及原始细胞库细胞系的基因拷贝指数值在所测试的 43 代中是稳定的。

[0418] 表 4

[0419] 基因拷贝指数的稳定性

[0420]

代	基因拷贝指数	标准偏差
0	7.87	0.25
4	7.80	0.27
14	7.80	0.27
25	7.97	0.25
36	7.90	0.17
43	8.20	0.27

[0421] 7.2. ApoA-I 的细胞生长和收集

[0422] 7.2.1. 接种物和 200L 生物反应器生产的规模放大

[0423] 将一瓶稳定转染有来自原始细胞库的人 ApoA-I 基因的 CHO-S 细胞在 37℃ 水浴中解冻并加入至含有 35mL HyQ PF-CHO LS 细胞培养基的单一的摇瓶 (250mL) (Thermo Fisher Scientific) 中。使用血细胞计数器确定的初始细胞计数为 2.48×10^5 个细胞 /mL 且存活率为 93.8%。然后将培养物置于在 37℃ 在潮湿的 5% CO₂ 环境中保持的孵育箱中的轨道振荡器 (90rpm) 上。次代培养步骤将接种密度定标在约 1.6×10^5 个细胞 /mL。在烧瓶中第 4 天的细胞计数和存活率百分数分别为 15.01×10^5 个细胞 /mL 以及 93.9%。将 250mL 烧瓶培养物次代培养至 1L 烧瓶。来自 1L 烧瓶中的第 3 天平均存活的细胞计数为 13.56×10^5 个细胞 /mL 且存活率为 95.3%。将 1L 烧瓶培养物经次代培养至具有 10L 一次性 Wave 袋的 Wave 生物反应器系统 20EH (GE Healthcare Bioscience Bioprocess Corp, Somerset, NJ), 其初始培养体积和初始定标密度分别为 1000mL 和 1.75×10^5 个细胞 /mL。所述 Wave 生物反应器操作设定为 37℃ 的孵育温度、15.0cpm 的摇杆速度、10.9° 的摇摆角度以及 5.0% 的 CO₂ 浓度且在具有 0.25L/ 分钟的气体流速的通气条件下。在 3 天培养后, Wave 袋中的存活细胞密度为 10.73×10^5 个细胞 /mL, 且加入新鲜的 HyQ PF-CHO LS, 使得培养基体积为 5000mL。在另外的三天后, 存活细胞密度为 13.25×10^5 个细胞 /mL 且将 Wave 袋的容积转移至 30L 生物反应器中。对于温度、pH、溶解氧、压力和振动率的 30L 生物反应器的操作设定点分别为

37℃、pH 7.0、40%气体饱和度、1磅/平方英寸压力和 50rpm 振动率。

[0424] 三天培养的 30L 生物反应器中的存活细胞密度为 10.80×10^5 个细胞/mL, 其足以以 2.40×10^5 个细胞/mL 的初始靶标密度接种于 200L 生物反应器中。转移 30L 的全部内容物且接种后重量、细胞密度和存活率分别为 134.5Kg、 2.37×10^5 个细胞/mL 和 90.9%。对于温度、pH、溶解氧、压力和振动率, 200L 生物反应器的操作设定点分别为 37℃、pH 7.0、40%气体饱和度、1磅/平方英寸压力和 35rpm 振动率。在第 3 天, 细胞密度为 15.71×10^5 个细胞/mL, 其足以将 60L (v/v) 的完全培养基 (AGT CD CHO 5X, Invitrogen) 和 200mM L-谷氨酰胺 (终浓度为 10mM) 溶液加入至生物反应器。在第 8 和 12 天, 葡萄糖水平跌至低于 5g/L, 其促使加入 3g/L 的葡萄糖 (20%) 溶液。第 9 天的存活细胞密度最大值为 33.20×10^5 个细胞/mL 且存活率为 92.5%。在第 13 天收集生物反应器中的细胞, 且细胞存活率为 78.5%。整个培养期间的培养物的细胞计数和存活率显示于图 3A 中且整个培养期间的培养基中的 ApoA-I 浓度显示于图 3B 中。

[0425] 7.2.2. 细胞的收集、分离和储存

[0426] 通过使得生物反应器内容物先后经过双重 Cuno (Rutherford, NJ, USA) 60M02Maximizer 滤器以及 Millipore 0.22 μ m Opticap (Billerica, MA, USA), 将来自生物反应器的培养基收集于 200L 袋中。然后将澄清的培养基储存在 2-8℃直到开始分配操作。将澄清的培养基经 Millipore 0.22 μ m 滤器 (Billerica, MA, USA) 滤过并分配至 2L 无菌 PETG 瓶 (ThermoFisher, Marietta, OH, USA) 中, 然后在 -20℃冷冻直到释放以用于装运。

[0427] 8. 实施例 2: APOA-I 纯化系统的开发

[0428] 8.1. 材料和方法

[0429] 表达、初始分离和预处理.

[0430] 通过储存在环境温度将在实施例 1 中获得的 ApoA-I 澄清的细胞生长培养基 (约 1.8L) 解冻。将解冻的培养基进行预处理以用于阴离子交换色谱法 (用 1M HCl 降低 pH 5.3 ± 0.2)。

[0431] Apo A-I 的纯化.

[0432] 将以 20cm 的底料高度填充的 Q- 琼脂糖 FF (GE Healthcare) 阴离子交换柱用 TAMP A 缓冲剂 (20mM 磷酸钠, pH 5.3) 平衡。当柱洗脱液的 pH 为约 5.5 时, 判断平衡完成。将预处理的滤液载入至柱上 (25-35g ApoA-I/L 的阴离子交换树脂, 流速为 3.7cm/min)。将 ApoA-I 经柱 (TAMP A 流动相) 洗涤, 将其收集。

[0433] 将来自阴离子交换柱的含有 ApoA-I 的流动相用 1M NaOH 调节 pH 为 8.0 ± 0.2 。然后将溶液以约 12.5L/h/m² 的流速经 0.2 μ m Planova 20N 滤器 (Asahi Kasei Medical) 滤过以除去病毒和病毒颗粒。

[0434] 当柱洗脱液达到 pH 9.5 时, 将具有 25cm 的底料高度的 Source 30 反相色谱柱用 TAMP D 缓冲剂 (20mM 碳酸铵, pH 9.5) 洗涤直到平衡。将来自病毒滤过步骤的含有 ApoA-I 的滤液以 2.8cm/min 的流速载入至柱上。将样品中的 ApoA-I 吸附到基质上并用 35-50% 乙腈在 TAMP D 缓冲剂中的梯度洗脱。

[0435] 当柱洗脱液达到 pH 9.5 时, 将以 25cm 的底料高度填充的反相硅胶 C18 柱 (300Å 10 μ m) 在 TAMP E 缓冲剂 (100mM 碳酸铵, pH 9.5) 中洗涤直到平衡。然后将 C18 柱以 4.7g ApoA-I/L 基质加载。将吸附到柱基质上的 ApoA-I 以 40-50% 乙腈在 TAMP E 缓冲剂中的梯

度洗脱。

[0436] 通过如下将乙腈由 C18 柱洗脱的含有 ApoA-I 的级份除去:收集并将所述级份浓缩约 2.5 倍,然后将所述浓缩物经 15 体积的 TAMP C 缓冲剂 (3mM 磷酸钠, pH 8) 渗滤。使用稀磷酸将渗滤的 ApoA-I 溶液的 pH 降低至约 6.0, 然后经过 Mustang Q 阴离子交换膜 (Pall Life Sciences) 以除去 DNA 和宿主细胞蛋白。将 Mustang Q 滤液经 5 体积的 TAMP C 缓冲剂渗滤。

[0437] 然后使用具有 10,000 道尔顿的分子量筛截 (molecular weight cutoff) 的聚醚砜膜 (Filtron Omega series) 将渗滤的滤液进行最终的超滤, 以使得所述膜保留 28,000 道尔顿的 ApoA-I。所述蛋白溶液含有 7.8-17g/L 纯的 ApoA-I, 如通过扫描 SDS-PAGE 凝胶且测量纯的 ApoA-I 条带区域的密度与所有条带的总密度的比所确定。

[0438] 8.2. 结果

[0439] ApoA-I 的表征.

[0440] 经 SDS-PAGE 将 ApoA-I 产物的纯度测定为大于 99% 纯的, 其具有低水平的 DNA 和宿主细胞蛋白, 且无可检测量的截短的 ApoA-I。参见图 4。

[0441] 9. 实施例 3: 脂蛋白复合物成分的优化

[0442] 9.1. 载脂蛋白和磷脂成分的制备

[0443] 原 ApoA-I:

[0444] 蛋白原 ApoA-I 以每 100mL 瓶含有约 90mg 蛋白的冻干品由 Unitéde Biotechnologie, Institut Meurice, Hte Ecole Lucia De Brouckère, 1Avenue Emile Gryzon, B-1070Anderlecht, Belgium 供应。批号为 20060202。该蛋白使用前在约 4℃ 保存。在冻干之前, 原 ApoA-I 的浓度为 3.225mg/mL, 其中脘的含量为约 0.011mg/mL。通过将约 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。

[0445] ApoA-I:

[0446] ApoA-I 如上在实施例 1 中所述来制备。

[0447] 鞘磷脂:

[0448] 来自蛋的鞘磷脂 (Coatsome® NM-10) 由日本的 NOF 公司, 1-56, Oohama-Cho, Amagasaki-Shi, 660-0095 供应。批号为 0502ES1。鞘磷脂使用前在约 -20℃ 保存。鞘磷脂的纯度为 99.1%。鞘磷脂溶液通过以下方法制备: 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。

[0449] 磷脂酰甘油:

[0450] 1,2-二棕榈酰-SN-甘油-3-磷脂酰甘油 (phosphatidyl glycerol) 的钠盐 (DPPG-Na, Coatsome® 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 使用前在约 -20℃ 保存。DPPG-Na 的纯度为 99.2%。DPPG-Na 溶液通过以下方法制备: 将 49.1mg 的 DPPG-Na 溶解于 1mL 的乙酸 /5% 水中, 得到 50mg/mL 的终浓度。

[0451] 磷脂酰胆碱:

[0452] 二-棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 由商购来源获得。

[0453] 9.2. 脂蛋白复合物的制备

[0454] 制备如下脂蛋白复合物：

[0455] (a) 中性脂蛋白复合物：

[0456] a. 式 A：原 ApoA-I 和 SM，其中蛋白：磷脂重量比为 1:2.5；

[0457] b. 式 B：原 ApoA-I 和 SM，其中蛋白：磷脂重量比为 1:2.7；

[0458] c. 式 C：原 ApoA-I 和 SM，其中蛋白：磷脂重量比为 1:3.1；

[0459] d. 式 D：原 ApoA-I、SM 和 DPPC，其中脂蛋白 wt：总磷脂 wt 比为 1:2.7，SM:DPPC 比为 50:50；

[0460] e. 式 E：ApoA-I 和 SM，其中蛋白：磷脂重量比为 1:2.7。

[0461] (b) 荷负电的脂蛋白复合物：

[0462] a. 式 F：原 ApoA-I、SM、DPPC 和 DPPG，其中脂蛋白 wt：总磷脂 wt 比为 1:2.7，SM:DPPC:DPPG wt:wt 比为 48:48:4；

[0463] b. 式 G：原 ApoA-I、SM、DPPC 和 DPPG，其中脂蛋白 wt：总磷脂 wt 比为 1:2.7，SM:DPPC:DPPG wt:wt 比为 73:23:4；

[0464] c. 式 H：ApoAI、SM 和 DPPG，其中脂蛋白 wt：总磷脂 wt 比为 1:2.7，SM:DPPG wt:wt 比为 97:3；

[0465] d. 式 I：ApoAI、SM 和 DPPG，其中脂蛋白 wt：总磷脂 wt 比为 1:3.0，SM:DPPG wt:wt 比为 97:3；

[0466] e. 式 J：ApoAI、SM 和 DPPG，其中脂蛋白 wt：总磷脂 wt 比为 1:3.3，SM:DPPG wt:wt 比为 97:3。

[0467] 9.3. 脂蛋白复合物的配制率和均质性

[0468] 通过将样品注射至 HPLC 系统来测试式 A-J 的脂蛋白复合物的配制，以检查脂蛋白复合物的粒度和分布。复合物经共-匀浆产生并在指定时间取样。

[0469] 图 5 显示了包含不同的脂蛋白：SM wt:wt 比的式 A-C 的中性脂蛋白复合物以及包含脂蛋白和中性磷脂比为 1:2.7 的式 D 的中性脂蛋白复合物（其中所述中性磷脂为 50:50 的 SM:DPPC）的示例性 HPLC 色谱图。优选所述脂蛋白：SM wt:wt 比为 1:2.7。含有 SM 和 DPPC 混合物的式 D 显示出弱的复合物形成。

[0470] 加入作为第二中性磷脂的磷脂酰胆碱导致缓慢且不完全的复合物形成。图 6 显示出式 D 的脂蛋白复合物在 10、20、30 和 60 分钟的 HPLC 色谱图。相反地，如在图 7 中显示，式 B 快速形成复合物。

[0471] 向 SM 和 DPPC 加入负电荷磷脂、DPPG 导致甚至更弱的复合物形成，如在图 8 中的式 F 的脂蛋白复合物在 20、40、60 和 120 分钟的 HPLC 色谱图中显示。

[0472] 如在图 9 中显示，仅含有 SM 作为磷脂的蛋白与脂质重量比为 1:2.7 的脂蛋白复合物形成更强的前-β HDL 复合物，且与具有相同的蛋白与脂质重量比但含有 DPPC 和 / 或者 DPPG 的脂蛋白复合物相比更快地形成。因此，仅包含 SM 作为中性脂质的脂蛋白复合物形成更均质的脂蛋白复合物，其相比于除了 SM 之外包含 DPPC 且加入或者不加入 DPPG 的复合物而言以更快的速率形成。

[0473] 最后，相比于包含载脂蛋白：磷脂重量比为 1:3.3 的复合物以及未荷电的脂蛋白复合物而言，包含载脂蛋白：磷脂重量比为 1:2.7-1:3 的荷负电的脂蛋白复合物（其中磷脂部分含有 97:3 重量比的 SM 和 DPPG）显示出优化的均质性且无游离脂质的峰。参见图 10，

显示出式 E、H、I 和 J 的 HPLC 色谱图。选择式 B 和 H 的脂蛋白复合物以用于在动物中进一步研究（实施例 6），且基于动物研究的结果，选择式 H 的脂蛋白复合物以用于人类患者中的临床评估（实施例 6 和 8）。

[0474] 10. 实施例 4：使用基于热循环的方法形成脂蛋白复合物

[0475] 10.1. 用于制备 ApoA-I/DPPG/鞘磷脂复合物的方法综述

[0476] 蛋白浓度为 1-30mg/ml、通常为 5-20mg/ml 的冷冻的 ApoA-I 在磷酸盐缓冲剂（pH 7-9）中的溶液通过在 2-8℃解冻约 24-96 小时来制备并称重。将磷酸二氢钠和磷酸氢二钠加入至 ApoA-I 溶液中，获得在 pH 7.4 缓冲剂中的 10mM 的最终肽浓度。

[0477] DPPG 溶液通过以下方法制备：将磷酸盐缓冲剂（10mM 磷酸钠，pH 8.0）温热至 50℃的目标。将 DPPG 粉末（NOF 公司）在环境温度解冻至少 1.5 小时，然后称重并加入至缓冲剂容器中。然后使用 **ULTRA-TURRAX®** 高性能分散器（**IKA®** Works, Inc.）将 DPPG 在 50℃的温度分散。分散后，将 DPPG 混悬液和 ApoA-I 溶液加热至 57℃。将它们合并并在 57℃在氮气下加热 30 分钟。将该前 - 复合物溶液冷却至室温。

[0478] 将鞘磷脂（SM）粉末（NOF 公司）在环境温度解冻，然后在玻璃池中称重。将磷酸盐缓冲剂（10mM 磷酸钠，pH 8.0）加热至 50℃，与 SM 粉末混合以获得 SM 浓度为 220mg/ml。使用 **ULTRA-TURRAX®** 将 SM 粉末分散在混悬液中并将所述分散液冷却至 4℃，然后经过匀浆器。经动态光散射（DLS）监测所述 SM 颗粒，其 ζ (Z) 平均粒度为 55-70nm（使用强度测量）。这可通过例如使用 Nano DeBee 匀浆器在 32000+/-3000 巴来实现，其中入口温度为 10-18℃且出口温度优选为 30-40℃（且不超过 59℃），导致所述颗粒具有 58nm 的 Z- 平均粒度。

[0479] 对于复合，将所述 ApoA-I/DPPG 混合物和 SM 分散液分开温热至 57℃。将温热的 SM 分散液加入至 ApoA-I/DPPG 混合物中，其中初始温度设定点为 57℃。在搅拌混合后，将溶液冷却至 37℃，然后使其经过一系列热循环（57℃ -37℃）以形成 ApoA-I/DPPG/SM 复合物。持续进行该加热 - 冷却过程，其中在各温度之间的接触时间为 5 分钟 -30 分钟。重复该加热 - 冷却循环直到大部分蛋白成分掺入至脂蛋白复合物中。在热循环过程中的复合物的粒度和分布经凝胶渗透色谱法（GPC）监测。

[0480] ApoA-I/DPPG/SM 复合物根据如上所述的方法来制备（且于图 11 示例说明）。所述 ApoA-I 蛋白具有相应于图 1 中描绘的序列的位置 25-267 的氨基酸序列。所述复合物含有 97:3 的重量比的鞘磷脂（SM）和 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸 - (1' - 外消旋 - 甘油)（二棕榈酰磷脂酰甘油或者 DPPG）。ApoA-I 蛋白与总脂质的比为 1:2.7 重量 / 重量 (w/w)，其相当于 1:108 的摩尔比。使用如图 12 中所述安置的热交换器将混合的脂质和蛋白成分在 57℃ -37℃之间循环，每个温度循环 5 分钟，所述热交换器在左侧包括 Lauda Ecoline Star edition Type 26LE 水浴（样品在其中进行热循环）且在右侧包括壳 & 管热交换器（模型 EF-C50-HE），其具有 18-ml 保持体积，由蠕动泵连接。

[0481] 将 180mg DPPG 加入至 2.82 克 10mM 磷酸盐缓冲剂（pH 8.0）中。将所述混悬液在 50℃用 **ULTRA-TURRAX®** 分散器分散 10 分钟。将 22 克 SM 粉末与 78 克 10mM 磷酸盐缓冲剂（pH 8.0）混合。将所述混悬液在 50℃用 **ULTRA-TURRAX®** 分散器分散 20-40 分钟。使用 NanoBEE 将 SM 匀浆化，获得 60nm 的平均粒度。使得 DPPG、SM 和蛋白达到 57℃。

在 57℃ 将 18mg (0.3ml) DPPG 加入至在 10mM 磷酸盐缓冲剂 (pH 7.4) 中的 214mg ApoA-I 蛋白中。在 57℃ 保持 30 分钟后, 加入 559mg SM 颗粒 (2.54ml)。然后使得该溶液进行热循环, 形成复合物。

[0482] 在热循环 30 分钟、60 分钟、120 分钟、180 分钟和 210 分钟后显示 ApoA-I/DPPG/SM 复合物形成的凝胶渗透色谱法分别显示于图 13A-13E 中。随着循环时间的增加, 产生更致密的复合物, 如通过主要 GPC 峰的锐度增加所显示。相应于非复合的蛋白的峰也随着时间推移而消失。

[0483] 10. 2. ApoA-I/ 鞘磷脂复合物的形成

[0484] ApoA-I/SM 复合物根据如上所述制备, 但不使得 ApoA-I 与 DPPG 预先复合。所述蛋白成分为浓度为 8.9mg/ml 的 5ml ApoA-I 且所述脂质成分为已经混悬于 10mM 磷酸盐缓冲剂 (pH 8.0) 中并均质形成 60nm 的脂质颗粒的 0.5ml 蛋鞘磷脂 (220mg/ml)。使得所述蛋白和脂质成分在 50℃ 以 1:2.5wt:wt 的比例混合。使用如在图 12 中所述的热循环装置使得所得混悬液进行热循环达 18 小时 (108 次循环且循环时间为 10 分钟)。凝胶渗透色谱法显示出形成的蛋白 / 脂质复合物为基本上均质的 (参见图 14 的 GPC 色谱图)。

[0485] 10. 3. ApoA-I/DPPG/N- 棕榈酰 -4- 羟基二氢鞘氨醇 -1- 磷酸胆碱 (植物鞘磷脂) 复合物的形成

[0486] ApoA-I/DPPG/ 植物鞘磷脂复合物根据如上所述的方法形成。将植物鞘磷脂颗粒均质为约 183nm 的粒度 (经 DLS 测量) 并加入至 7.8g/L 蛋白 : DPPG 混合物中, 获得 1:2.7 的最终蛋白与脂质 (SM 和 DPPG) 比。使得含有 N- 棕榈酰 -4- 羟基二氢鞘氨醇 -1- 磷酸胆碱 (植物 - 鞘磷脂) 以及蛋白 : DPPG 成分的混悬液在 37℃ 热循环六次, 每次循环 10 分钟且在 57℃ 热循环六次, 每次循环 10 分钟, 总计两小时。凝胶渗透色谱法显示出形成的蛋白 / 脂质复合物基本上为均质的 (参见图 15 的 GPC 色谱图)。

[0487] 10. 4. ApoA-I/DPPG/ 合成的棕榈酰鞘磷脂的形成

[0488] ApoA-I/DPPG/ 合成的棕榈酰鞘磷脂复合物如下制备。使得合成的棕榈酰鞘磷脂 (220mg/ml) 在 10mM 磷酸盐缓冲剂 (pH 7.4) 中的 8.8mL 溶液混合直到达到 3300nm 的粒度。使得 ApoA-I (945mg, 14mg/ml) 与 0.03wt% DPPG (60mg/ml) 混合并在 50℃ 加热 30 分钟。使得合成的棕榈酰鞘磷脂微团与蛋白 / DPPG 复合物以 1:2.7 的载脂蛋白 : 磷脂重量比混合。使得蛋白和脂质的混悬液在 37℃ 和 57℃ 的热 - 冷循环 (每十分钟交替一次) 下进行热循环, 总计达 240 分钟或者直到获得适当的粒度分布。在热循环过程中的复合物的粒度和分布经 GPC 监测。在络合后, 浓度达到 8.0mg ApoA-I/ml, 然后将蔗糖 (40mg/ml) 和甘露醇 (20mg/ml) 加入至复合物中以用于等渗。将脂蛋白复合物经 GPC 测定且发现其为基本上均质的 (参见图 16 的 GPC 色谱图)。

[0489] 10. 5. ApoA-I/DPPG/ 植物鞘磷脂的形成

[0490] ApoA-I/DPPG/ 植物鞘磷脂复合物如下制备。将植物鞘磷脂 (220mg/ml) 在 10mM 磷酸盐缓冲剂 (pH 7.4) 中的 2.0mL 溶液在 50℃ 分散于 ULTRA-TURRAX® 中达 40 分钟直到获得 990nm 的粒度。使得 ApoA-I (15.6mg, 浓度为 7.8mg/ml) 与 0.03wt% DPPG (60mg/ml) 混合并在 57℃ 加热 30 分钟。使得植物鞘磷脂溶液与蛋白 / DPPG 混合物以 1:2.7 的载脂蛋白 : 磷脂重量比混合。然后将蛋白和脂质的混悬液在 37℃ 和 57℃ 的热 - 冷循环 (每十分钟交替一次) 下进行热循环, 总计达 240 分钟或者直到获得适当的粒度分布。将所述

脂蛋白复合物的群体经 GPC 测量且发现其为约 92.6% 均质的 (参见图 17 的 GPC 色谱图)。

[0491] 10.6. 具有 ApoA-I 肽的复合物的形成

[0492] ApoA-I 肽、DPPG 和鞘磷脂的复合物如上 (参见段落 10.1) 所述产生, 使用 ApoA-I 肽 (H-Lys-Leu-Lys-Gln-Lys⁵-Leu-Ala-Glu-Leu-Leu¹⁰-Glu-Asn-Leu-Leu-Glu¹⁵-Arg-Phe-Leu-Asp-Leu²⁰-Val-Inp²²-OH; SEQ ID NO:4) 溶液。所述磷脂成分由 48.5:48.5:3 的重量比的蛋鞘磷脂 (SM)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (二棕榈酰磷脂酰胆碱, DPPC) 和 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-[-磷酸-外消旋-(1-甘油)] (二棕榈酰磷脂酰基-甘油, DPPG) 组成。肽与总磷脂复合物的比为 1:2.5 (w/w)。所述药物复合物为 CER-522 复合物在磷酸盐缓冲盐水 (12mM 磷酸钠, 130mM 氯化钠, pH 8.2) 中的溶液。所述复合物通过以下方法形成: 使得起始溶液在 50°C 和 37°C 之间进行热循环达两小时 (流速为 1ml/min)。

[0493] 凝胶渗透色谱法显示出形成的蛋白/脂质复合物为基本上均质的, 其中大部分蛋白已经掺入至脂蛋白复合物中 (参见图 18 的 GPC 色谱图)。

[0494] 10.7. 脂质粒度以及热循环次数对复合物形成的影响

[0495] 研究了脂质粒度以及热循环次数对粒度的影响。具有四种不同的起始脂质粒度 (ζ 平均值为 85nm、77nm、66nm 和 60nm) 的制剂 (分别为图 19A-19D) 通过以下方法产生: 使得 SM 溶液以单一路径经过 NanoBEE。针对其 ζ 平均值分析每个路径。脂质粒度随着每个路径而减小且在达到预期粒度时收集所述脂质颗粒。在段落 10.1 的复合物形成方法中测试了四种不同的脂质粒度, 进行五或七次循环, 在 37°C 的每次循环 3 分钟且在 57°C 的每次循环 10 分钟。

[0496] 当所述脂质成分与蛋白成分混合时, 所得的混悬液为浑浊的。当复合物形成时, 浑浊度降低, 且所述溶液变得更透明。

[0497] 五次循环后, 由 60nm 脂质颗粒产生的复合物的混悬液为最透明的。GPC 色谱图 (图 20A-20D) 显示了所有样品的完全或者几乎完全的复合, 如经主峰均质性所证实。当起始于 66nm 脂质颗粒时, 在所得的脂蛋白复合物混悬液中经 GPC 未检测到非复合的蛋白, 这表明在五次循环后所有蛋白与脂质复合, 且所得的复合物为 98% 纯的。七次循环后, 所有四个混悬液均变得更透明, 这显示更大程度的复合。使用 60nm 脂质颗粒制备的混悬液似乎最澄清。

[0498] 在分开的研究中, 使用段落 10.1 所述的方法使得 450nm 和 40nm 的 SM 颗粒与 ApoA-I 和 DPPG 复合。使用 450nm SM 颗粒作为脂质成分将大部分 (但并非全部) ApoA-I 掺入至脂蛋白复合物中, 如在图 21A 的 GPC 色谱图所显示 (9.8 分钟的峰)。使用 40nm SM 颗粒作为脂质成分将极小部分的 ApoA-I 掺入至脂蛋白复合物中, 如在图 21B 的 GPC 色谱图所显示 (9.551 分钟的峰)。

[0499] 10.8. 起始温度对于复合物形成的作用

[0500] 研究了起始热循环温度对复合物形成的作用。ApoA-I/DPPG/SM 复合物如在段落 10.1 中所述产生, 除了将所述脂质成分和蛋白成分温热至 37°C (而不是 57°C) 并在 37°C (而不是 57°C) 混合。所得的复合物的 GPC 色谱图显示于图 22 中。相比于热循环初始于 57°C 时, 基本上较少的蛋白成分掺入至脂蛋白复合物中, 如经相对大的蛋白峰 (在 9.455 分钟洗脱出, 图 22) 所证实。

[0501] 10.9. 使用热循环方法的脂蛋白复合物的商业生产

[0502] 针对大规模的商业制造,本公开的方法可提升规模且任选地结合配制步骤。商业的实施方案描述于图 23 中。在该实施方案中,在热循环步骤后,将所述脂蛋白复合物稀释,与一种或者多种等渗剂(例如蔗糖和/或者甘露醇)混合,滤过,并等分至小瓶中。可将小瓶中的内容物冷冻干燥以延长所得制剂的贮存期限。

[0503] 使用 DaBEE2000 将描述于段落 10.1 的 ApoA-I/DPPG/SM 复合物以 20-L 的规模产生。将该复合物用磷酸盐缓冲剂(pH 7-8)稀释并与蔗糖和甘露醇混合,获得含有磷酸盐缓冲剂(10mM pH 7.4)、8mg/ml ApoA-I、4% (w/w) 蔗糖和 2% (w/w) 甘露醇的最终制剂。

[0504] 10.10. 由热循环制备的脂蛋白复合物与由共匀浆制备的脂蛋白复合物的比较

[0505] 将由本申请所述的热循环方法制备的 ApoA-I/DPPG/SM 复合物与由脂质和蛋白成分的共匀浆制备的复合物进行比较。相比于由共匀浆制备的复合物而言,由热循环制备的复合物的纯度改善至 97%,如经凝胶渗透色谱法所测量。使用 SDS-PAGE,相比于由共匀浆的复合物而言,由热循环制备的复合物具有 98%的增加的主带纯度,且存在较少截短的蛋白条带。

[0506] 相比于共匀浆化,ApoA-I 的氧化也通过热循环法降低。RP-HPLC(C18)显示,在共匀浆的复合物中在 RT 0.93 和 0.99 存在两个氧化峰,其在热循环法中不存在。肽图也显示,相比于由共匀浆产生的复合物而言,在由热循环产生的复合物中在 ApoA-I 蛋氨酸的 Met 112 和 Met 148 存在氧化降低。

[0507] 数据汇总显示于如下表 5 中。

[0508]

表 5-使用共匀浆和热循环制造的 ApoA-I/DPPG/SM 复合物的结果				
测试	批次结果			
	共匀浆 批次 A	共匀浆 批次 B	热循环 批次 A	热循环 批次 B
经 GPC 显示的复合物	86%	93%	96.9%	97.5%

[0509]

的纯度				
经 SDS-PAGE 显示的 ApoA-I 的纯度	条带# % 1 0.3 2 5.4 3 3.4 主要 89.5 4 1.3	条带# % 1 1.4 2 1.7 主要 95.7 4 1.3	条带# % 主要 98.1	条带# % 2 1.2 主要 98.1
经 HP-SEC 显示的 ApoA-I 的纯度	RRT % 0.97 4.9 1.00 98.2 1.10 12.8	RRT % 0.97 1.5 1.00 84.9 1.10 13.6	RRT % 0.97 1.2 1.00 98.2 1.10 0.6	RRT % 0.96 0.7 1.00 98.7 1.11 0.6
经 RP-HPLC (C18)显示的 ApoA-I 的异质性	RRT % 0.93 6.7 0.94 N/A 0.96 1.4 0.97 0.7 0.99 53.1 1.00 38.1	RRT % 0.93 0.9 0.94 0.5 0.96 1.0 0.97 2.6 0.99 N/A 1.00 94.7	RRT % 0.93 N/A 0.94 1.3 0.96 1.4 0.97 3.5 0.99 N/A 1.00 93.5	RRT % 0.93 N/A 0.94 1.1 0.96 1.1 0.97 3.2 0.99 N/A 1.00 94.4
经肽图/胰蛋白酶、具有 UV 指纹的 RP-UPLC 显示的 ApoA-I 的异质性	M ₁₁₂ ox = 73.1% ^a M ₁₄₈ ox = 4.4%	M ₁₁₂ ox = 5.5% ^a M ₁₄₈ ox = 1.0%	M ₁₁₂ ox = 4.9% ^a M ₁₄₈ ox = 1.5%	M ₁₁₂ ox = 3.6% ^a M ₁₄₈ ox = 0.9%

[0510] 表 5 缩写 :GPC = 凝胶渗透色谱法,Rt = 保留时间 ;NMT = 不多于 ;SDS-PAGE = 十二

烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 ;HP-SEC = 高性能 - 分子排阻色谱 ;RP-HPLC = 反相 - 高效液相色谱 ;RRT = 相对保留时间 ;RP-UPLC = 反相 - 超高效液相色谱法 ;M₁₁₂ox = ApoA-I 残基 112 蛋氨酸氧化 ;M₁₄₈ox = ApoA-I 残基 148 蛋氨酸氧化 .

[0511] 10. 11. 惰性气体在制造方法中的用途

[0512] ApoA-I 为灵敏的蛋白,其易感于化学不稳定性(例如氧化)。为了增强 ApoA-I 在含有 ApoA-I/SM/DPPC 的药物组合物的稳定性,在氮气(惰性气体)气氛下制备(包括热循环、填充和完成步骤)药物组合物。如下为对由共匀浆制备的 ApoA-I/SM/DPPC 复合物与由氮气下的热循环制备的 ApoA-I/SM/DPPC 复合物进行比较的研究结果。

[0513]

表 6 -由两种不同方法制备的 ApoA-I/SM/DPPC 复合物中 Met ₁₁₂ 和 Met ₁₄₈ 的氧化水平的比较分析				
批次编号	批次大小	制造方法	气氛	氧化水平
1	10 L	共匀浆	空气	M ₁₁₂ ox = 14.8% M ₁₄₈ ox = 0.8%
2	9.6 L	共匀浆	空气	M ₁₁₂ ox = 64.3% M ₁₄₈ ox = 2.5%
3	9.0 L	共匀浆	空气	M ₁₁₂ ox = 71.3% M ₁₄₈ ox = 2.5%
4	19.9 L	共匀浆	空气	M ₁₁₂ ox = 38.0% M ₁₄₈ ox = 0.9%
5	18.0 L	共匀浆	空气	M ₁₁₂ ox = 5.9% M ₁₄₈ ox = 0.8%
6	17.4 L	共匀浆	空气	M ₁₁₂ ox = 73.1% M ₁₄₈ ox = 4.4%
7	12.0 L ²	共匀浆	空气	M ₁₁₂ ox = 5.5%

[0514]

表 6 -由两种不同方法制备的 ApoA-I/SM/DPPC 复合物中 Met ₁₁₂ 和 Met ₁₄₈ 的氧化水平的比较分析				
批次编号	批次大小	制造方法	气氛	氧化水平
				M ₁₄₈ ox = 1.0%
8	21.6 L	热循环	氮气	M ₁₁₂ ox = 4.9% M ₁₄₈ ox = 1.5%
9	16.7 L	热循环	氮气	M ₁₁₂ ox = 3.6% M ₁₄₈ ox = 0.9%

[0515] 实施例 5 :体外胆固醇外流研究

[0516] 在 Fu5AH 大鼠肝细胞瘤细胞中研究 ApoA-I- 脂质复合物的生物活性,其测量 ABCA1- 介导的胆固醇外流。

[0517] Fu5AH 大鼠肝细胞瘤细胞具有清除剂受体组 B 类型 I (SRB1) 的高表达,这促进细胞和成熟 HDL 之间的胆固醇的双向流动。该模型提供了针对 HDL- 介导的胆固醇外流活性的特定测定。所述测定使用 Mweva et al., 2006, "Comparison of different cellular models measuring in vitro the whole human serum cholesterol efflux capacity," Eur. J. Clin. Invest. 36, 552-559 所述的方法来进行。将 Fu5AH 细胞用 ³H- 胆固醇标记 24 小时。针对每个测试样品 (30、20 和 10 μg/ml 的 ApoA-I/DPPG/ 棕榈酰 SM、ApoA-I/DPPG/ 蛋 SM 或

者 ApoA-I/DPPG/ 植物 SM, 用 MEM 稀释, 所述 MEM 经 25mM HEPES 缓冲) 以及对照样品 (由人血浆 (20 μ g/mL) 纯化的 ApoA-I、HDL₃、2% 人血清、单独培养基) 制备用于外流的受体介质。将含有测试或者对照样品的受体培养基加入至细胞达 4 小时, 并测量在外流介质和单层细胞中的胆固醇, 以确定由 Fu5AH 细胞释放的胆固醇百分数。计算测试样品的生物活性且其表示为胆固醇外流相对于如上所述的式 H 的参比标准品 (具有与测试样品中的脂蛋白复合物相同的浓度, 其用作阳性试验对照) 的百分数。结果显示于如下表 7 中, 并证实所测试的脂蛋白复合物具有显著的生物活性, 如经胆固醇外流测定所测量。

[0518] 表 7- 在基于 Fu5AH 细胞的测定中的生物活性 (通过诱导的胆固醇外流)

[0519]

复合物	SR-BI 介导的%外流 20 μ g/ml	参比标准品%
ApoA-I/DPPG/棕榈酰鞘磷脂	3.70 $\pm$ 0.09	92 %
ApoA-I/DPPG/蛋鞘磷脂	3.61 $\pm$ 0.05	89%
ApoA-I/DPPG/植物鞘磷脂	2.24 $\pm$ 0.04	56%

[0520] 12. 实施例 6: 兔子中式 B 和式 H 复合物的单一、低剂量给药的药效研究

[0521] 正常兔子接受了以下的单一注射: (a) 5mg/kg 剂量的式 B 制剂 (含有 1:2.7 的载脂蛋白: 磷脂重量比的 ApoA-I 和 SM 的中性脂蛋白复合物); (b) 5mg/kg 剂量的式 H 制剂 (含有 1:2.7 的载脂蛋白: 磷脂重量比以及 97:3 的 SM:DPPG 重量比的 ApoA-I、SM 和 DPPG 的荷负电的脂蛋白复合物); 或者 (c) 对照制剂, 其含有用于脂蛋白复合物制剂的稀释剂。使用式 B、式 H 和对照的每种来测试四只兔子。

[0522] VLDL 总胆固醇和甘油三酯随时间推移的血浆水平显示于图 24 和 25 中。相比于用式 B (ApoA-I 和 SM 的脂蛋白复合物) 处理的动物中的水平, 在用式 H (ApoA-I/DPPG/SM 复合物) (b) 处理的动物中的血浆 VLDL 总胆固醇水平增加较少且更快地返回至基线。针对甘油三酯水平观察到类似效果。该研究显示, 相比于中性脂蛋白复合物而言, 对于 ApoA-I/DPPG/SM 复合物, 这些水平的暂时升高具有较短的持续时间。该结果与式 H 的脂蛋白复合物在人类受试者中的 I 期研究的结果 (描述于如下实施例 8) 一致。

[0523] 13. 实施例 7: 蛋 SM 与合成的棕榈酰 SM 的比较药效研究

[0524] 研究了静脉内注射至兔的载脂蛋白 A-I (ApoA-I) / 蛋 SM 和 ApoA-I / 合成的棕榈酰 SM 脂蛋白复合物的药效作用。在注射脂蛋白复合物后, 测量了血浆脂质和脂蛋白水平的变化。

[0525] 将 ApoA-I / 蛋 SM 或者 ApoA-I / 合成的 SM 脂蛋白复合物以 5mg/kg 或者 20mg/kg 的剂量以 1mL/min 的速率经静脉内输注至耳静脉来对兔给药。研究了 4 只动物 / 组。在给药前采集血浆样品, 在输注结束后立即采集血浆样品, 且在输注开始后的 30 分钟、45 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、6 小时、8 小时、10 小时和 30 小时采集血浆样品。然后针对总胆固醇、未酯化的胆固醇、磷脂和总甘油三酯使用商业酶试剂盒分析血浆样品。使用商业 ELISA 试剂盒在血浆样品中测定 ApoA1。经 GPC 分析所述血浆样品以确定总胆固醇和未酯化胆固醇分布。对于 5mg/kg 剂量的处理, 基于色谱图痕迹的曲线下总面积的百分数来定量所述结果。

[0526] 图 26A-26D 显示了在用 5mg/kg 和 20mg/kg 的 ApoA-I / 蛋 SM 或者 ApoA-I / 合成的

SM 输注的兔中胆固醇、甘油三酯、磷脂和 ApoA-I 随时间推移的血浆水平。在给予的两种剂量的输注开始后 30 分钟内观察到快速且显著的胆固醇动员：在给予 5mg/kg 剂量后 30 分钟时观察到胆固醇动员峰，且在 20mg/kg 剂量观察到胆固醇动员的大幅增强。在测试的每个剂量，两种制剂均具有血浆甘油三酯、血浆磷脂和血浆重组人 apoA-I 的相似分布。

[0527] 图 27A-27C 显示了血浆 HDL- 总胆固醇水平、血浆 LDL- 总胆固醇水平和血浆 VLDL- 总胆固醇水平。对于 ApoA-I/ 蛋 SM 和 ApoA-I/ 合成的 SM，HDL- 总胆固醇的增加是相似的（图 27A）。血浆 LDL-C 和 VLDL-C 水平存在极少变化，且所述水平基本上不被注射每种制剂的脂蛋白复合物所改变（图 27B-27C）。

[0528] 该研究的结果显示 ApoA-I/ 蛋 SM 和 ApoA-I/ 合成的 SM 脂蛋白复合物具有相似的体内反应。

[0529] 14. 实施例 8 :ApoA-I/DPPG/SM 复合物在健康血脂异常受试者中的 I 期研究

[0530] 14. 1. 材料和方法

[0531] I 期临床试验作为随机的、双盲的、安慰剂对照的、交叉的、单一升高剂量的研究在具有大于 3.0 的 LDL/HDL 比的健康志愿者中使用式 H 的脂蛋白复合物进行。该 I 期研究的目标是评估在作为单剂量给药时荷负电的脂蛋白复合物的安全性、耐受性、药代动力学以及药效学。研究了 0.25、0.75、2.0、5.0、10.0、15.0、30.0 和 45.0mg/kg 的逐渐升高的剂量。受试者经输注接受了已经通过蛋白和脂质成分的共匀浆制备的含有 ApoA-I（如在实施例 1 中所述制备）、SM 和 DPPG（1:2.7 的蛋白：脂质重量比且 97% SM/3% DPPG(w/w) 的脂质组成）的脂蛋白复合物的无菌溶液。所述无菌溶液为除了脂蛋白复合物之外还含有甘露醇和蔗糖（4%（w/w）蔗糖、2%（w/w）甘露醇）的 10mM 磷酸盐缓冲的溶液（pH 8.0）。

[0532] 14. 2. 结果

[0533] 如下汇总了来自该 I 期研究的临床发现。

[0534] 总胆固醇：在每个时间点的平均血浆总胆固醇浓度如下显示于表 8：

[0535] 表 8 - 在单一静脉内给药后的平均血浆总胆固醇浓度 / 时间

[0536]

剂量	给药后的小时数 [血浆浓度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	178.8	176.5	171.3	175.0	180.0	181.8	182.8	172.8	176.8	181.0	168.0	186.3	189.3
0.75 mg/kg	199.5	193.5	192.3	193.8	210.5	200.3	196.5	190.5	189.8	184.0	189.8	205.0	196.3
2 mg/kg	208.0	201.8	209.8	207.8	211.3	217.3	216.0	209.5	198.0	191.5	189.0	196.0	194.8
5 mg/kg	180.8	175.5	178.5	185.5	191.5	192.5	181.5	187.0	190.8	191.8	181.3	189.8	194.3
10 mg/kg	180.3	176.3	181.8	190.5	195.8	189.3	186.8	182.0	191.5	192.8	198.0	193.5	185.8
15 mg/kg	183.5	187.0	197.0	207.3	214.8	217.8	197.0	185.5	194.8	189.8	200.5	188.8	186.0
30 mg/kg	185.0	190.3	205.8	227.5	234.0	224.3	201.5	187.5	170.8	167.3	177.0	182.5	198.3
45 mg/kg	208.5	208.3	220.5	244.3	269.0	278.5	262.3	273.8	233.3	231.8	228.0	213.3	223.8
[0537]													
安慰剂	192.1	184.5	182.6	188.0	192.7	196.0	189.8	192.1	187.2	186.3	189.9	192.6	195.3

[0537]

[0538] 总胆固醇中的 VLDL、LDL 和 HDL：总胆固醇中的 VLDL、LDL 和 HDL 随时间点和剂量的平均值汇总于如下表 9-11：

[0539] 表 9- 在单一静脉内给药后的总胆固醇中的平均 VLDL

[0540]

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

[0541] 表 10- 在单一静脉内给药后的总胆固醇中的平均 LDL

[0542]

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

[0543] 表 11- 在单一静脉内给药后的总胆固醇中的平均 HDL

[0544]

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

[0545] 未酯化的（游离）胆固醇：在每个时间点的平均血浆游离（未酯化的）胆固醇浓度显示于如下表 12：

[0546] 表 12- 在单一静脉内给药后的平均血浆游离胆固醇浓度 / 时间

[0547]

剂量	给药后的小时数 [血浆浓度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504

[0548]

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

[0549] 游离胆固醇中的 VLDL、LDL 和 HDL :游离胆固醇中的 VLDL、LDL 和 HDL 随时间点和剂量的平均值显示于如下表 13-15 :

[0550] 表 13- 在单一静脉内给药后的游离胆固醇中的平均 VLDL

[0551]

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

[0552] 表 14- 在单一静脉内给药后的游离胆固醇中的平均 LDL

[0553]

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

[0554] 表 15- 在单一静脉内给药后的游离胆固醇中的平均 HDL

[0555]

剂量	给药后的小时数 [血浆浓度(mg/dL)]												
	0	0.5	1	2	4	8	12	24	48	72	168	336	504
0.25 mg/kg	8.16	7.59	7.50	7.47	7.33	7.56	7.70	6.86	6.97	7.14	7.21	7.33	8.36
0.75 mg/kg	7.49	7.73	7.75	7.41	7.67	7.14	7.22	6.80	6.54	6.96	7.92	7.87	7.59
2 mg/kg	9.82	10.74	11.95	10.97	9.99	9.93	10.17	9.16	8.62	8.47	9.68	9.26	9.99
5 mg/kg	10.32	12.07	14.36	13.57	11.59	10.64	10.35	9.91	9.43	9.62	10.38	10.59	10.90
10 mg/kg	8.92	13.10	18.47	18.47	14.54	9.96	10.07	8.52	8.30	7.96	9.01	8.23	8.17
15 mg/kg	9.27	16.53	24.15	26.71	23.35	16.20	13.07	10.11	9.42	8.70	10.61	9.06	9.47
30 mg/kg	8.65	22.95	38.46	49.67	47.70	36.89	25.73	13.31	8.87	7.73	7.64	7.70	8.27
45 mg/kg	8.21	15.39	23.70	40.19	49.79	43.71	32.80	21.20	11.97	10.09	8.58	8.16	8.24
[0556]													
安慰剂	8.49	8.30	8.39	8.76	8.75	8.71	8.53	7.82	7.41	7.38	8.51	8.94	8.94

[0557] 甘油三酯:在每个时间点的平均血浆甘油三酯浓度显示于如下表 16:

[0558] 表 16- 在单一静脉内给药后的平均血浆甘油三酯浓度 / 时间

[0559]

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

[0560] ApoA-I:受试者的基线 ApoA-I (mg/dL) 随时间的变化显示于如下表 17。将每个剂量的血浆 ApoA-I 的最大变化加为粗体。

[0561] 表 17- 在单一静脉内给药后的平均血浆 ApoA-I 变化 / 时间

[0562]

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

[0563] 转氨酶:与毒性相关的肝丙氨酸氨基转移酶或者转氨酶水平的平均值显示于如下

表 18。丙氨酸氨基转移酶的正常范围为 9–60IU/L。

[0564] 表 18– 所选的丙氨酸氨基转移酶随处理和时间点的平均值汇总
[0565]

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

[0566] 不良事件 :总计 7 名 (22%) 受试者具有不良事件。无受试者具有由研究者所认为的至少可能与研究药物相关的不良事件。似乎不存在不良事件发生的任何剂量相关的趋势。无受试者具有严重的不良事件,且无受试者由于不良事件而由所述研究退出。如下表 19 提供了体系统的不良事件的汇总：

[0567]

表 19 - 体系统的不良事件汇总[受试者的数目(%)]									
		复合物剂量							
体系统	安慰剂	0.25	0.75	2.0	5.0	10	15	30	45
不良事件	(N=32)	mg/kg (N=4)	mg/kg (N=4)	mg/kg (N=4)	mg/kg (N=4)	mg/kg (N=4)	mg/kg (N=4)	mg/kg (N=4)	mg/kg (N=4)
胃肠系统									
腹泻	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
腹痛/绞痛	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)
骨骼肌系统									
趾损伤	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
感染和侵袭									
麦粒肿	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
感冒体征	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
神经系统									
血管迷走神经发作	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
呼吸系统									
咳嗽	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
咽喉痛	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

[0568] 14. 3. 结论

[0569] 以 0. 25、0. 75、2. 0、5. 0、10. 0、15. 0、30. 0 和 45. 0mg/kg 的单一 IV 剂量给予包含式 H 的荷负电的脂蛋白复合物的无菌溶液的制剂的该 I 期研究得到以下结论。

[0570] 在所有受试者中所有剂量的所述制剂均为很好耐受的,不良事件分布与使用安慰剂所观察的不良事件分布相似。所述复合物对于临床化学、血液学或者凝固参数的影响与安慰剂相比似乎没有差别。未观察到对 ECG 的不良作用。在单一剂量给予后未检测到对 ApoA-I 的抗体。

[0571] ApoA-I 和鞘磷脂的血浆浓度随着剂量的增加而增加 :对于至多 10mg/kg 的剂量而

言在给药后 24 小时内 ApoA-I 水平返回至基线且对于高于 10mg/kg 的剂量而言在给药后 72 小时内 ApoA-I 水平返回至基线。对于至多 5mg/kg 的剂量而言在给药后 24 小时内鞘磷脂水平返回至基线,对于 10-30mg/kg 的剂量而言在给药后 72 小时内鞘磷脂水平返回至基线且对于给予 45mg/kg 剂量的受试者而言在给药后 7 天内鞘磷脂水平返回至基线。

[0572] 胆固醇动员随着剂量增加而增强:在低至 2.0mg/kg 的剂量观察到游离胆固醇的 HDL 成分的动员(从基线平均增加 23%)且其随剂量的增加而增强。甘油三酯水平瞬时增加至高于采用 15mg/kg 和 15mg/kg 以上的剂量的安慰剂所观察到的水平。

[0573] 此外,给予复合物不显著提升肝转氨酶水平,且在所有情况下,所述水平很好地保持在正常范围内。这与 CSL-111 相反,CSL-111 是与大豆磷脂酰胆碱复合的来自血浆的重组的纯化的人 ApoA-I,其当以 80mg/kg 患者体重的剂量给予时,已经在一些患者中观察到将丙氨酸氨基-转移酶水平至多提升至正常上限的超过 100-倍。Tardif et al., 2007, JAMA297:1675-1682。

[0574] 因此,本公开的复合物的给药剂量可以低于针对模拟 HDL 的其它制剂所报道的剂量,且仍然实现脂质参数的临床上显著的改善而不具有有害副作用。

[0575] 15. 实施例 9:在治疗具有急性冠脉综合征的患者中对 APOA-I/SM/DPPG 复合物的 II 期临床研究

[0576] 在治疗心血管疾病中进行临床试验以进一步证实低剂量的式 H 的荷负电的脂蛋白复合物(ApoA-I、蛋-鞘磷脂(蛋-SM)和 DPPG,载脂蛋白:磷脂重量比为 1:2.7,蛋-SM 与 DPPG 的重量比为 97:3)的治疗益处。所述 ApoA-I 如上在实施例 1 中所述通过在 CHO 细胞中表达来制备,且复合物通过实施例 4 的热循环方法来产生。

[0577] 表现有 ACS 症状的受试者符合该研究的筛选。在基线导管插入时,受试者需要对用于血管内超声(IVUS)的一个“靶标”动脉(其不受先前或者目前的 PCI 所影响)具有适当的 IVUS 评价,且靶标动脉的邻近 4cm 处应具有 0 和 50%之间的直径狭窄(经视觉血管造影评估显示)、 $\geq 2.5\text{mm}$ 的基准直径且不具有暗示血栓的充盈缺损。一旦基线 IVUS 已经通过 IVUS Core Laboratory 针对总体品质、适当靶标血管的存在以及技术因素的缺失(可妨碍 IVUS 成像的精确读取)来评价,所述受试者随机接受静脉内输注,历时一小时给予安慰剂或者复合物的三种剂量中的一种(3、6 或者 12mg/kg)。随机化受试者以每周间隔(即每 7-11 天)返回以进行五次额外的输注。在最后一次输注后一周(5-9 天),撤回治疗结束试验。在最后一次输注后约 3 周(14-35 天)进行随访 IVUS。在最后一次输注后约 6 个月(+/-2 周)进行随访,以采集用于抗-ApoA1 抗体测试的样品且监测主要不良心脏事件(MACE)终末点。

[0578] 主要终末点为通过三维 IVUS 评估的在靶标冠状动脉的 30mm 切片中的总斑块体积的额定变化。其它效力测量包括在靶标 30mm 切片中的斑块体积的变化百分数以及粥样斑体积的变化百分数、靶标 30mm 切片的总血管体积百分数,以及在解剖上同等的 5mm 切片(集中于具有基线最小斑块负荷的位点)的由基线至随访的斑块、管腔和总血管体积的变化,和在三维 IVUS 上的基线最大斑块负荷。斑块体积的变化百分数如下计算:将额定变化除以基线值,再乘以 100。粥样斑(梗阻)体积百分数如下经计算机计算:将斑块体积除以弹性外膜(EEM)体积,然后乘以 100。

[0579] 16. 具体实施方案、参考文献的引用

[0580] 本公开的各个方面描述于如下编号的段落中所阐述的实施方案。

[0581] 1. 脂蛋白复合物, 包含载脂蛋白部分和脂质部分, 其中所述脂质部分基本上由 95-99wt% 的中性磷脂和 1-5wt% 的负电荷磷脂构成, 其中所述载脂蛋白部分与磷脂部分的比在约 1:2.7wt 至约 1:3wt 的范围内。

[0582] 2. 实施方案 1 的脂蛋白复合物, 其中所述载脂蛋白选自前原载脂蛋白、前原 ApoA-I、原 ApoA I、ApoA-I、前原 ApoA-II、原 ApoA II、ApoA II、前原 ApoA-IV、原 ApoA-IV、ApoA-IV、ApoA-V、前原 ApoE、原 ApoE、ApoE、前原 ApoA I_{米兰}、原 ApoA-I_{米兰}、ApoA-I_{米兰}、前原 ApoA-I_{巴黎}、原 ApoA-I_{巴黎} 和 ApoA-I_{巴黎}, 以及它们的混合物。

[0583] 3. 实施方案 2 的脂蛋白复合物, 其中所述载脂蛋白基本上由具有与相应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 的蛋白至少 90% 或者至少 95% 序列同一性的 ApoA I 构成。

[0584] 4. 实施方案 3 的脂蛋白复合物, 其中所述载脂蛋白包含单体、二聚体和 / 或者四聚体。

[0585] 5. 实施方案 1-4 中任一项的脂蛋白复合物, 其中所述载脂蛋白包含 ApoA-I 肽模拟物。

[0586] 6. 实施方案 1-5 中任一项的脂蛋白复合物, 其中所述载脂蛋白部分与磷脂部分的重量比为 1:2.7。

[0587] 7. 实施方案 1-6 中任一项的脂蛋白复合物, 其中所述脂质: 载脂蛋白摩尔比的范围为约 1:105 至约 110, 其中所述载脂蛋白值表示为 ApoA-I 等价物。

[0588] 8. 实施方案 7 的脂蛋白复合物, 其中脂质: 载脂蛋白摩尔比为 1:108。

[0589] 9. 实施方案 1-8 中任一项的脂蛋白复合物, 其中所述中性脂质为天然鞘磷脂或者合成鞘磷脂。

[0590] 10. 实施方案 9 的脂蛋白复合物, 其中所述鞘磷脂为蛋 - 鞘磷脂。

[0591] 11. 实施方案 9 的脂蛋白复合物, 其由至少 95% 纯的鞘磷脂制备。

[0592] 12. 实施方案 1-11 中任一项的脂蛋白复合物, 其中所述脂质部分基本上由 96-98wt% 的中性磷脂和 2-4wt% 的负电荷磷脂构成。

[0593] 13. 实施方案 12 的脂蛋白复合物, 其中所述脂质部分基本上由 97wt% 的中性磷脂和 3wt% 的负电荷磷脂构成。

[0594] 14. 实施方案 13 的脂蛋白复合物, 其中所述负电荷磷脂包含磷脂酰甘油。

[0595] 15. 实施方案 14 的脂蛋白复合物, 其中所述负电荷磷脂包含 1,2-二棕榈酰 -sn-甘油-3-[-磷酸-外消旋-(1-甘油)] (DPPG) 的盐或者由 1,2-二棕榈酰 -sn-甘油-3-[-磷酸-外消旋-(1-甘油)] (DPPG) 的盐组成。

[0596] 16. 实施方案 15 的脂蛋白复合物, 其中所述盐为钠盐或者钾盐。

[0597] 17. 实施方案 1-16 中任一项的脂蛋白复合物, 其中所述中性和 / 或者负电荷磷脂的酰基链各自彼此独立地选自含有 12-26 个、14-26 个或者 16-26 个碳原子的饱和或者单不饱和烃。

[0598] 18. 实施方案 17 的脂蛋白复合物, 其中所述中性和 / 或者负电荷磷脂的每个酰基链是相同的。

[0599] 19. 实施方案 17 的脂蛋白复合物, 其中所述中性和 / 或者负电荷磷脂的每个酰基链是不同的。

[0600] 20. 实施方案 17 的脂蛋白复合物,其中所述中性和负电荷磷脂的酰基链含有相同数目的碳原子。

[0601] 21. 实施方案 17 的脂蛋白复合物,其中所述中性和负电荷磷脂的酰基链具有不同的饱和度。

[0602] 22. 实施方案 17 的脂蛋白复合物,其中所述中性和负电荷磷脂的酰基链含有 16 个碳原子。

[0603] 23. 实施方案 1-22 中任一项的脂蛋白复合物的群体。

[0604] 24. 脂蛋白复合物的群体,其各自包含脂质部分和基本上由载脂蛋白 A-I (“ApoA-I”) 构成的载脂蛋白部分,其中所述群体的特征在于以下特征中的一、二、三、四、五、六、七、八、九或者所有十种:

[0605] (a) 所述群体中至少 80wt%、至少 85wt%、至少 90wt%或者至少 95wt%的 ApoA-I 为成熟形式;

[0606] (b) 所述群体中不超过 20wt%、不超过 15wt%、不超过 10wt%或者不超过 5wt%的 ApoA-I 为不成熟形式;

[0607] (c) 所述群体含有不超过 100 皮克、不超过 50 皮克、不超过 25 皮克、不超过 10 皮克或者不超过 5 皮克宿主细胞 DNA/ 毫克的 ApoA-I;

[0608] (d) 所述群体含有不超过 500 纳克、不超过 200 纳克、不超过 100 纳克、不超过 50 纳克或者不超过 20 纳克宿主细胞蛋白 / 毫克的 ApoA-I;

[0609] (e) 所述群体中不超过 20wt%、不超过 15wt%、不超过 10wt%或者不超过 5wt%的 ApoA-I 为截短形式;

[0610] (f) 所述群体中的所述 ApoA-I 的蛋氨酸 112 和蛋氨酸 148 各自的不超过 20%、不超过 15%、不超过 10%、不超过 5%、不超过 3%、不超过 2%或者不超过 1%被氧化;

[0611] (g) 至少 80%、至少 85%、至少 90%或者至少 90%的所述脂蛋白复合物为粒度为 4nm 至 15nm 或者 6nm 至 15nm 的颗粒形式,如经凝胶渗透色谱法 (“GPC”) 或者动态光散射 (“DLS”) 所测量;

[0612] (h) 所述群体含有不超过 1EU 内毒素 / 毫克 ApoA-I、不超过 0.5EU 内毒素 / 毫克 ApoA-I、不超过 0.3EU 内毒素 / 毫克 ApoA-I 或者不超过 0.1EU 内毒素 / 毫克 ApoA-I;以及

[0613] (i) 所述群体中的所述 ApoA-I 中不超过 10%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%或者不超过 1%的氨基酸被脱去酰胺。

[0614] 25. 实施方案 24 的群体,其中所述复合物中的脂质部分中不超过 15wt%、不超过 10wt%、不超过 5wt%或者不超过 2wt%的脂质为胆固醇。

[0615] 26. 实施方案 25 的群体,其不含有胆固醇。

[0616] 27. 实施方案 24-26 中任一项的群体,其中至少 85%、至少 90%或者至少 95%的蛋白为成熟 ApoA-I 蛋白。

[0617] 28. 实施方案 27 的群体,其中小于 15%、小于 10%或者小于 10%的蛋白被氧化、被脱去酰胺和 / 或者被截短的。

[0618] 29. 实施方案 24-28 中任一项的群体,其中所述脂蛋白复合物为至少 90%纯的、至少 92.5%纯的、至少 95%纯的、至少 96%纯的、至少 97%纯的或者至少 98%纯的。

[0619] 30. 实施方案 24-29 中任一项的群体,其中所述脂蛋白复合物为至少 80%均质的、

至少 85%均质的、至少 90%均质的或者至少 95%均质的,如由凝胶渗透色谱法中的单峰所反映。

[0620] 31. 实施方案 30 的群体,其中至少 80%、至少 85%、至少 90%或者至少 95%的脂蛋白复合物的粒度范围为 4nm 至 12nm、6nm 至 12nm 或者 8nm 至 12nm,如经 GPC 或者 DLS 所测量。

[0621] 32. 实施方案 24-31 中任一项的群体,其中至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或者至少 99%的蛋白为复合物。

[0622] 33. 实施方案 24-32 中任一项的群体,其不含有胆酸盐。

[0623] 34. 实施方案 24-33 中任一项的群体,其不含有任何洗涤剂。

[0624] 35. 实施方案 24-34 中任一项的群体,其含有小于 200ppm、小于 100ppm 或者小于 50ppm 的非水溶剂。

[0625] 36. 实施方案 24-35 中任一项的群体,其中所述 ApoA-I 为人 ApoA-I 蛋白。

[0626] 37. 实施方案 24-36 中任一项的群体,其中所述 ApoA-I 为重组 ApoA-I。

[0627] 38. 实施方案 24-37 中任一项的群体,其中所述 ApoA-I 具有与相应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 的蛋白至少 90%或者至少 95%序列同一性的氨基酸序列。

[0628] 39. 实施方案 24-38 中任一项的群体,其中所述脂质部分基本上由 95-99wt%中性磷脂和 1-5wt%负电荷磷脂构成。

[0629] 40. 实施方案 39 的群体,其中所述脂质部分基本上由 96-98wt%中性磷脂和 2-4wt%负电荷磷脂构成。

[0630] 41. 实施方案 24-40 中任一项的群体,其中所述脂质部分基本上由 97wt%中性磷脂和 3wt%负电荷磷脂构成。

[0631] 42. 实施方案 41 的群体,其中所述中性脂质为天然鞘磷脂或者合成鞘磷脂,任选地其中所述脂质具有小于 5meq O/kg、小于 4meq O/kg、小于 3meq O/kg 或者小于 2meq O/kg 的过氧化值。

[0632] 43. 实施方案 42 的群体,其中所述鞘磷脂为蛋-鞘磷脂。

[0633] 44. 实施方案 42 的群体,其由至少 95%纯的鞘磷脂制备。

[0634] 45. 实施方案 41-44 中任一项的群体,其中所述负电荷磷脂包含磷脂酰甘油。

[0635] 46. 实施方案 45 的群体,其中所述负电荷磷脂包含 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-[-磷酸-外消旋-(1-甘油)](DPPG)的盐或者由 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-[-磷酸-外消旋-(1-甘油)](DPPG)的盐组成。

[0636] 47. 实施方案 46 的群体,其中所述盐为钠盐或者钾盐。

[0637] 48. 实施方案 24-47 中任一项的群体,其中所述中性和/或者负电荷磷脂的酰基链各自彼此独立地选自含有 12-26 个、14-26 个或者 16-26 个碳原子的饱和或者单-不饱和的烃。

[0638] 49. 实施方案 48 的群体,其中所述中性和/或者负电荷磷脂的每个酰基链是相同的。

[0639] 50. 实施方案 48 的群体,其中所述中性和/或者负电荷磷脂的每个酰基链是不同的。

[0640] 51. 实施方案 48 的群体,其中所述中性和负电荷磷脂的酰基链含有相同数目的碳

原子。

[0641] 52. 实施方案 48 的群体,其中所述中性和负电荷磷脂的酰基链具有不同的饱和度。

[0642] 53. 实施方案 48 的群体,其中所述中性和负电荷磷脂的酰基链含有 16 个碳原子。

[0643] 54. 实施方案 24-41 中任一项的群体,其具有的载脂蛋白部分:脂质部分摩尔比的范围为 1:80-120、1:85-1:110 或者 1:100-1:115,其中所述载脂蛋白值表示为 ApoA-I 等价物。

[0644] 55. 实施方案 54 的群体,其具有的载脂蛋白部分:脂质部分摩尔比的范围为 1:80-1:90、1:90-1:100、1:100-1:110 或者 1:105-1:110,其中所述载脂蛋白值表示为 ApoA-I 等价物。

[0645] 56. 实施方案 24-55 中任一项的群体,其具有的载脂蛋白部分与磷脂部分的重量比的范围为 1:2 至约 1:3。

[0646] 57. 实施方案 24-40 中任一项的群体,其中所述载脂蛋白部分与磷脂部分的重量比的范围为 1:2.1-1:2.7。

[0647] 58. 实施方案 57 的群体,其中所述载脂蛋白部分与磷脂部分的重量比为 1:2.7。

[0648] 59. 药物组合物,包含实施方案 1-22 中任一项的脂蛋白复合物或者实施方案 23-58 中任一项的脂蛋白复合物的群体以及一种或者多种药用载体、稀释剂和 / 或者赋形剂或者基本上由实施方案 1-22 中任一项的脂蛋白复合物或者实施方案 23-58 中任一项的脂蛋白复合物的群体以及一种或者多种药用载体、稀释剂和 / 或者赋形剂构成。

[0649] 60. 工程化以表达 ApoA-I 蛋白的哺乳动物宿主细胞,所述 ApoA-I 蛋白包含与 SEQ ID NO:1 的位置 25-267 具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列。

[0650] 61. 实施方案 60 的哺乳动物宿主细胞,其中当在培养宿主细胞时所述蛋白分泌至培养基中。

[0651] 62. 实施方案 60 或者实施方案 61 的哺乳动物宿主细胞,其中所述蛋白进一步包含信号序列 MKAAVLT L AVL FLTGSQA。

[0652] 63. 实施方案 60-62 中任一项的哺乳动物宿主细胞,其中所述蛋白进一步包含前肽序列 RHFWQQ。

[0653] 64. 实施方案 60-63 中任一项的哺乳动物宿主细胞,其为中国仓鼠卵巢 (CHO)、CHO-S、CHO-K1、VERO、BHK、BHK 570、HeLa、COS-1、COS-7、MDCK 细胞、293、3T3、骨髓瘤、PC12 和 W138。

[0654] 65. 实施方案 64 的哺乳动物宿主细胞,其为 CHO 细胞。

[0655] 66. 实施方案 65 的哺乳动物宿主细胞,其为 CHO-S 细胞或者 CHO-K1 细胞。

[0656] 67. 实施方案 60-66 中任一项的哺乳动物宿主细胞,其能够在培养物中产生至少 0.5、1、2、3 或者 4g/L 的所述 ApoA-I 蛋白。

[0657] 68. 实施方案 67 的哺乳动物宿主细胞,其能够在培养物中产生至多 4、5、6、7、8、9、10、12、15 或者 20g/L 的所述 ApoA-I 蛋白。

[0658] 69. 实施方案 67 或者实施方案 68 的哺乳动物宿主细胞,其中所述培养物为大规模培养物。

[0659] 70. 实施方案 69 的哺乳动物宿主细胞,其中所述大规模培养物为至少 15 升、至少

20 升、至少 25 升或者至少 30 升。

[0660] 71. 实施方案 70 的哺乳动物宿主细胞,其中所述大规模培养物为约 50 升、约 100 升、约 200 升或者约 300 升。

[0661] 72. 实施方案 60-71 中任一项的哺乳动物宿主细胞,其包含至少约 5 拷贝的编码所述 ApoA-I 蛋白的核苷酸序列。

[0662] 73. 实施方案 72 的哺乳动物宿主细胞,其中每个核苷酸序列可操作地与启动子连接。

[0663] 74. 实施方案 73 的哺乳动物宿主细胞,其中所述启动子为巨细胞病毒启动子。

[0664] 75. 实施方案 74 的哺乳动物宿主细胞,其中所述启动子为即早猿猴巨细胞病毒启动子。

[0665] 76. 实施方案 60-75 中任一项的哺乳动物宿主细胞,其分泌成熟 ApoA-I 蛋白,所述成熟 ApoA-I 蛋白包含相应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 的氨基序列或者由相应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 的氨基序列构成。

[0666] 77. 哺乳动物细胞培养物,包含多个实施方案 60-76 中任一项的哺乳动物宿主细胞。

[0667] 78. 实施方案 77 的哺乳动物细胞培养物,其包含至少约 0.5g/L 的成熟 ApoA-I 蛋白,其包含相应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 的氨基序列或者由相应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-267 的氨基序列构成。

[0668] 79. 实施方案 78 的哺乳动物细胞培养物,其中至少 80%、至少 85%或者至少 90% 的所述成熟 ApoA-I 蛋白缺失信号序列。

[0669] 80. 实施方案 78 的哺乳动物细胞培养物,其中至少 80%、至少 85%或者至少 90% 的所述成熟 ApoA-I 蛋白缺失信号序列和前肽序列。

[0670] 81. 实施方案 78-80 中任一项的哺乳动物细胞培养物,其中至少 80%、至少 85%或者至少 90%的所述成熟 ApoA-I 蛋白未被截短、氧化或者被脱去酰胺。

[0671] 82. 产生成熟的生物学活性 ApoA-1 蛋白的方法,包括在表达并分泌 ApoA-I 蛋白的条件下培养实施方案 60-76 中任一项的哺乳动物宿主细胞。

[0672] 83. 实施方案 82 的方法,进一步包括由所述培养的哺乳动物宿主细胞的上清液回收所述成熟的生物学活性 ApoA-1 蛋白。

[0673] 84. 实施方案 82 或者实施方案 83 的方法,进一步包括纯化 ApoA-I 蛋白。

[0674] 85. 药物组合物,包含治疗有效量的由实施方案 84 的方法获得的 ApoA-I 蛋白或者可由实施方案 84 的方法获得的 ApoA-I 蛋白。

[0675] 86. 实施方案 85 的药物组合物,其中所述 ApoA-I 蛋白与脂质复合。

[0676] 87. 用于在包含 ApoA-I 的药物组合物中最小化氧化产物的方法,包括在惰性气体下制造所述药物组合物。

[0677] 88. 实施方案 87 的方法,其中所述惰性气体为氮气、氦气或者氩气。

[0678] 89. 实施方案 87 或者实施方案 88 的方法,其中所述药物组合物为包含 ApoA-I 的脂蛋白复合物的药物组合物。

[0679] 90. 制备脂蛋白复合物的方法,包括:

[0680] (a) 从第一温度范围内的温度至第二温度范围内的温度冷却包含脂质成分和蛋白

成分的起始混悬液，

[0681] 其中所述脂质成分基本上由脂质颗粒构成，且其中所述蛋白成分基本上由脂质-结合肽和/或者脂质-结合蛋白构成；

[0682] (b) 从在所述第二温度范围内的温度至所述第一温度范围内的温度加热所述(a)的冷却的混悬液；

[0683] (c) 从在所述第一温度范围内的温度至所述第二温度范围内的温度冷却所述(b)的加热的混悬液；以及

[0684] (d) 重复步骤(b)和(c)至少一次，

[0685] 由此形成脂蛋白复合物。

[0686] 91. 实施方案90的方法，其中步骤(c)包括重复步骤(a)和(b)直到至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或者至少99%的所述脂质成分和/或者所述蛋白成分为复合物形式。

[0687] 92. 实施方案90或者实施方案91的方法，其中步骤(c)包括重复步骤(a)和(b)直到获得至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或者至少99%均质性的脂蛋白复合物。

[0688] 93. 实施方案90-92中任一项的方法，其中步骤(d)包括重复步骤(b)和(c)至少三次、至少四次或者至少五次。

[0689] 94. 实施方案90-93中任一项的方法，其中步骤(c)包括重复步骤(b)和(c)至多六次、至多八次或者至多十次。

[0690] 95. 实施方案90-94中任一项的方法，其中在步骤(a)后，将所述混悬液保持在第二温度范围达至少1、至少2、至少3、至少4或者至少5分钟，之后进行所述加热步骤(b)。

[0691] 96. 实施方案90-95中任一项的方法，其中在步骤(a)后，将所述混悬液保持在第二温度范围达至多6、至多8、至多10、至多20分钟、至多30分钟或者至多1小时，之后进行所述加热步骤(b)。

[0692] 97. 实施方案90-96中任一项的方法，其中在步骤(b)后，将所述混悬液保持在第一温度范围达至少1、至少2、至少3、至少4或者至少5分钟，之后进行所述冷却步骤(c)。

[0693] 98. 实施方案90-97中任一项的方法，其中在步骤(b)后，将所述混悬液保持在第一温度范围达至多6、至多8、至多10、至多20分钟、至多30分钟或者至多1小时，之后进行所述冷却步骤(c)。

[0694] 99. 实施方案90-98中任一项的方法，其中不使所得的脂蛋白复合物进行离心。

[0695] 100. 实施方案90-99中任一项的方法，其中在步骤(a)的所述起始混悬液中，所述脂质成分和蛋白成分分别代表大部分脂质以及蛋白和肽。

[0696] 101. 实施方案90-100中任一项的方法，其中在步骤(a)的所述起始混悬液中，所述脂质成分代表至少60%、至少70%、至少80%或者至少90%的脂质。

[0697] 102. 实施方案90-101中任一项的方法，其中在步骤(a)的所述起始混悬液中，所述蛋白成分代表至少60%、至少70%、至少80%或者至少90%的蛋白和肽。

[0698] 103. 实施方案90-102中任一项的方法，其中在步骤(a)的所述起始混悬液中，在所述混悬液中的至多5%、至多10%、至多15%或者至多20%的脂质预先与所述蛋白成分复合。

[0699] 104. 实施方案 90-103 中任一项的方法,其中所述第一温度范围包括低于所述蛋白成分的转变温度不小于 10℃且高于所述蛋白成分的转变温度不超过 15、不超过 10 或者不超过 5℃的温度。

[0700] 105. 实施方案 90-104 中任一项的方法,其中所述第二温度范围包括低于所述蛋白成分的转变温度不小于 5 或者不小于 10℃且高于所述蛋白成分的转变温度不超过 5℃的温度。

[0701] 106. 实施方案 90-105 中任一项的方法,其中所述第一温度范围的跨度不超过 1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、7℃或者 10℃。

[0702] 107. 实施方案 90-106 中任一项的方法,其中所述第二温度范围的跨度不超过 1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、7℃或者 10℃。

[0703] 108. 实施方案 90-107 中任一项的方法,进一步包括形成所述起始混悬液的步骤。

[0704] 109. 实施方案 108 的方法,其中形成所述混悬液包括使得各自在所述第一范围的温度预先加热的脂质颗粒的混悬液以及所述脂质-结合肽和/或者脂质-结合蛋白的溶液混合的步骤。

[0705] 110. 实施方案 108 的方法,其中形成所述混悬液包括使得各自在所述第一范围的温度预先加热的脂质颗粒群体和预先与脂质复合的所述脂质-结合肽和/或者脂质-结合蛋白混合。

[0706] 111. 实施方案 110 的方法,其中所述起始混悬液中的预先与脂质-结合肽和/或者脂质-结合蛋白复合的脂质占总脂质的不超过 5%、不超过 10%、不超过 15%或者不超过 20%。

[0707] 112. 实施方案 109-111 中任一项的方法,其中所述脂质溶液为均质的脂质溶液。

[0708] 113. 实施方案 112 的方法,进一步包括在所述混合步骤之前使用高压匀浆形成均质的脂质的溶液的步骤。

[0709] 114. 实施方案 113 的方法,其中所述高压匀浆处于高于 1500 巴、高于 1800 巴或者高于 2000 巴的压力。

[0710] 115. 实施方案 114 的方法,其中所述高压匀浆在 1900-2500 巴的压力进行。

[0711] 116. 实施方案 90-115 中任一项的方法,其中所述脂质成分基本上由脂质颗粒构成,所述脂质颗粒:

[0712] (i) 具有至少 45nm、至少 50nm、至少 55nm 或者至少 60nm 的粒度,如经 DLS 所测量;以及

[0713] (ii) 具有至多 65nm、至多 70nm、至多 75nm、至多 80nm、至多 100nm、至多 120nm、至多 150nm、至多 200nm、至多 250nm、至多 300nm、至多 500nm 的粒度,如经 DLS 所测量。

[0714] 117. 实施方案 116 的方法,所述脂质颗粒具有至多 65nm、至多 70nm、至多 75nm 或者至多 80nm 的粒度,如经 DLS 所测量。

[0715] 118. 实施方案 116 的方法,所述脂质颗粒具有至多 100nm、至多 120nm、至多 150nm、至多 200nm、至多 250nm、至多 300nm、至多 500nm 的粒度,如经 DLS 所测量。

[0716] 119. 实施方案 90-116 中任一项的方法,其中重复步骤 (b) 和 (c) 直到获得 4nm 至 15nm、5nm 至 15nm、6nm 至 15nm 或者 8nm 至 15nm 粒度的脂蛋白复合物。

[0717] 120. 实施方案 90-116 中任一项的方法,其中重复步骤 (b) 和 (c) 直到获得 5nm 至

12nm、6nm 至 12nm 或者 8nm 至 12nm 粒度的脂蛋白复合物。

[0718] 121. 实施方案 90-120 中任一项的方法, 其中一个、多于一个或者所有步骤在惰性气体下进行。

[0719] 122. 实施方案 121 的方法, 其中所述惰性气体为氮气。

[0720] 123. 实施方案 90-122 中任一项的方法, 其中所述蛋白成分包含脂质-结合蛋白或者由脂质-结合蛋白组成。

[0721] 124. 实施方案 123 的方法, 其中所述脂质-结合蛋白为 ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoC-I、ApoC-II、ApoC-III、ApoE 或者它们的混合物。

[0722] 125. 实施方案 90-122 中任一项的方法, 其中所述蛋白成分包含脂质-结合肽或者由脂质-结合肽组成。

[0723] 126. 实施方案 125 的方法, 其中所述脂质结合肽为 ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoC-I、ApoC-II、ApoC-III、ApoE 的类似物或者它们的混合物。

[0724] 127. 实施方案 90-126 中任一项的方法, 其中所述脂质成分包含天然脂质、合成的脂质或者它们的混合物或者由天然脂质、合成的脂质或者它们的混合物组成。

[0725] 128. 实施方案 127 的方法, 其中所述脂质成分包含以下物质或者由以下物质组成: 醚磷脂、短链磷脂、胆固醇、胆固醇衍生物、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘脂质、磷脂酰甘油、神经节苷酯和 / 或者脑苷脂。

[0726] 129. 实施方案 128 的方法, 其中所述脂质成分包含以下物质或者由以下物质组成: 蛋磷脂酰胆碱、大豆磷脂酰胆碱、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、二油酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰甘油、二油酰磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酸、二棕榈酰磷脂酸、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰鞘磷脂、二硬脂酰鞘磷脂、二棕榈酰磷脂酰基甘油盐、磷脂酸、半乳糖脑苷脂、二月桂基磷脂酰胆碱、(1,3)-D-甘露糖基(1,3)甘油二酯、氨基苯基糖苷和 / 或者 3-胆固醇基-6'-(糖基硫基)己基醚糖脂。

[0727] 130. 实施方案 90-126 中任一项的方法, 其中所述脂质成分包含中性脂质。

[0728] 131. 实施方案 130 的方法, 其中所述脂质成分主要为中性脂质。

[0729] 132. 实施方案 130 或者实施方案 131 的方法, 其中所述中性脂质包含鞘磷脂。

[0730] 133. 实施方案 132 的方法, 其中所述中性脂质主要为鞘磷脂。

[0731] 134. 实施方案 132 或者实施方案 133 的方法, 其中所述鞘磷脂包含 D-赤藓糖-鞘磷脂和 / 或者 D-赤藓糖二氢鞘磷脂或者由 D-赤藓糖-鞘磷脂和 / 或者 D-赤藓糖二氢鞘磷脂构成。

[0732] 135. 实施方案 130-135 中任一项的方法, 其中所述起始混悬液进一步包含负电荷磷脂。

[0733] 136. 实施方案 135 的方法, 其中所述负电荷磷脂包含磷脂酰甘油或者由磷脂酰甘油油构成。

[0734] 137. 实施方案 136 的方法, 其中所述磷脂酰甘油具有 C16:0 酰基链。

[0735] 138. 实施方案 136 或者实施方案 137 的方法,其中所述磷脂酰甘油包含 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油)的盐或者由 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油)的盐构成。

[0736] 139. 实施方案 138 的方法,其中所述盐为钠盐。

[0737] 140. 实施方案 90-139 中任一项的方法,其中所述起始混悬液的脂质:蛋白摩尔比为约 2:1 至约 200:1。

[0738] 141. 实施方案 140 的方法,其中所述起始混悬液的脂质:蛋白摩尔比为约 10:1 至约 125:1。

[0739] 142. 实施方案 140 的方法,其中所述起始混悬液的脂质:蛋白摩尔比为约 10:1 至约 150:1。

[0740] 143. 实施方案 140 的方法,其中所述起始混悬液的脂质:蛋白摩尔比为约 75:1 至 125:1。

[0741] 144. 实施方案 90-143 中任一项的方法,其中所述起始混悬液含有范围为 2-6(荷负电的脂质):90-120(中性脂质):1(脂质-结合肽、脂质结合蛋白或者它们的混合物)的摩尔比的荷负电的脂质、中性脂质和脂质-结合肽。

[0742] 145. 实施方案 90-144 中任一项的方法,其中所述第一温度范围为 55℃至 60℃。

[0743] 146. 实施方案 90-145 中任一项的方法,其中所述第二温度范围为 35℃至 40℃。

[0744] 147. 实施方案 90-146 中任一项的方法,其进一步包括将所得的脂蛋白复合物低压冻干的步骤。

[0745] 148. 实施方案 147 的方法,进一步包括在低压冻干前加入等渗剂的步骤。

[0746] 149. 药物组合物,包含脂蛋白复合物的群体,其中所述脂蛋白复合物:

[0747] (a) 具有 4nm 至 15nm、6nm 至 15nm、5 至 12nm 或者 8 至 10nm 的粒度,如经 GPC 或者 DLS 所测量;以及

[0748] (b) 为至少 75%均质的、至少 80%均质的、至少 85%均质的、至少 90%均质的、至少 95%均质的、至少 97%均质的、至少 98%均质的或者至少 99%均质的,如由凝胶渗透色谱法中的单峰所反映。

[0749] 150. 制备药物组合物的方法,包括:

[0750] (a) 制备实施方案 90-146 中任一项的脂蛋白复合物的群体;和

[0751] (b) 使得所述脂蛋白复合物的群体与一种或者多种药用赋形剂混合。

[0752] 151. 实施方案 150 的方法,其中所述药物组合物在惰性气体下制备。

[0753] 152. 实施方案 151 的方法,其中所述惰性气体为氮气、氦气或者氩气。

[0754] 153. 实施方案 150-152 中任一项的方法,进一步包括将药物组合物低压冻干的步骤。

[0755] 154. 实施方案 150-152 中任一项的方法,进一步包括将药物组合物等分为单独的单位剂量的步骤。

[0756] 155. 实施方案 154 的方法,进一步包括将单独的单位剂量低压冻干的步骤。

[0757] 156. 制备药物组合物的方法,包括将经实施方案 147 的方法或者实施方案 153 或者实施方案 155 的方法制备的低压冻干的脂蛋白复合物制剂重构。

[0758] 157. 实施方案 156 的方法,进一步包括使得重构的脂蛋白复合物与一种或者多种

药用赋形剂混合。

[0759] 158. 实施方案 156 或者实施方案 157 的方法,进一步包括将药物组合物等分为单独的单位剂量的步骤。

[0760] 159. 经实施方案 150 或者实施方案 156 的方法制备的液体药物组合物。

[0761] 160. 经实施方案 153 的方法制备的低压冻干的药物组合物。

[0762] 161. 经实施方案 158 的方法制备的液体单位剂型。

[0763] 162. 液体单位剂型,包含治疗有效量的实施方案 149 的药物组合物。

[0764] 163. 经实施方案 155 的方法制备的无水单位剂型。

[0765] 164. 治疗血脂异常障碍的方法,包括向有此需要的受试者给予治疗有效量的:

[0766] (a) 实施方案 1-22 中任一项的脂蛋白复合物;

[0767] (b) 实施方案 23-58 中任一项的脂蛋白复合物的群体;

[0768] (c) 实施方案 59、149 和 159 中任一项的药物组合物;

[0769] (d) 经实施方案 90-148 中任一项的方法制备的治疗有效量的脂蛋白复合物;

[0770] (e) 实施方案 161 或者实施方案 162 的单位剂型;

[0771] (f) 在单一给药至多 45mg/kg 至健康志愿者之后不导致肝酶提升的脂蛋白复合物;

[0772] (g) 在向人类受试者进行二、三、四、五或者六次给药后不导致肝酶提升的脂蛋白复合物;

[0773] (h) 在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的剂量单一给药后不导致肝酶提升的脂蛋白复合物;

[0774] (i) 在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的每次给药剂量进行二、三、四、五或者六次给药后不导致肝酶提升的脂蛋白复合物;

[0775] (j) 在单一给药至多 20mg/kg 至健康志愿者之后不导致多于两倍的甘油三酯的增加的脂蛋白复合物;

[0776] (k) 在向人类受试者进行二、三、四、五或者六次给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加的脂蛋白复合物;

[0777] (l) 在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的剂量单一给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加的脂蛋白复合物;或者

[0778] (m) 在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的每次给药剂量进行二、三、四、五或者六次给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加的脂蛋白复合物。

[0779] 165. 实施方案 164 的方法,进一步包括重复所述给药。

[0780] 166. 实施方案 165 的方法,其中所述给药以 6 天至 12 天的间隔重复。

[0781] 167. 实施方案 166 的方法,其中每周给药。

[0782] 168. 实施方案 165-167 中任一项的方法,其中历时一个月、五周、六周、两个月、三个月、六个月、一年、2 年、3 年或者更长的时间进行给药。

[0783] 169. 实施方案 165-167 中任一项的方法,其中进行给药一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次或者十二次。

[0784] 170. 实施方案 164-169 中任一项的方法,其中进行静脉内给药。

[0785] 171. 实施方案 170 的方法,其中经输注给药。

- [0786] 172. 实施方案实施方案 171 的方法, 其中历时一至四小时进行输注。
- [0787] 173. 实施方案 171 的方法, 其中历时至多 24 小时进行输注。
- [0788] 174. 实施方案 170-173 中任一项的方法, 其中脂蛋白复合物的量的范围为每次给药约 0.25mg/kg ApoA-I 等价物至约 30mg/kg ApoA-I 等价物。
- [0789] 175. 实施方案 174 的方法, 其中脂蛋白复合物的量的范围为每次给药约 1mg/kg ApoA-I 等价物至约 15mg/kg ApoA-I 等价物。
- [0790] 176. 实施方案 175 的方法, 其中脂蛋白复合物的量的范围为每次给药约 2mg/kg ApoA-I 等价物至约 12mg/kg ApoA-I 等价物。
- [0791] 177. 实施方案 176 的方法, 其中脂蛋白复合物的量为每次给药约 3mg/kg ApoA-I 等价物。
- [0792] 178. 实施方案 176 的方法, 其中脂蛋白复合物的量为每次给药约 6mg/kg ApoA-I 等价物。
- [0793] 179. 实施方案 176 的方法, 其中脂蛋白复合物的量为每次给药约 12mg/kg ApoA-I 等价物。
- [0794] 180. 治疗血脂异常障碍的方法, 包括:
- [0795] (a) 向受试者给予 1mg/kg 至 12mg/kg 的初始剂量的以下物质:
- [0796] (i) 实施方案 1-22 中任一项的脂蛋白复合物;
- [0797] (ii) 实施方案 23-58 中任一项的脂蛋白复合物的群体;
- [0798] (iii) 实施方案 59、149 和 159 中任一项的药物组合物;
- [0799] (iv) 经实施方案 90-148 中任一项的方法制备的治疗有效量的脂蛋白复合物;
- [0800] (v) 实施方案 161 或者实施方案 162 的单位剂型;
- [0801] (vi) 在单一给药至多 45mg/kg 至健康志愿者之后不导致肝酶提升的脂蛋白复合物;
- [0802] (vii) 在向人类受试者进行二、三、四、五或者六次给药后不导致肝酶提升的脂蛋白复合物;
- [0803] (viii) 在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的剂量单一给药后不导致肝酶提升的脂蛋白复合物;
- [0804] (ix) 在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的每次给药剂量进行二、三、四、五或者六次给药后不导致肝酶提升的脂蛋白复合物;
- [0805] (x) 在单一给药至多 20mg/kg 至健康志愿者之后不导致多于两倍的甘油三酯的增加的脂蛋白复合物;
- [0806] (xi) 在向人类受试者进行二、三、四、五或者六次给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加的脂蛋白复合物;
- [0807] (xii) 在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的剂量单一给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加的脂蛋白复合物; 或者
- [0808] (xiii) 在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的每次给药剂量进行二、三、四、五或者六次给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加的脂蛋白复合物;
- [0809] (b) 在所述给药后 4、8、12、24、48、72、168、336 或者 504 小时确定所述受试者的甘油三酯、VLDL-胆固醇和 / 或者 VLDL-甘油三酯是否提升至多于两倍; 以及

[0810] (c) 如果所述受试者的甘油三酯、VLDL-胆固醇和 / 或者 VLDL-甘油三酯提升至给药前水平的多于两倍,则以较低剂量重复所述给药,且如果所述受试者的甘油三酯、VLDL-胆固醇和 / 或者 VLDL-甘油三酯并未提升至给药前水平的多于两倍,则以相同或者更大的剂量重复所述给药。

[0811] 181. 实施方案 165-180 中任一项的方法,其中所述受试者具有高脂血症或者心血管疾病或者易发高脂血症或者心血管疾病。

[0812] 182. 实施方案 181 的方法,其中所述患者具有高脂血症或者易发高脂血症,且所述高脂血症为高胆固醇血症。

[0813] 183. 实施方案 181 的方法,其中所述患者具有心血管疾病或者易发心血管疾病,且其中所述心血管疾病为动脉粥样硬化、中风、心肌梗塞、急性冠脉综合征、心绞痛、间歇性跛行、严重肢体缺血、房脉瓣硬化或者再狭窄。

[0814] 184. 实施方案 165-183 中任一项的方法,进一步包括另外给予胆汁酸树脂、烟酸、抗炎剂、他汀类药物、贝特类、CETP 抑制剂、血小板凝聚抑制剂、抗凝血剂、PCSK9 激动剂和 / 或者胆固醇吸收抑制剂。

[0815] 185. 实施方案 181 的方法,进一步包括给予选自阿托伐他汀、罗苏伐他汀、普伐他汀或者洛伐他汀的他汀类药物。

[0816] 186. 实施方案 181 的方法,进一步包括给予贝特类非诺贝特。

[0817] 187. 实施方案 181 的方法,进一步包括给予胆固醇吸收抑制剂 Zetia。

[0818] 188. 实施方案 181 的方法,进一步包括给予选自安塞曲匹和达塞曲匹的 CETP 抑制剂。

[0819] 189. 实施方案 181 的方法,进一步包括给予 PCSK9 抗体激动剂或者 PCSK9 配体激动剂。

[0820] 190. 实施方案 181 的方法,进一步包括给予胆固醇吸收抑制剂氯吡格雷硫酸氢盐。

[0821] 191. 实施方案 181 的方法,进一步包括给予抗凝血剂华法林。

[0822] 192. 实施方案 181 的方法,进一步包括给予抗炎剂阿司匹林。

[0823] 193. 组合物,包含一个、两个或者三个均质的脂蛋白复合物群体。

[0824] 194. 实施方案 193 的组合物,其中在至少一个均质的群体中的脂蛋白复合物具有实施方案 1-22 中任一项的复合物特征。

[0825] 195. 实施方案 193 或者实施方案 194 的组合物,其中所述群体中的至少一个、两个或者三个具有实施方案 23-58 中任一项的群体特征。

[0826] 此外,本发明还涉及:

[0827] 1. 脂蛋白复合物的群体,其各自包含脂质部分和载脂蛋白部分,所述载脂蛋白部分基本上由载脂蛋白 A-I (“ApoA-I”) 构成,其中如由凝胶渗透色谱法中的单峰所反映,所述脂蛋白复合物为至少 80% 均质的、至少 85% 均质的、至少 90% 均质的或者至少 95% 均质的。

[0828] 2. 项 1 的组合物,其特征还在于以下特征中的一、二、三或者四种:

[0829] (a) 如经凝胶渗透色谱法 (“GPC”) 或者动态光散射 (“DLS”) 所测量,至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 的所述脂蛋白复合物为具有以下粒度的颗粒的

形式:4nm至15nm、6nm至15nm、4nm至12nm、6nm至12nm或者8nm至12nm;

[0830] (b) 在所述群体中至少75wt%、至少80wt%、至少85wt%、至少90wt%或者至少95wt%的ApoA-I为成熟形式;

[0831] (c) 在所述群体中不超过25wt%、不超过20wt%、不超过15wt%、不超过10wt%或者不超过5wt%的ApoA-I为不成熟形式;和

[0832] (d) 在所述群体中不超过25wt%、不超过20wt%、不超过15wt%、不超过10wt%或者不超过5wt%的ApoA-I为截短形式。

[0833] 3. 项1或者2的组合物,其特征还在于以下特征中的一、二、三、四或者五种:

[0834] (a) 在所述群体中所述ApoA-I中的不超过25%、不超过20%、不超过15%、不超过10%、不超过5%、不超过3%、不超过2%或者不超过1%的蛋氨酸112和蛋氨酸148各自被氧化;

[0835] (b) 在所述群体中所述ApoA-I的不超过15%、不超过10%、不超过5%、不超过4%、不超过3%、不超过2%或者不超过1%的氨基酸被脱去酰胺;

[0836] (c) 所述群体含有不超过1EU内毒素/毫克ApoA-I、不超过0.5EU内毒素/毫克ApoA-I、不超过0.3EU内毒素/毫克ApoA-I或者不超过0.1EU内毒素/毫克ApoA-I;

[0837] (d) 所述群体含有不超过100皮克宿主细胞DNA/毫克ApoA-I、不超过50皮克宿主细胞DNA/毫克ApoA-I、不超过25皮克宿主细胞DNA/毫克ApoA-I、不超过10皮克宿主细胞DNA/毫克ApoA-I或者不超过5皮克宿主细胞DNA/毫克ApoA-I;和

[0838] (e) 所述群体含有不超过500纳克宿主细胞蛋白/毫克ApoA-I、不超过200纳克宿主细胞蛋白/毫克ApoA-I、不超过100纳克宿主细胞蛋白/毫克ApoA-I、不超过50纳克宿主细胞蛋白/毫克ApoA-I或者不超过20纳克宿主细胞蛋白/毫克ApoA-I。

[0839] 4. 项1-3中任一项的群体,其中在所述复合物的脂质部分中不超过15wt%、不超过10wt%、不超过5wt%或者不超过2wt%的脂质为胆固醇。

[0840] 5. 项1-4中任一项的群体,其中所述ApoA-I为人ApoA-I蛋白。

[0841] 6. 项1-5中任一项的群体,其中所述ApoA-I为重组ApoA-I。

[0842] 7. 项1-6中任一项的群体,其中所述脂质部分基本上由95至99wt%的中性磷脂和1至5wt%的负电荷磷脂构成。

[0843] 8. 项7的群体,其中所述脂质部分基本上由96至98wt%的中性磷脂和2至4wt%的负电荷磷脂构成。

[0844] 9. 项1-8中任一项的群体,其中所述脂质部分基本上由97wt%的中性磷脂和3wt%的负电荷磷脂构成。

[0845] 10. 项9的群体,其中所述中性脂质为天然鞘磷脂或者合成鞘磷脂,任选地其中所述脂质具有小于5meq O/kg、小于4meq O/kg、小于3meq O/kg或者小于2meq O/kg的过氧化值。

[0846] 11. 项10的群体,其中所述鞘磷脂为蛋-鞘磷脂。

[0847] 12. 项9-11中任一项的群体,其中所述负电荷磷脂包括磷脂酰甘油。

[0848] 13. 项12的群体,其中所述负电荷磷脂包括1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-[-磷酸-外消旋-(1-甘油)](DPPG)的盐或者由1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-[-磷酸-外消旋-(1-甘油)](DPPG)的盐构成。

[0849] 14. 项 1-13 中任一项的群体,其具有范围为 1:2 至约 1:3 的载脂蛋白部分与磷脂部分的重量比。

[0850] 15. 组合物,其包含项 1-14 中任一项的二个、三个或者四个群体。

[0851] 16. 项 15 的组合物,其中所述组合物中的不超过 15%、不超过 12%、不超过 10%、不超过 9%、不超过 8%、不超过 7%、不超过 6%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%、不超过 1%的脂蛋白为非复合形式。

[0852] 17. 项 15 或者 16 的组合物,其中所述组合物中的不超过 15%、不超过 12%、不超过 10%、不超过 9%、不超过 8%、不超过 7%、不超过 6%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%、不超过 1%的脂质为非复合形式。

[0853] 18. 项 15-17 中任一项的组合物,其包含第一群体,所述第一群体包含在每个脂蛋白复合物中具有 2 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物的脂蛋白复合物。

[0854] 19. 项 18 的组合物,其包含第二群体以及任选的第三群体,各自地,所述第二群体包含在每个脂蛋白复合物中具有 3 或 4 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物的脂蛋白复合物,所述第三群体包含在每个脂蛋白复合物中具有 4 或 3 个 ApoA-I 分子或者 ApoA-I 等价物的脂蛋白复合物。

[0855] 20. 项 15-19 中任一项的组合物,其进一步包含一种或者多种药用载体、稀释剂和 / 或者赋形剂。

[0856] 21. 药物组合物,其包含项 1-14 中任一项的脂蛋白复合物的群体以及一种或者多种药用载体、稀释剂和 / 或者赋形剂,或者基本上由项 1-14 中任一项的脂蛋白复合物的群体以及一种或者多种药用载体、稀释剂和 / 或者赋形剂构成。

[0857] 22. 单位剂型,其包含治疗有效量的项 21 的药物组合物。

[0858] 23. 工程化以表达 ApoA-I 蛋白的哺乳动物宿主细胞,所述 ApoA-I 蛋白包含具有与 SEQ ID NO:1 的位置 25 至 267 至少 95% 同一性的氨基酸序列。

[0859] 24. 哺乳动物细胞培养物,其包含多个项 23 的哺乳动物宿主细胞。

[0860] 25. 产生成熟的生物学活性 ApoA-I 蛋白的方法,其包括在表达并分泌 ApoA-I 蛋白的条件下培养项 23 的哺乳动物宿主细胞。

[0861] 26. 制备脂蛋白复合物的方法,包括:

[0862] (a) 将包含脂质成分和蛋白成分的起始混悬液从第一温度范围内的温度冷却至第二温度范围内的温度,

[0863] 其中所述脂质成分基本上由脂质颗粒构成且其中所述蛋白成分基本上由脂质-结合肽和 / 或者脂质-结合蛋白构成;

[0864] (b) 将所述 (a) 的经冷却的混悬液从在所述第二温度范围内的温度加热至所述第一温度范围内的温度;

[0865] (c) 将所述 (b) 的经加热的混悬液从在所述第一温度范围内的温度冷却至所述第二温度范围内的温度;和

[0866] (d) 重复步骤 (b) 和 (c) 至少一次,

[0867] 由此形成脂蛋白复合物。

[0868] 27. 制备药物组合物的方法,包括:

[0869] (a) 根据项 26 的方法制备脂蛋白复合物的群体;和

- [0870] (b) 使所述脂蛋白复合物的群体与一种或者多种药用赋形剂混合。
- [0871] 28. 治疗血脂异常障碍的方法,其包括向有此需要的受试者给予治疗有效量的:
- [0872] (a) 项 1-14 中任一项的脂蛋白复合物的群体;
- [0873] (b) 项 15-20 中任一项的组合物;
- [0874] (c) 项 21 的药物组合物;
- [0875] (d) 治疗有效量的经项 26 的方法制备的脂蛋白复合物;
- [0876] (e) 项 22 的单位剂型;
- [0877] (f) 脂蛋白复合物,其在向健康志愿者单一给予至多 45mg/kg 后不导致肝酶提升;
- [0878] (g) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者进行二、三、四、五或者六次给药后不导致肝酶提升;
- [0879] (h) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的剂量单一给药后不导致肝酶提升;
- [0880] (i) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的每次给药剂量进行二、三、四、五或者六次给药后不导致肝酶提升;
- [0881] (j) 脂蛋白复合物,其在向健康志愿者单一给予至多 20mg/kg 后不导致多于两倍的甘油三酯的增加;
- [0882] (k) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者进行二、三、四、五或者六次给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加;
- [0883] (l) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的剂量单一给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加;或者
- [0884] (m) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的每次给药剂量进行二、三、四、五或者六次给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加。
- [0885] 29. 治疗血脂异常障碍的方法,其包括:
- [0886] (a) 向受试者给予 1mg/kg 至 12mg/kg 初始剂量的:
- [0887] (i) 项 1-14 中任一项的脂蛋白复合物的群体;
- [0888] (ii) 项 15-20 中任一项的组合物;
- [0889] (iii) 项 21 的药物组合物;
- [0890] (iv) 治疗有效量的经项 26 的方法制备的脂蛋白复合物;
- [0891] (v) 项 22 的单位剂型;
- [0892] (vi) 脂蛋白复合物,其在向健康志愿者单一给予至多 45mg/kg 后不导致肝酶提升;
- [0893] (vii) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者进行二、三、四、五或者六次给药后不导致肝酶提升;
- [0894] (viii) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的剂量单一给药后不导致肝酶提升;
- [0895] (ix) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的每次给药剂量进行二、三、四、五或者六次给药后不导致肝酶提升;
- [0896] (x) 脂蛋白复合物,其在向健康志愿者单一给予至多 20mg/kg 后不导致多于两倍的甘油三酯的增加;

[0897] (xi) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者进行二、三、四、五或者六次给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加;

[0898] (xii) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的剂量单一给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加;或者

[0899] (xiii) 脂蛋白复合物,其在向人类受试者以 1mg/kg 至 20mg/kg 的每次给药剂量进行二、三、四、五或者六次给药后不导致多于两倍的甘油三酯的增加;

[0900] (b) 确定在所述给药后 4、8、12、24、48、72、168、336 或者 504 小时,受试者的甘油三酯、VLDL-胆固醇和 / 或者 VLDL-甘油三酯是否提升至多于两倍;和

[0901] (c) 如果所述受试者的甘油三酯、VLDL-胆固醇和 / 或者 VLDL-甘油三酯提升至给药前水平的多于两倍,则重复所述给药但以较低剂量给予,且如果所述受试者的甘油三酯、VLDL-胆固醇和 / 或者 VLDL-甘油三酯并未提升至给药前水平的多于两倍,则以相同或者更大的剂量重复所述给药。

[0902] 所有引用的参考文献均通过引用的方式将其内容并入本申请中以用于所有目的,就如同每个单独的公开、专利或专利申请都被具体地、单独地通过引用的方式将其内容并入本申请以用于所有目的。

[0903] 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。

[0001]

序列表

<110> 塞勒尼斯医疗控股公司 (CERENIS THERAPEUTICS HOLDING S.A.)

<120> 脂蛋白复合物及其制备和用途

<130> 376201-01SW0 (114437)

<140>

<141>

<150> 61/487,263

<151> 2011-05-17

<150> 61/452,630

<151> 2011-03-14

<150> 61/440,371

<151> 2011-02-07

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 267

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0002]

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 信号
<222> (1).. (18)

<400> 2
Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
1 5 10 15

Gln Ala

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> PROPEP
<222> (1).. (6)

<400> 3
Arg His Phe Trp Gln Gln
1 5

<210> 4
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述: 合成多肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (22).. (22)

[0003]

<223> 腺嘌呤-4-甲酸

<400> 4

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

Phe Leu Asp Leu Val Xaa
20

1	2	3	4
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
MKAAVLTAV	LFLTGSQA <u>RH</u>	<u>FWQQDEPPQS</u>	PWDRVKDLAT
5	6	7	8
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
VYVDVLKDSG	RDYVSQFEGS	ALGKQLNLKL	LDNWDSVTST
	1	1	1
9	0	1	2
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
FSKLREQ LGP	VTQEFWDNLE	KETEGLRQEM	SKDLEEVKAK
1	1	1	1
3	4	5	6
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
VQPYLDDFQK	KWQEEMELYR	QKVEPLRAEL	QEGARQKLHE
1	1	1	2
7	8	9	0
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
LQEKLSPLGE	EMRDRARAHV	DALRTHLAPY	SDELQRRLAA
2	2	2	2
1	2	3	4
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
RLEALKENGG	ARLAEYHAKA	TEHLSTLSEK	AKPALEDLRQ
2	2		
5	6		
1234567890	1234567890	1234567	
GLLPVLESFK	VSFLSALEEY	TKKLNTQ	

图 1

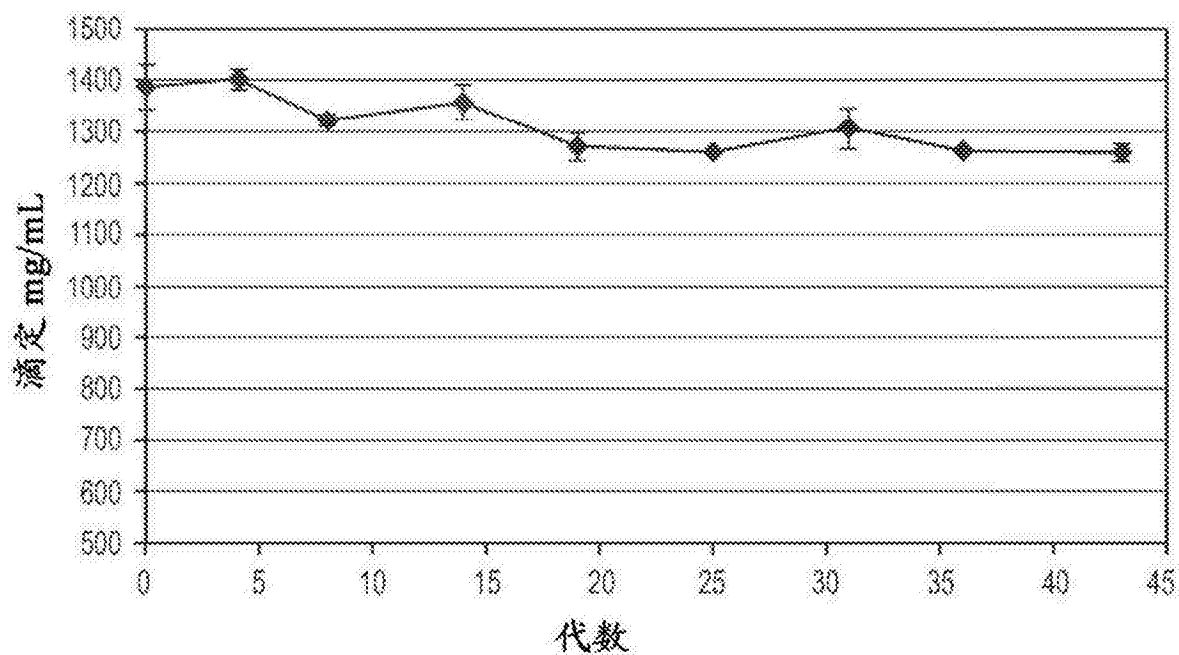


图 2

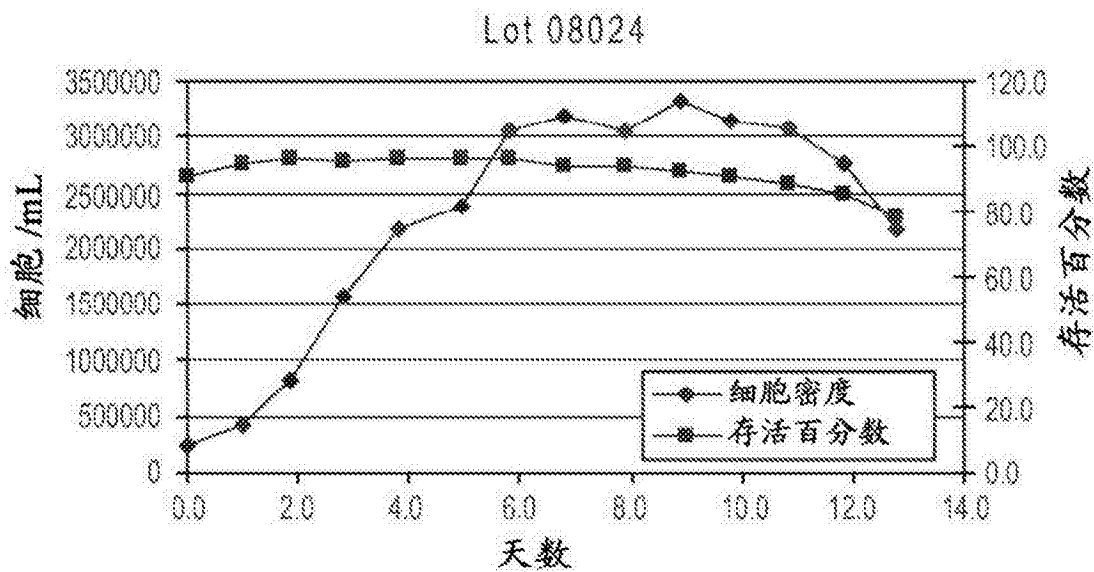


图 3A

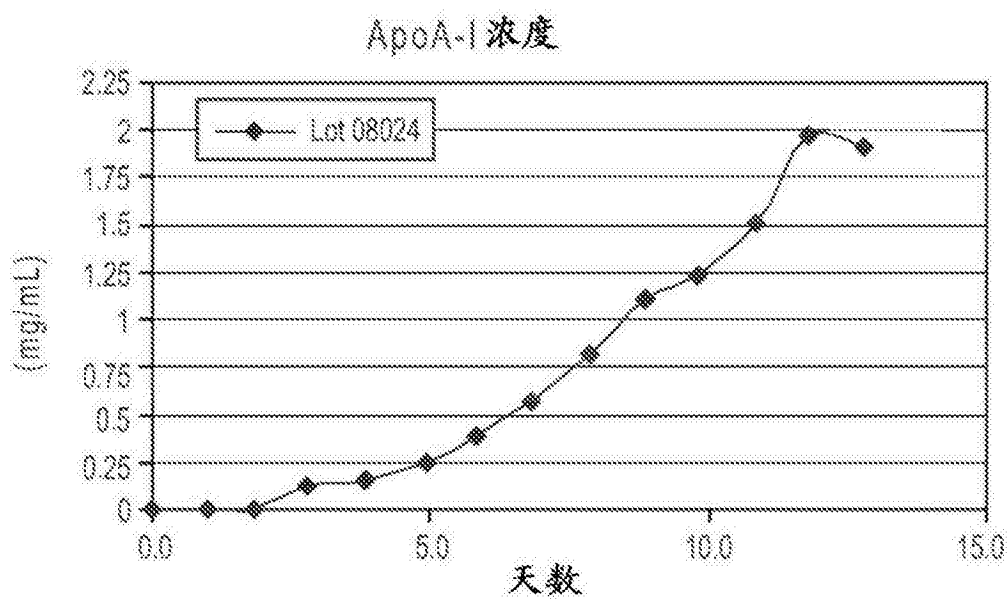


图 3B

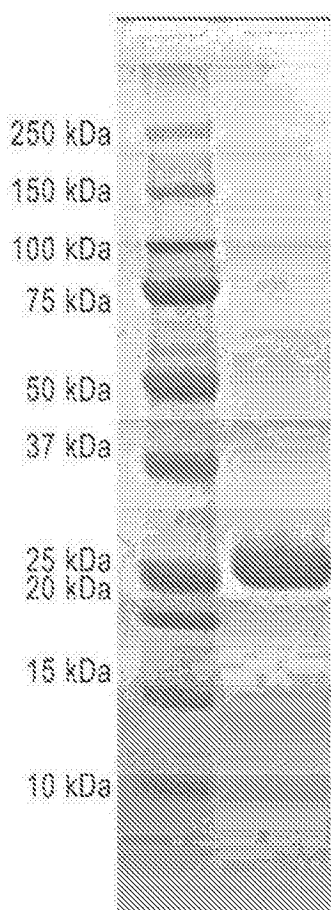


图 4

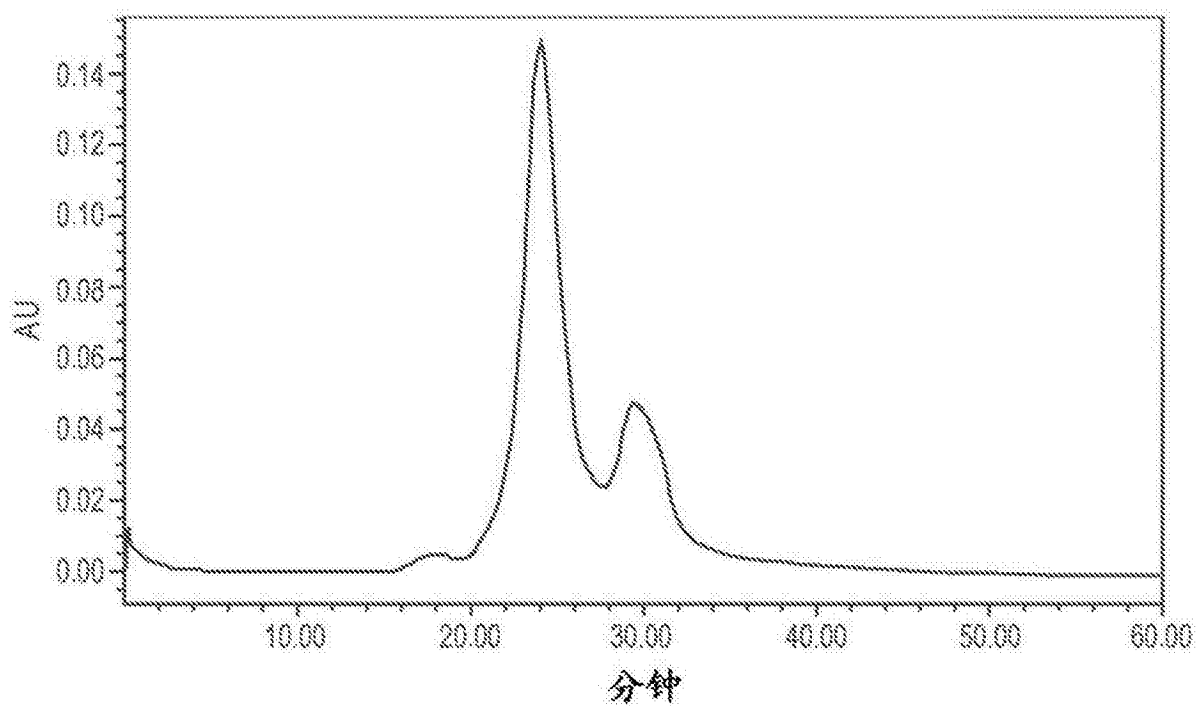


图 5A

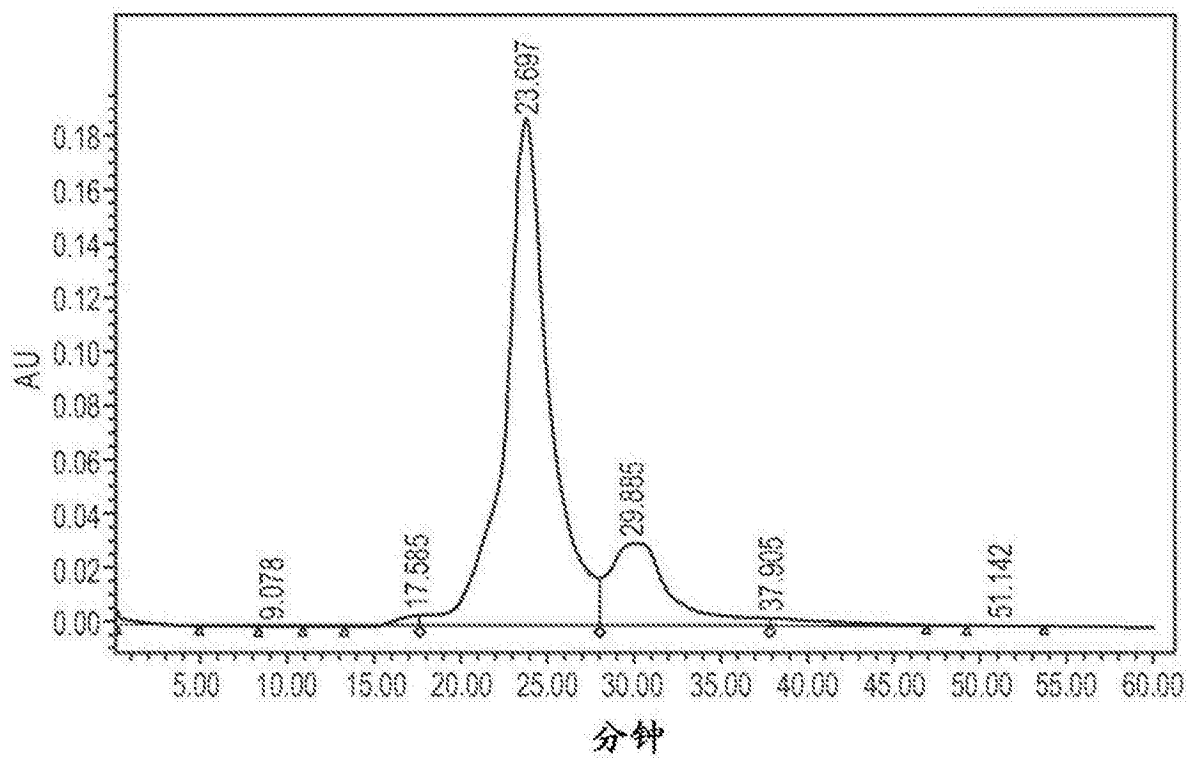


图 5B

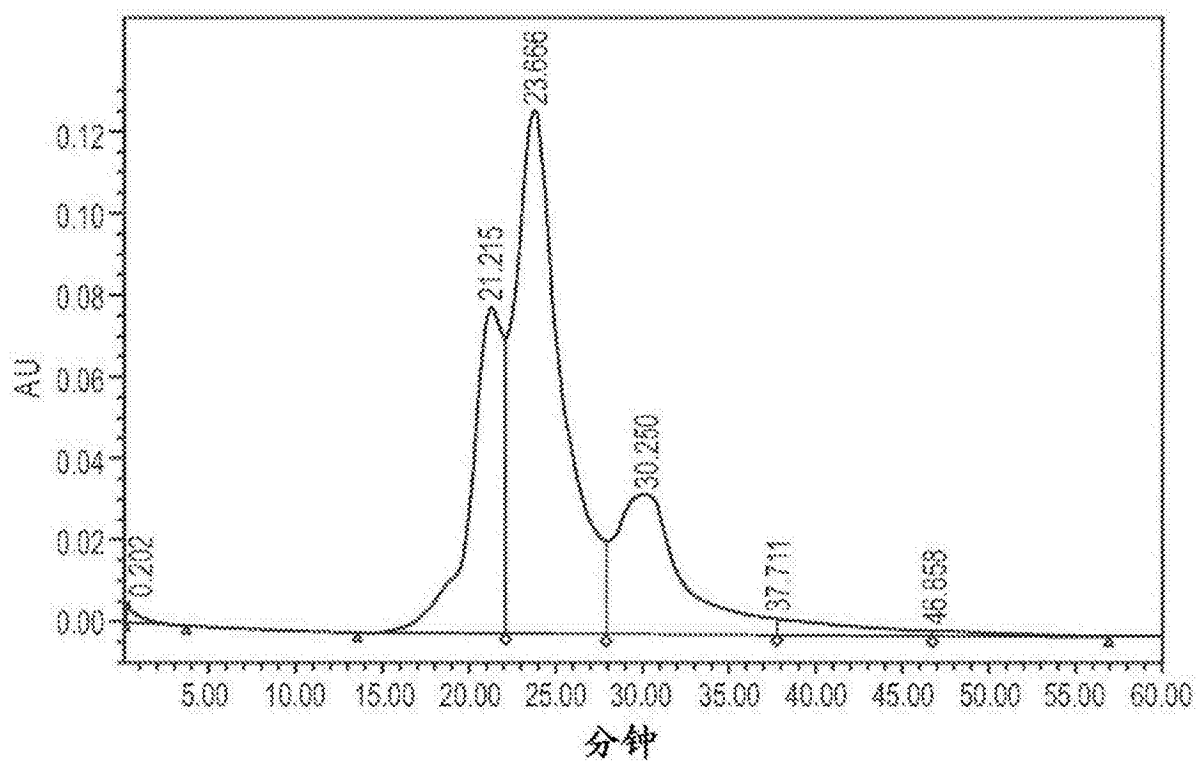


图 5C

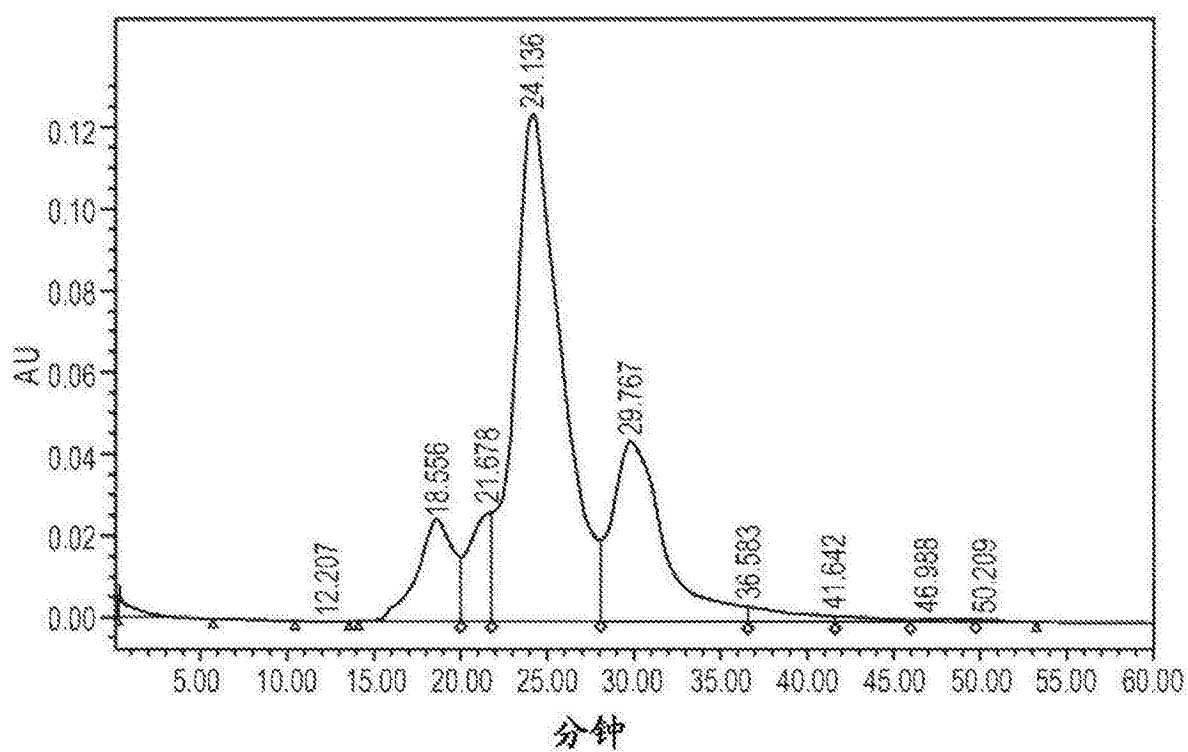


图 5D

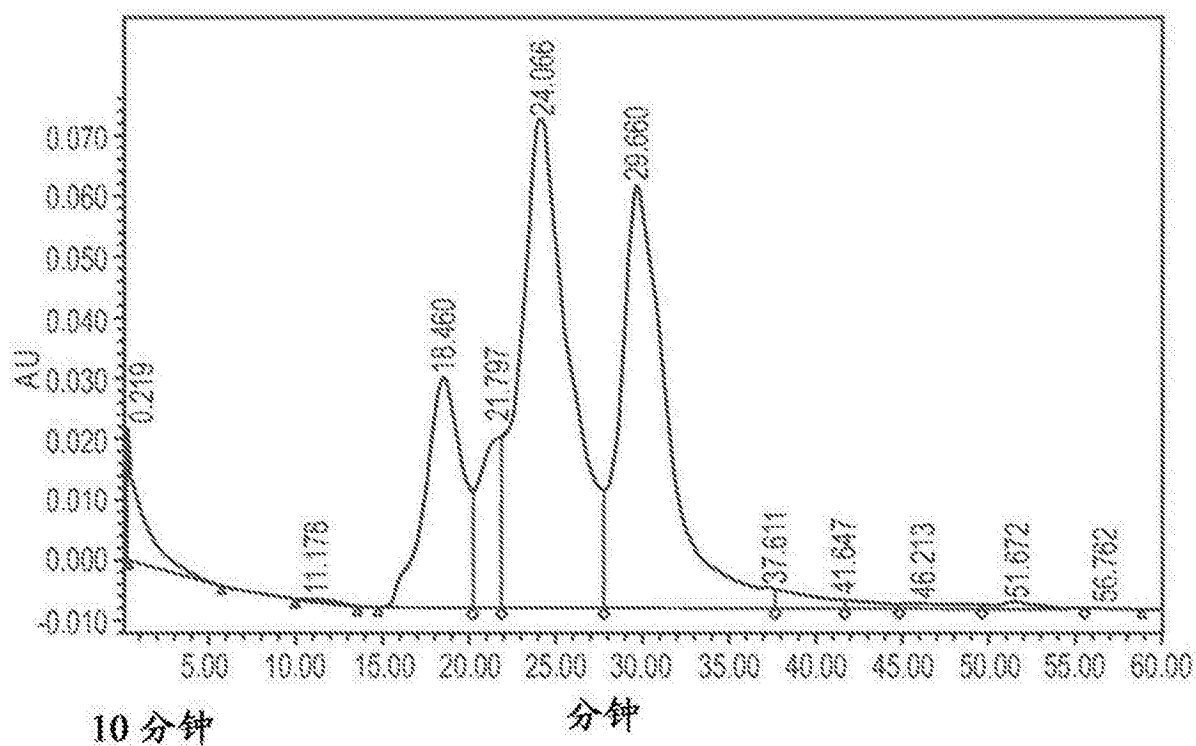


图 6A

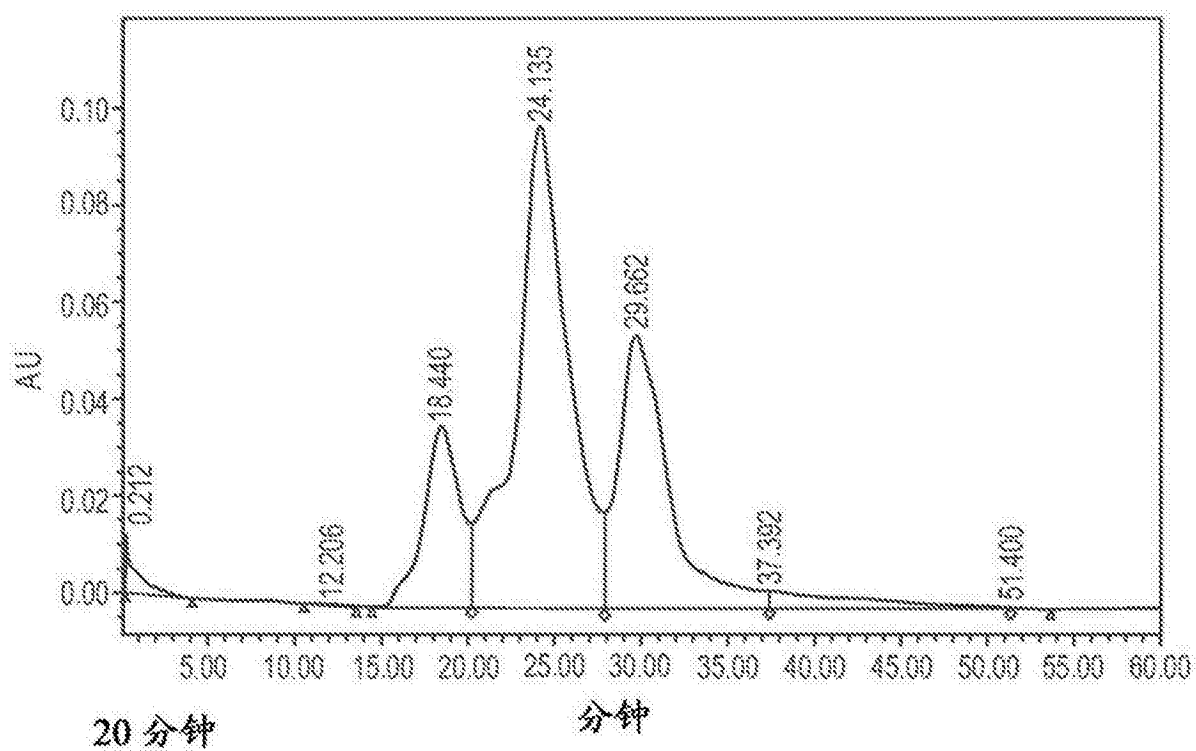


图 6B

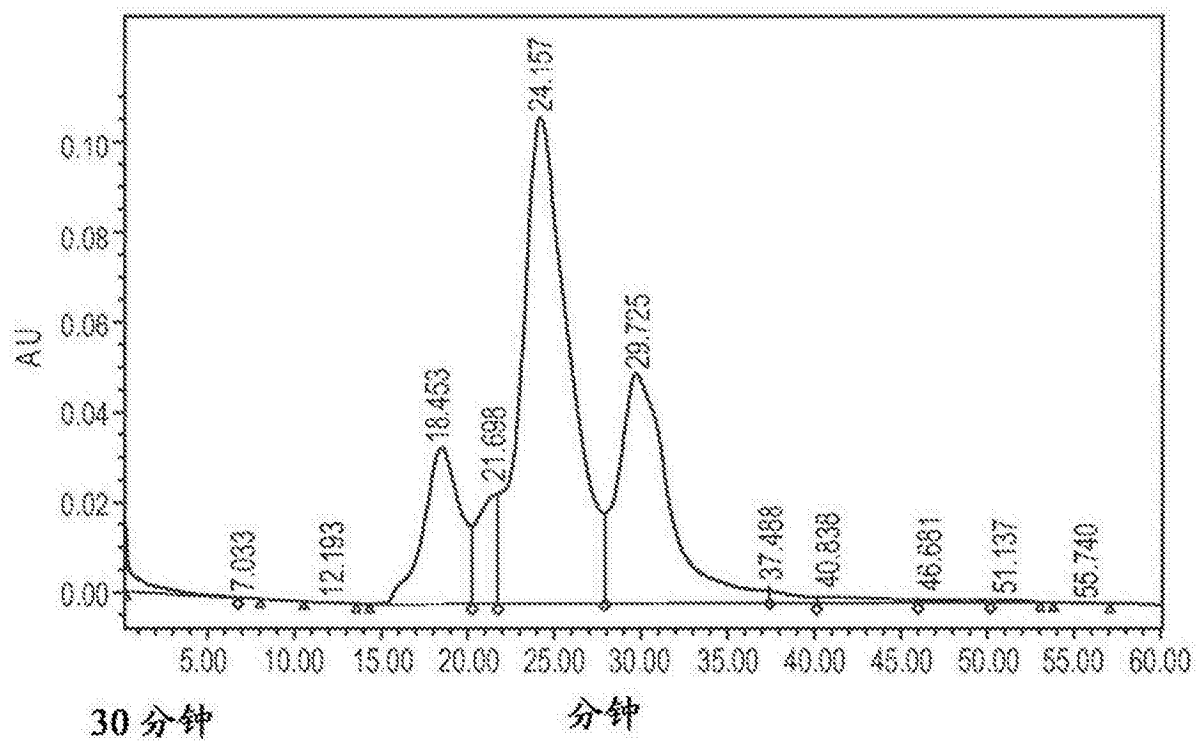


图 6C

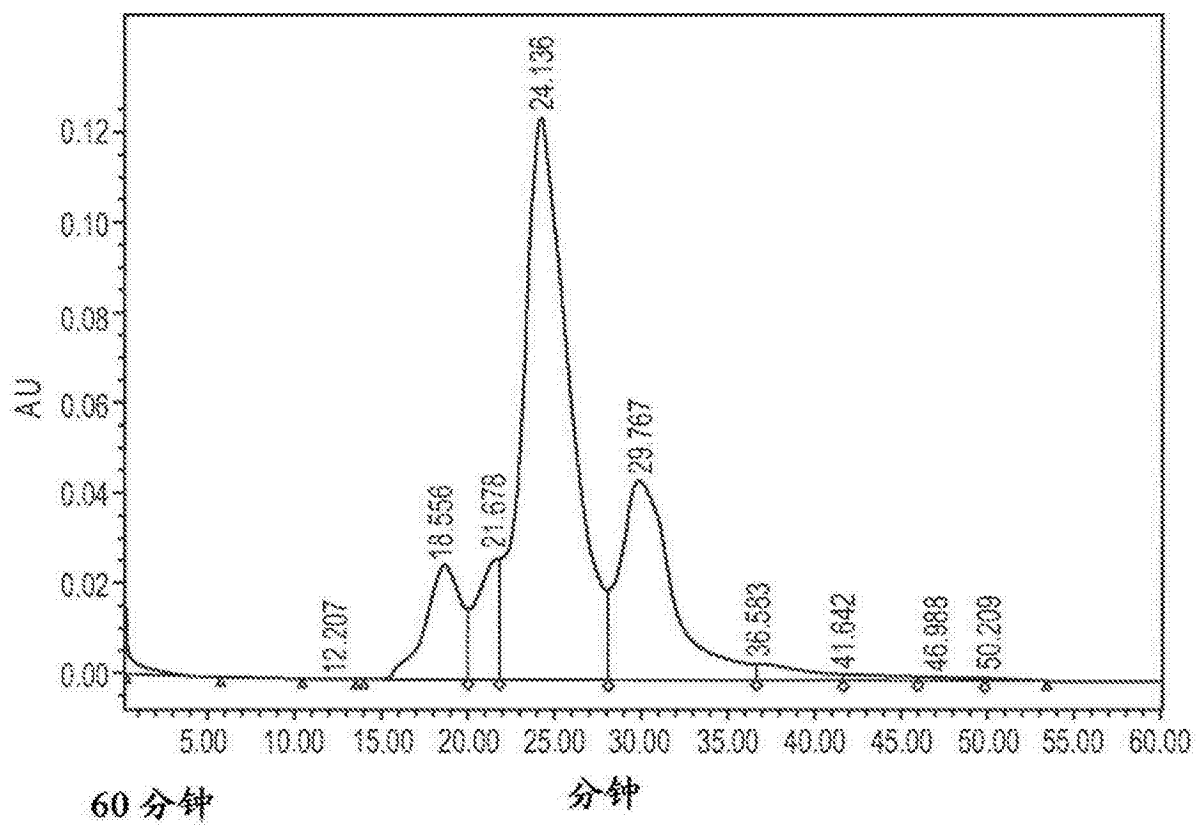


图 6D

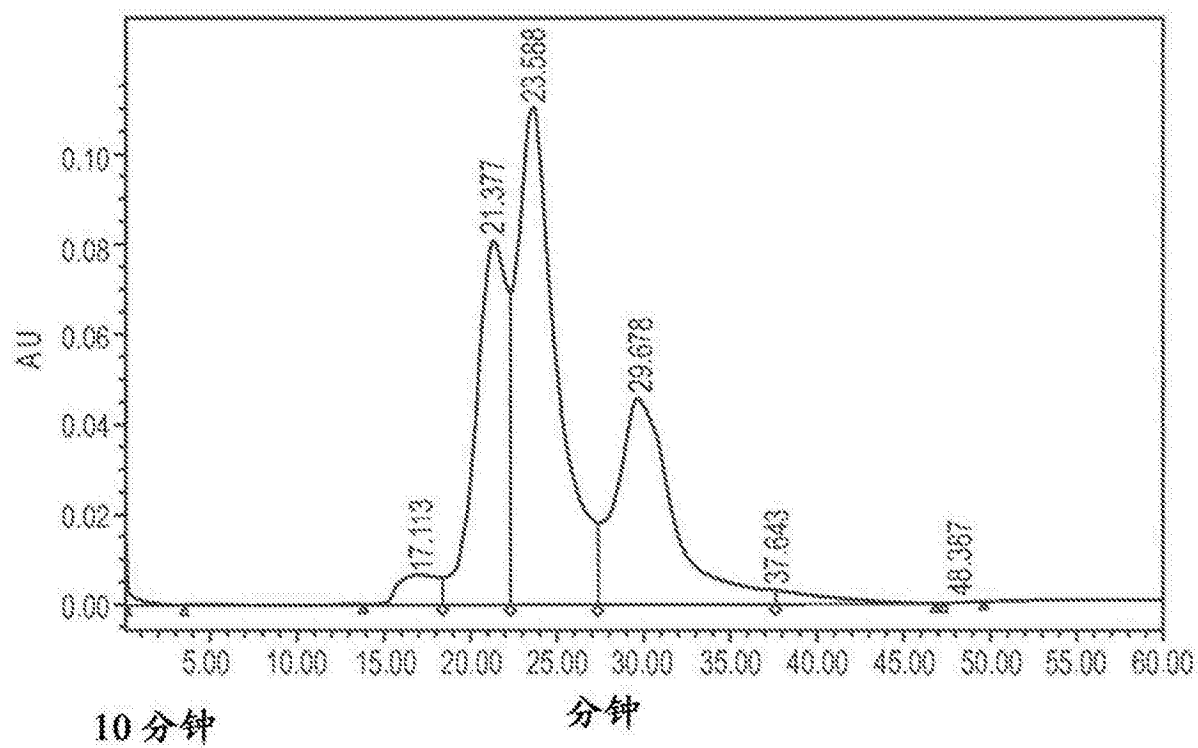


图 7A

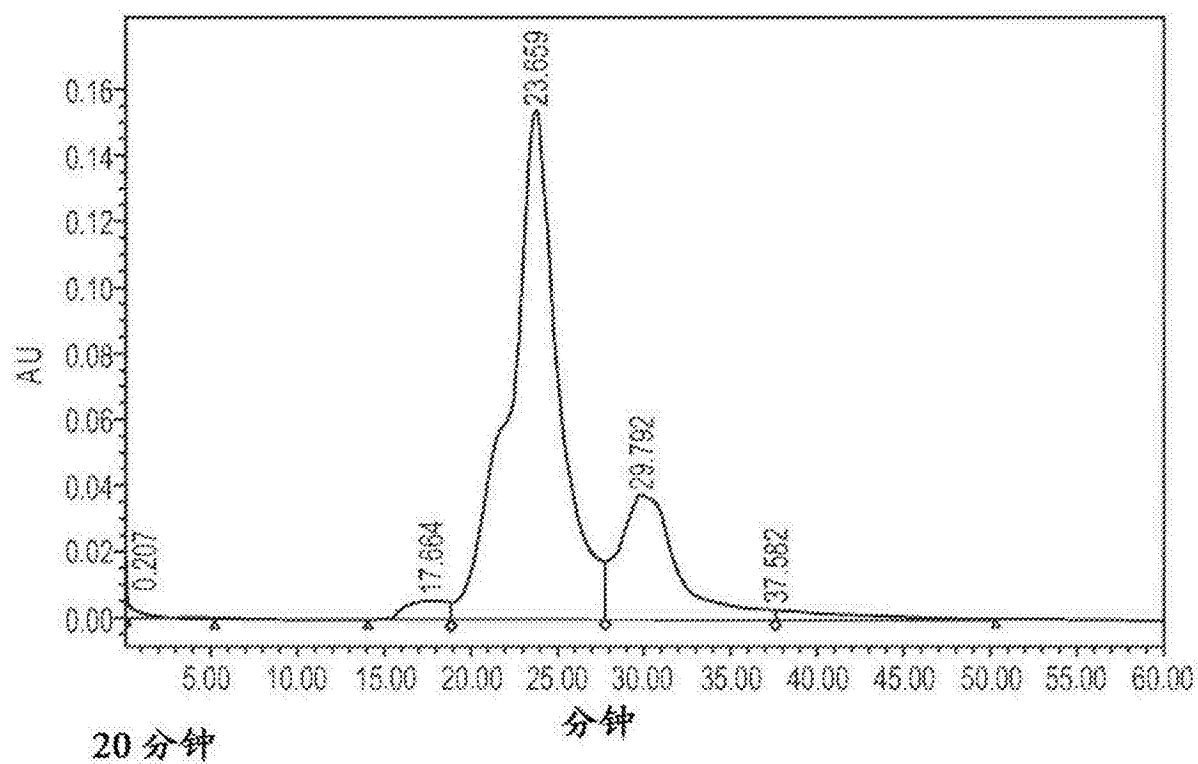


图 7B

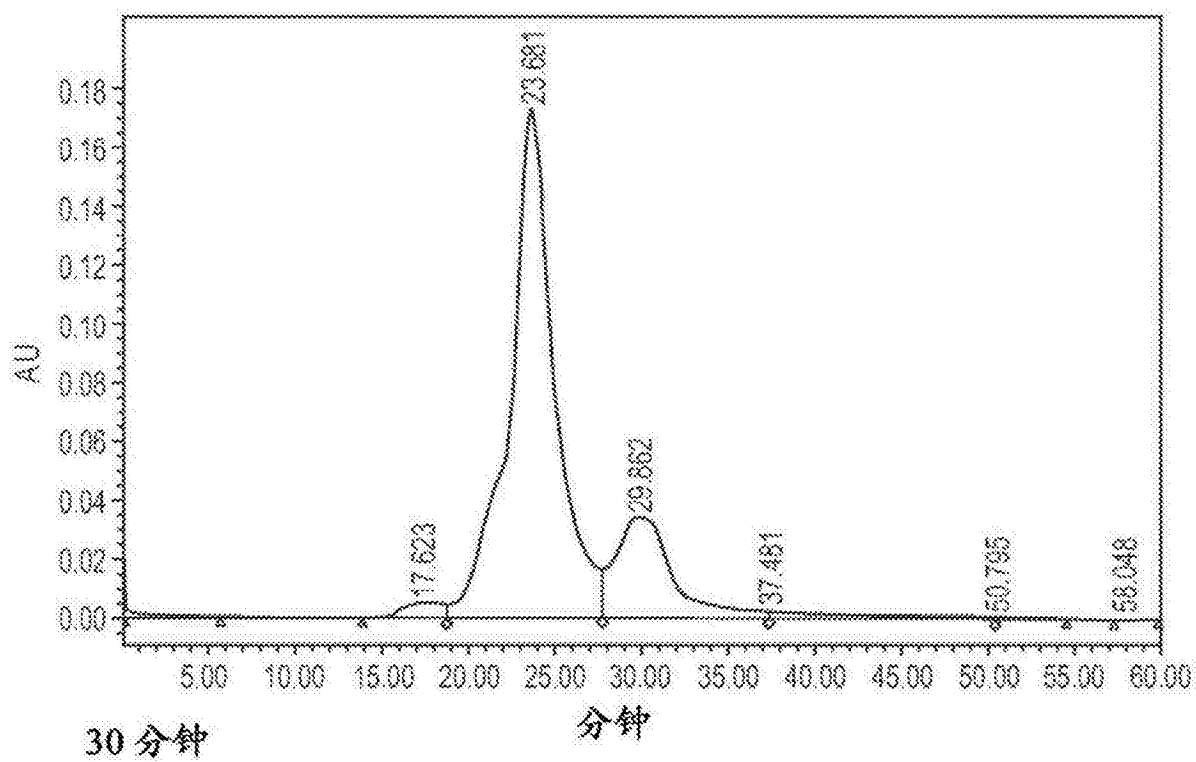


图 7C

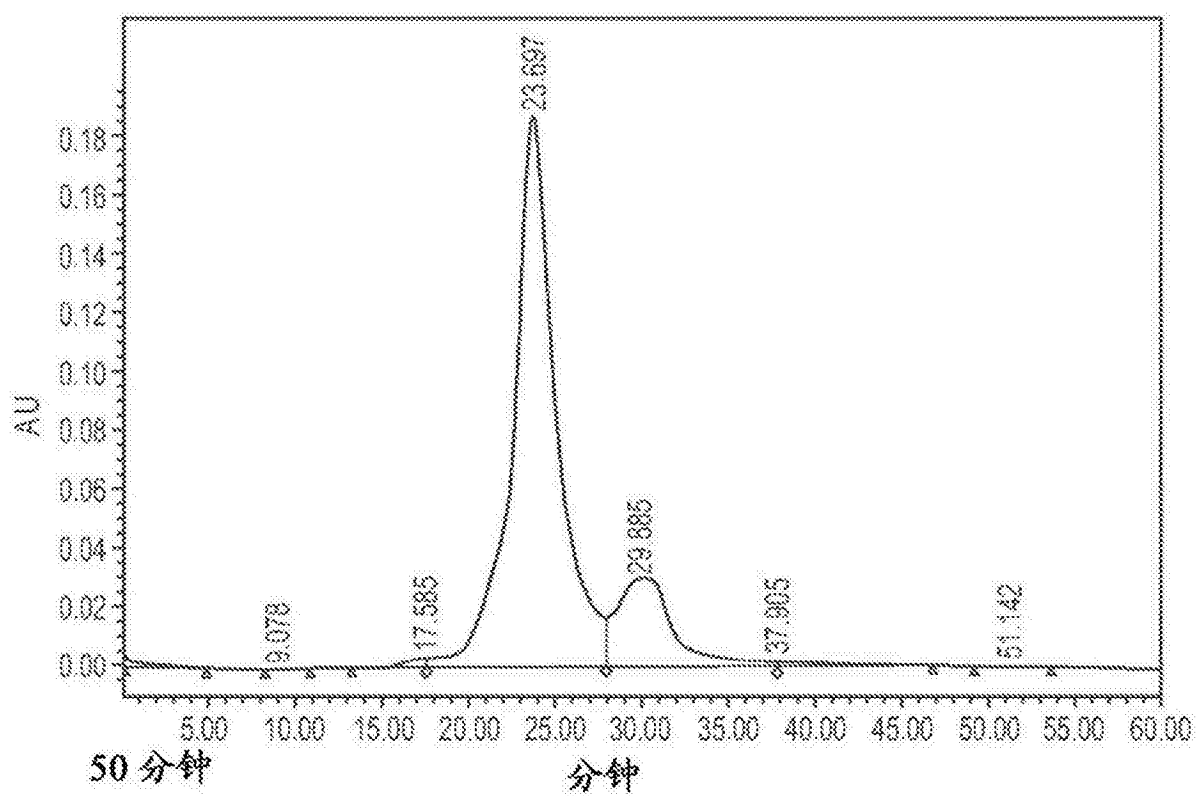


图 7D

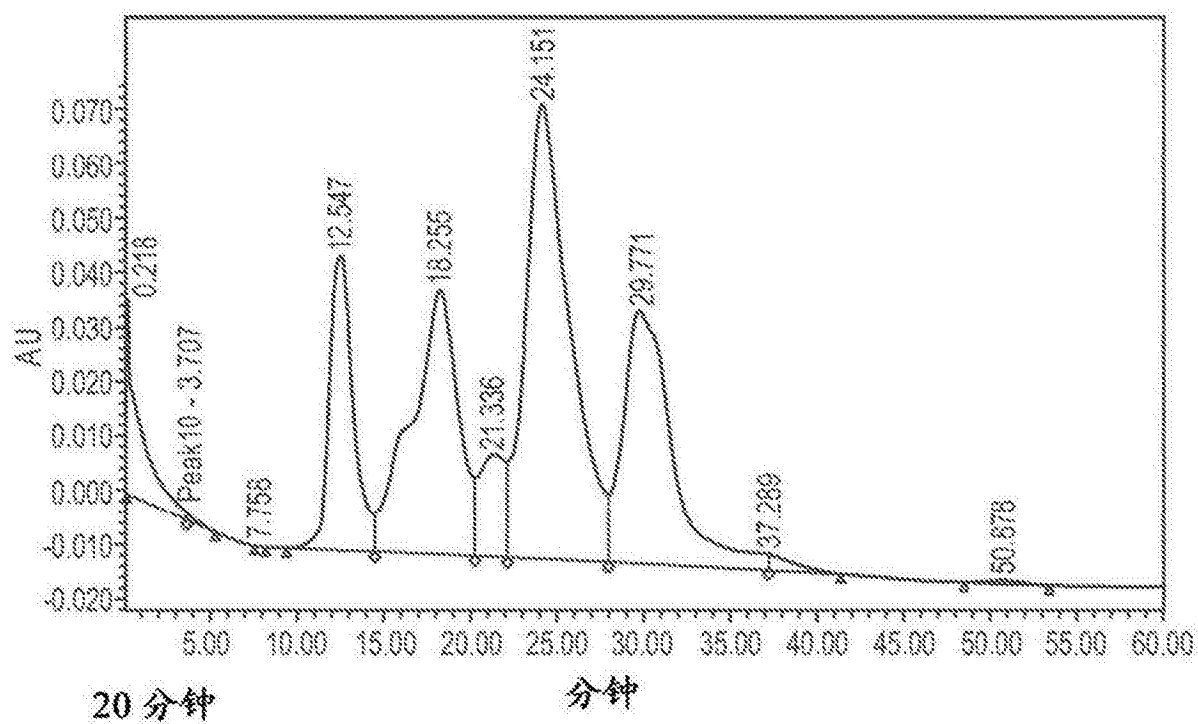


图 8A

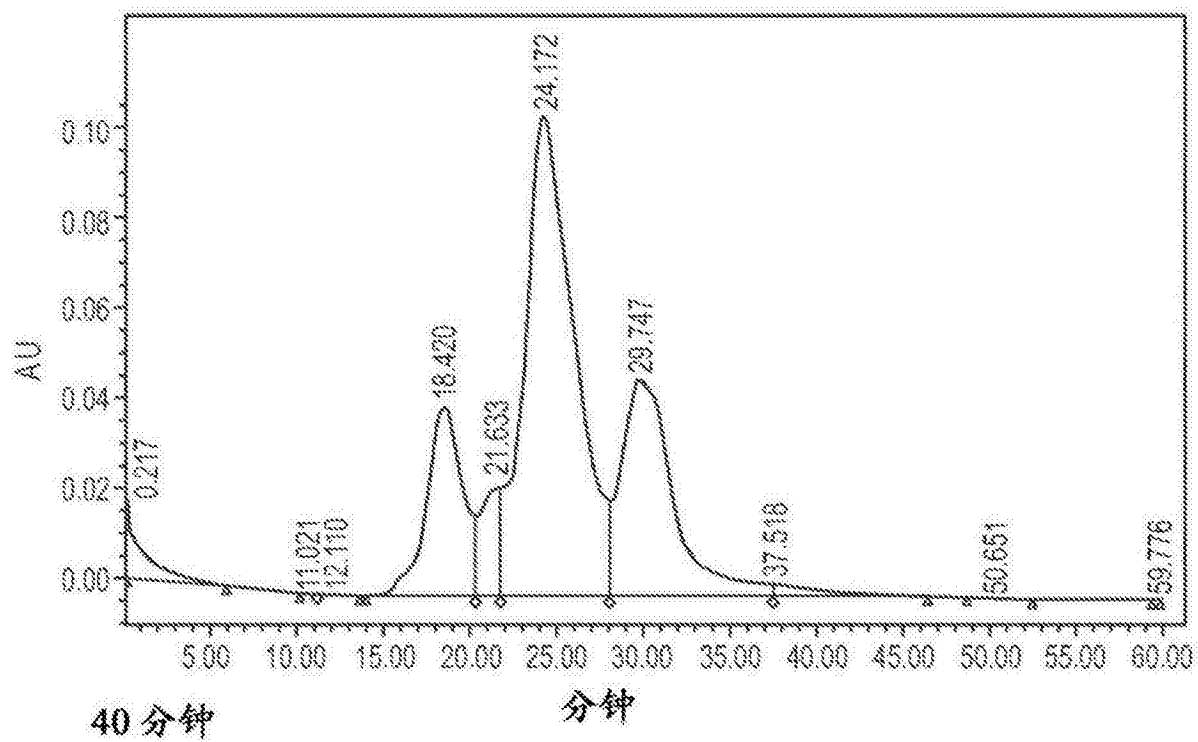


图 8B

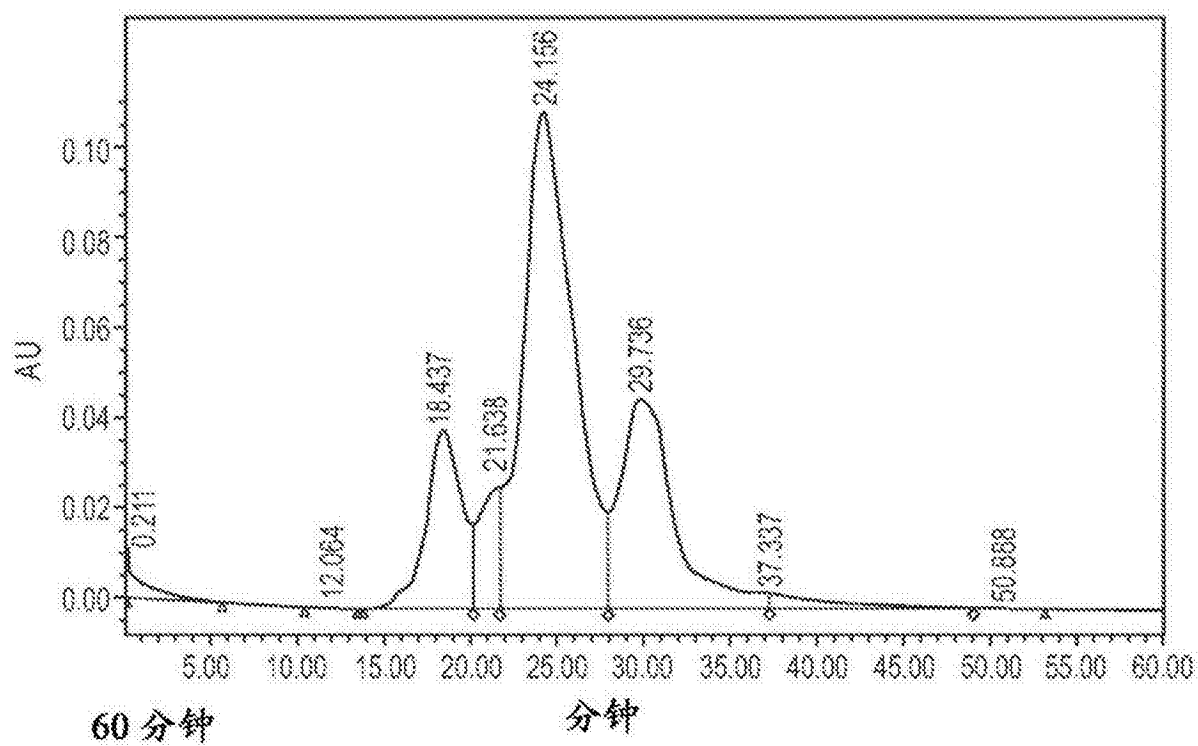


图 8C

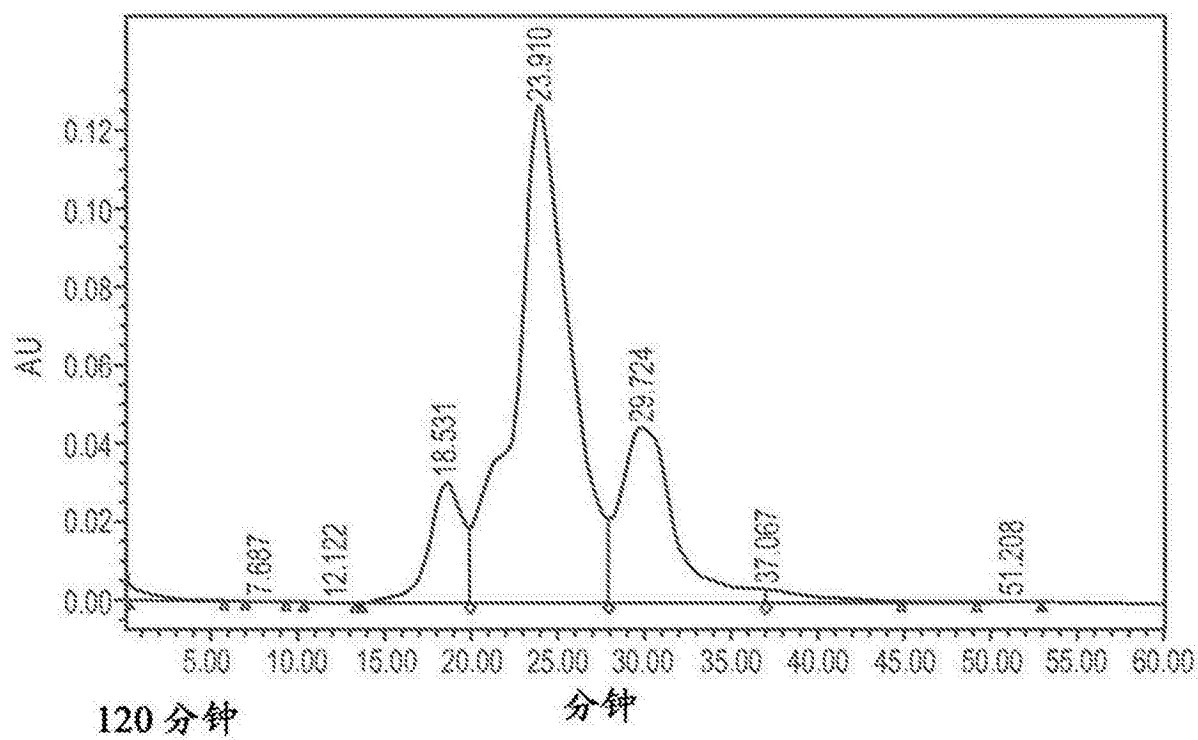


图 8D

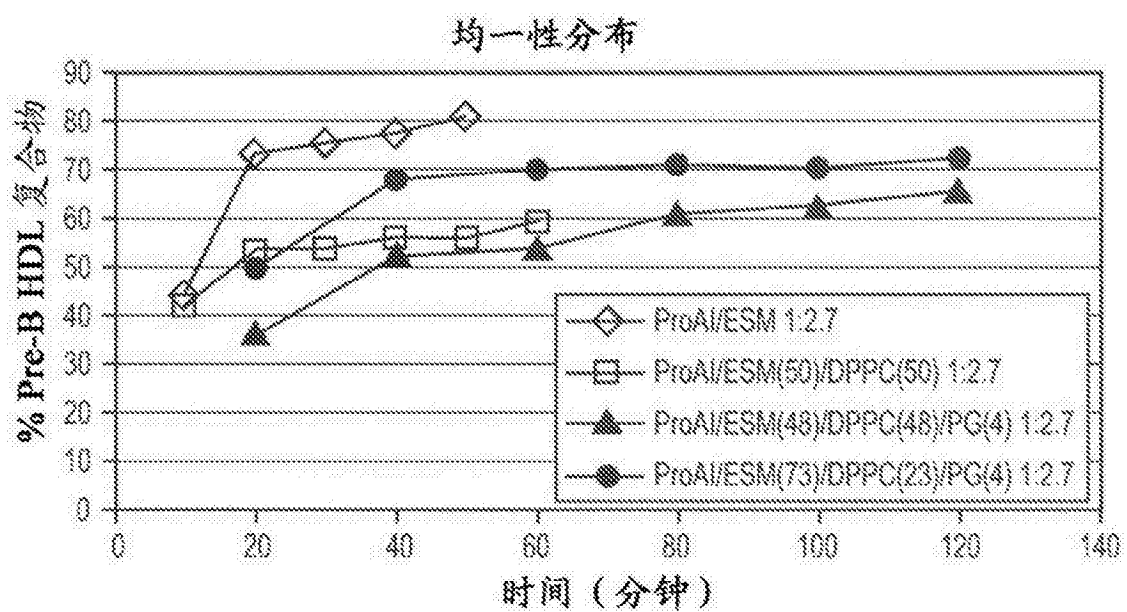


图 9

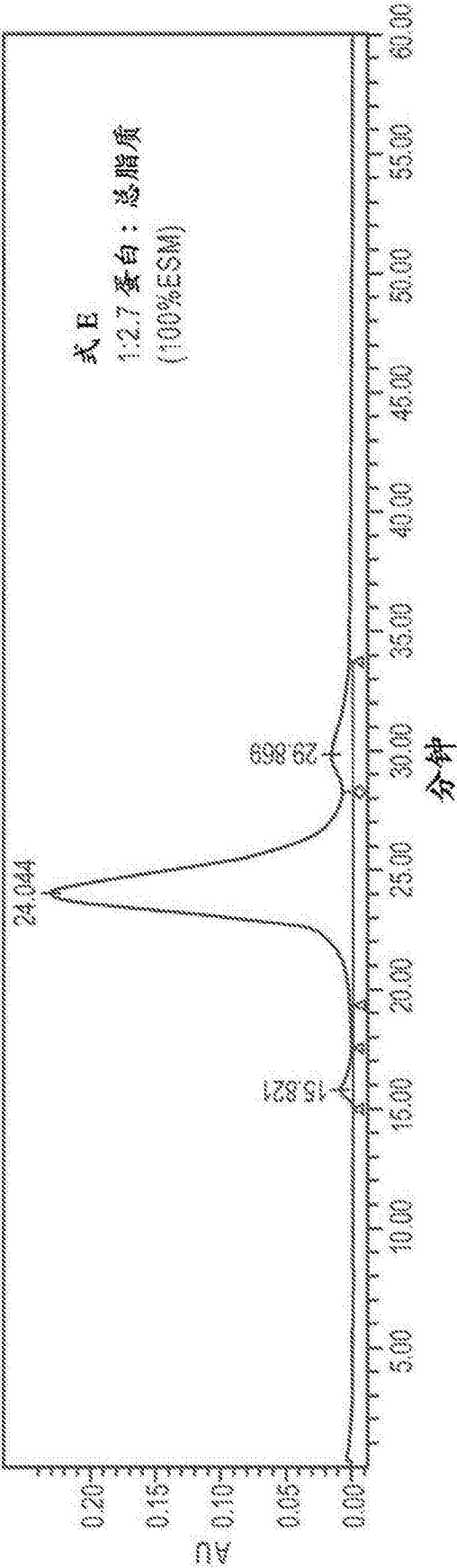


图 10A

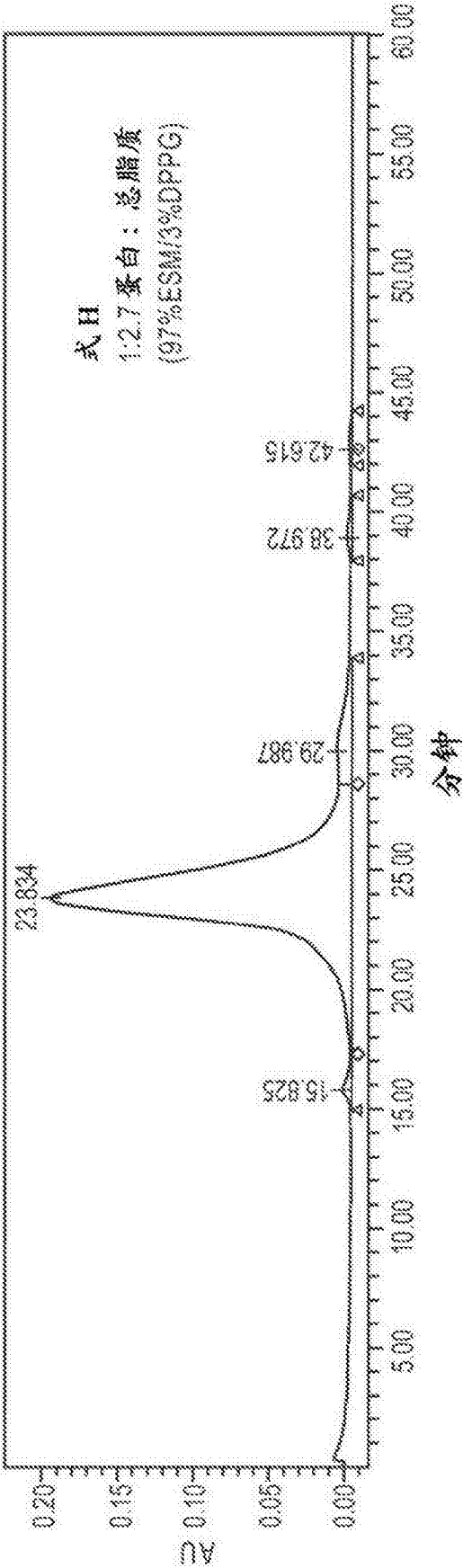


图 10B

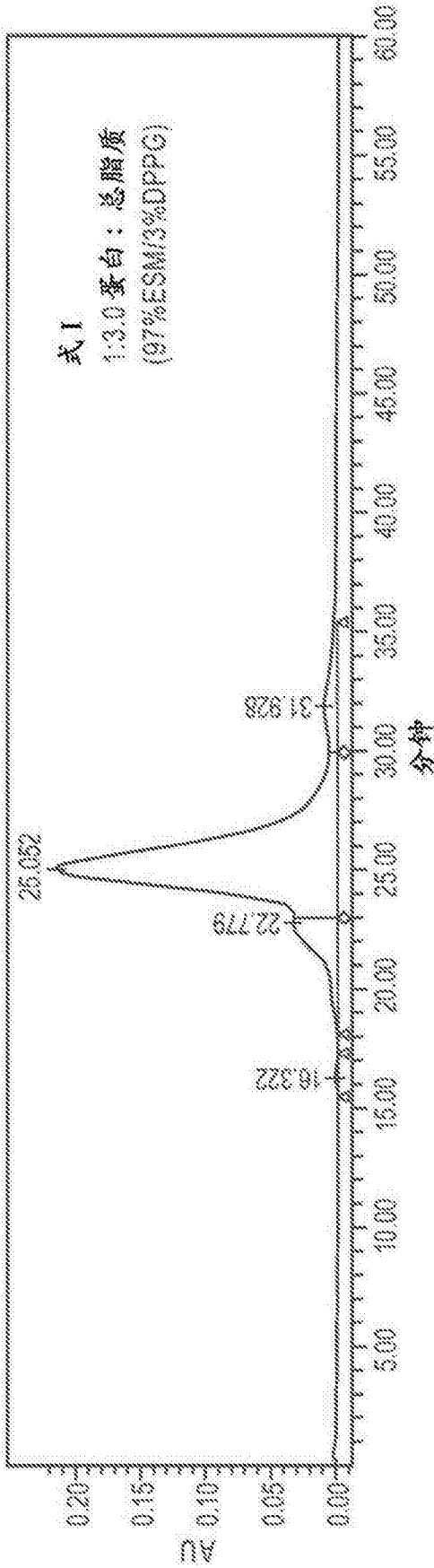


图 10C

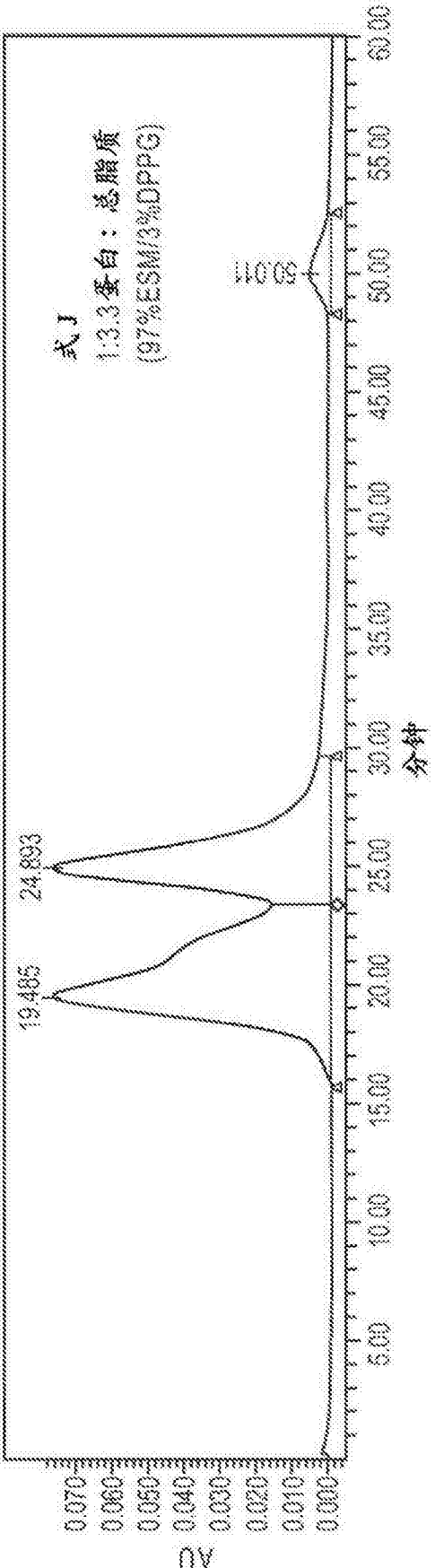


图 10D

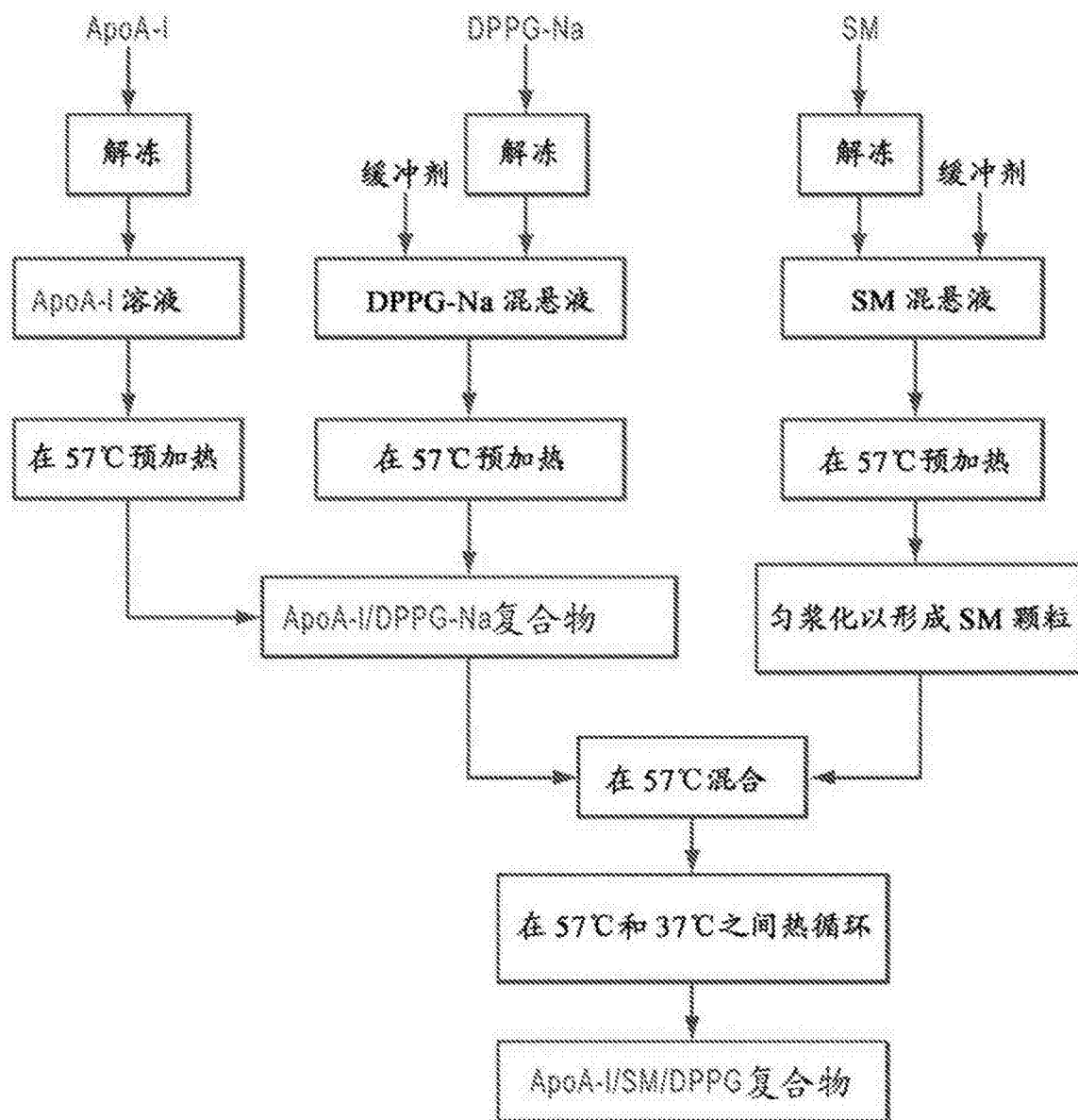


图 11

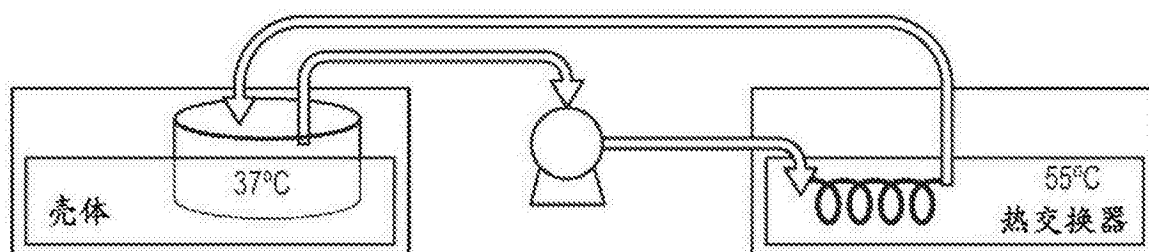


图 12

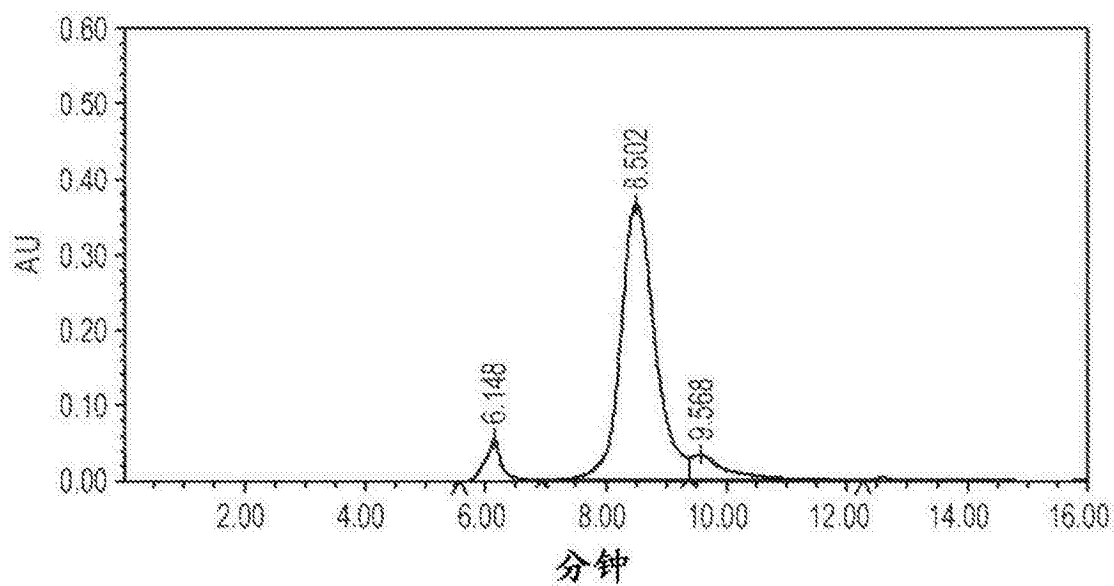


图 13A

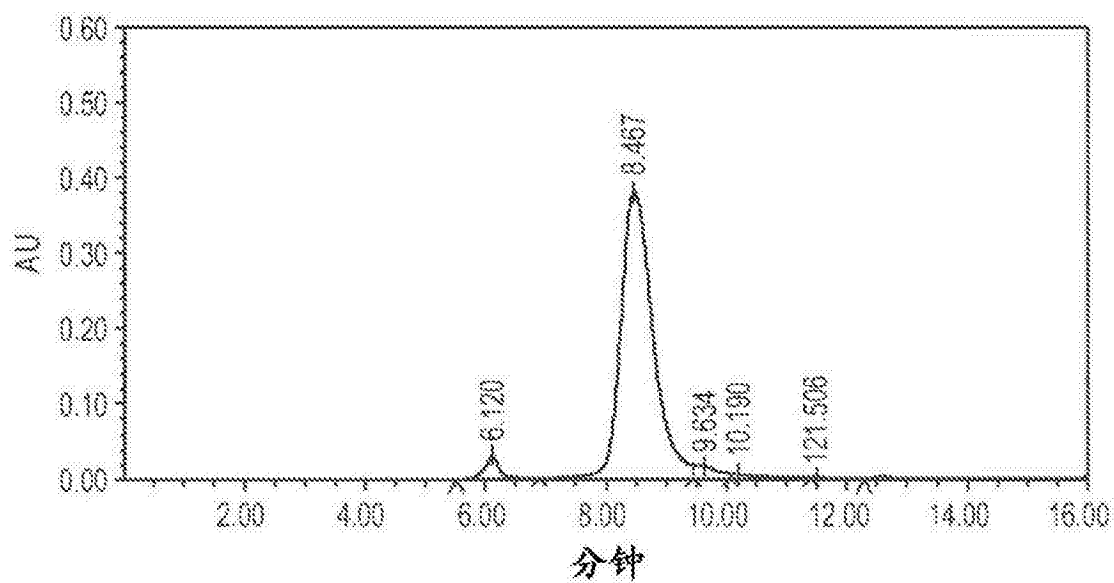


图 13B

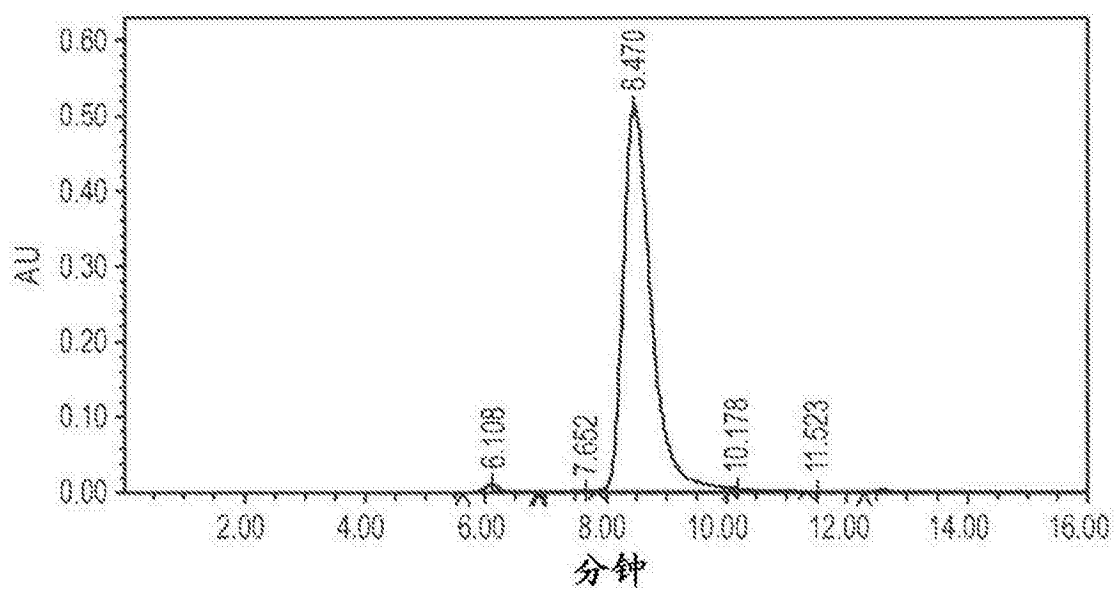


图 13C

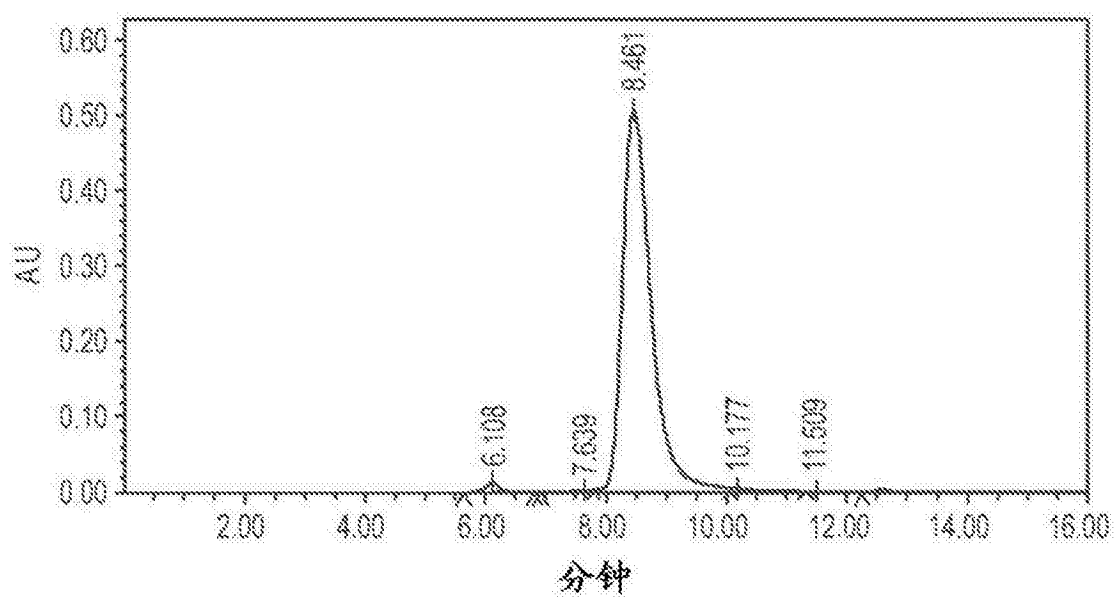


图 13D

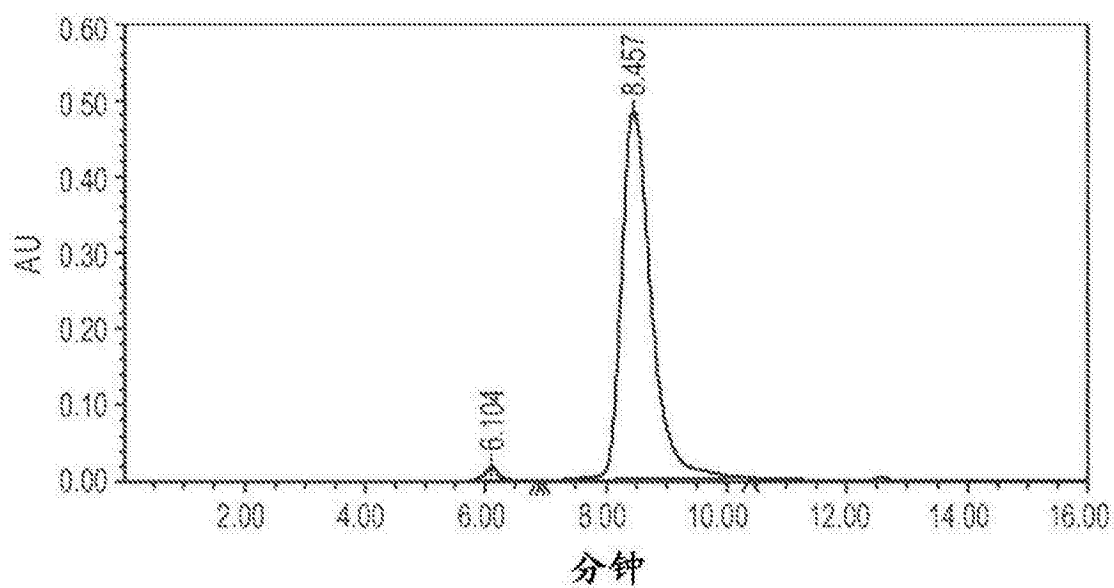


图 13E

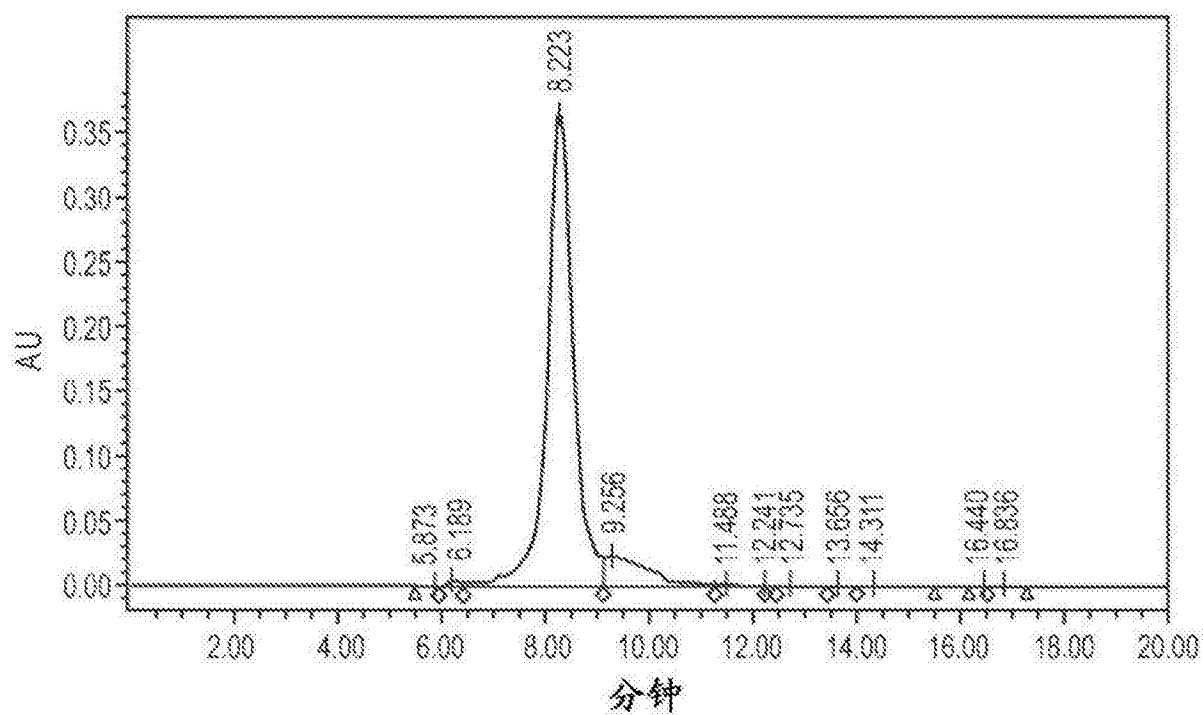


图 14

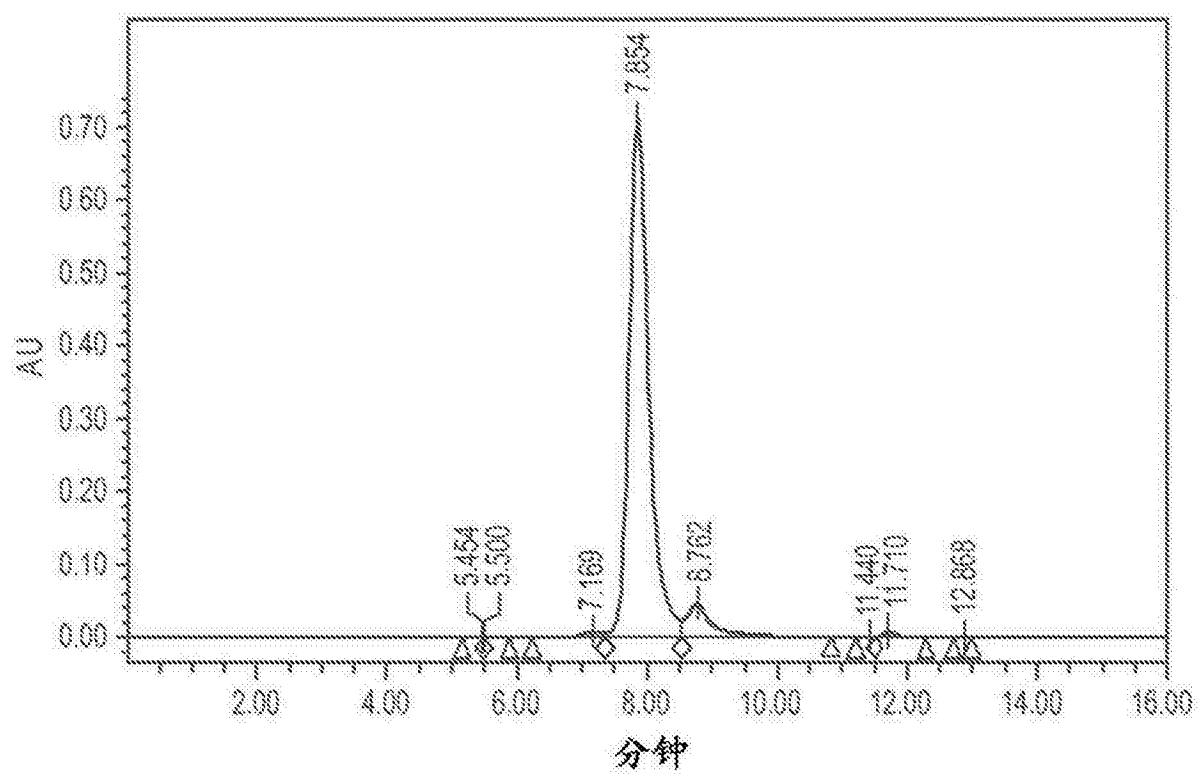


图 15

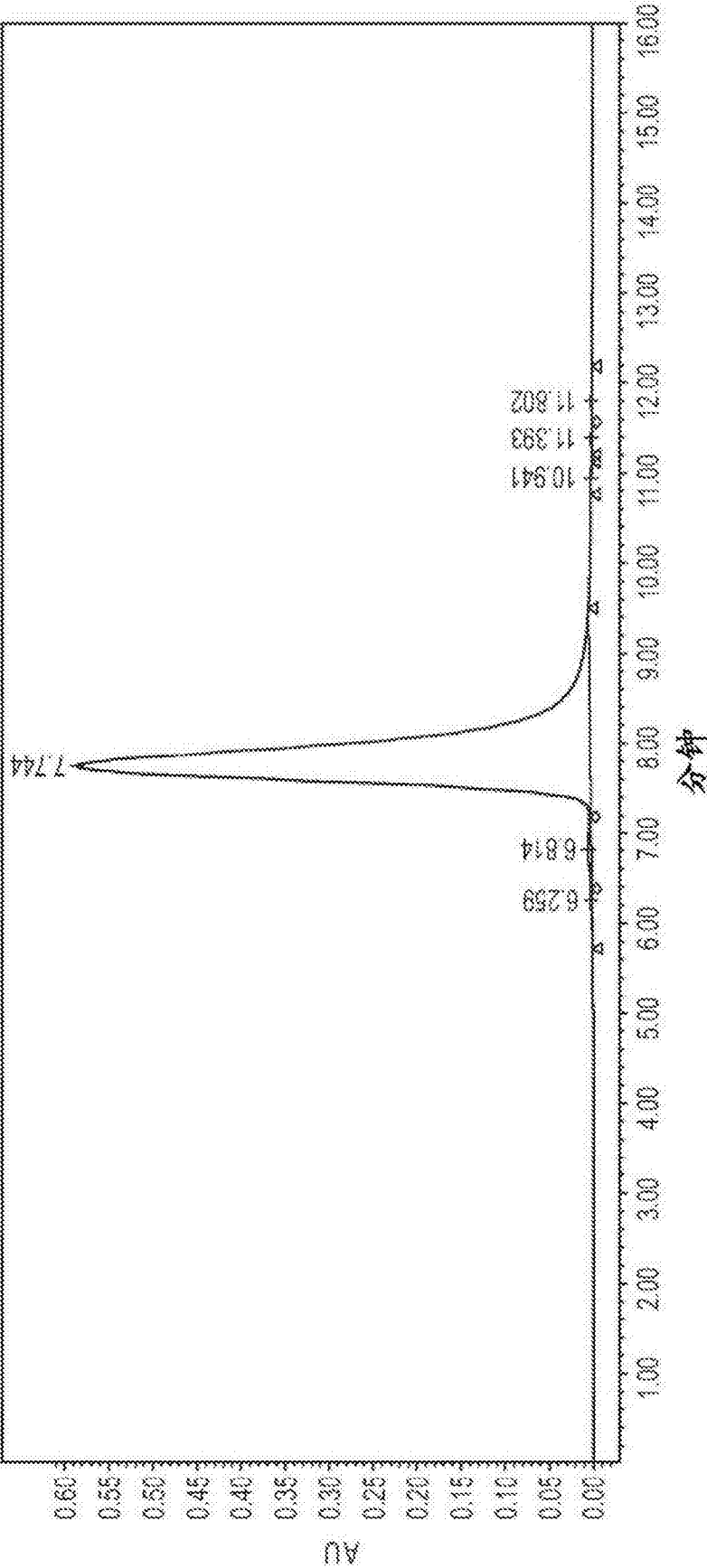


图 16

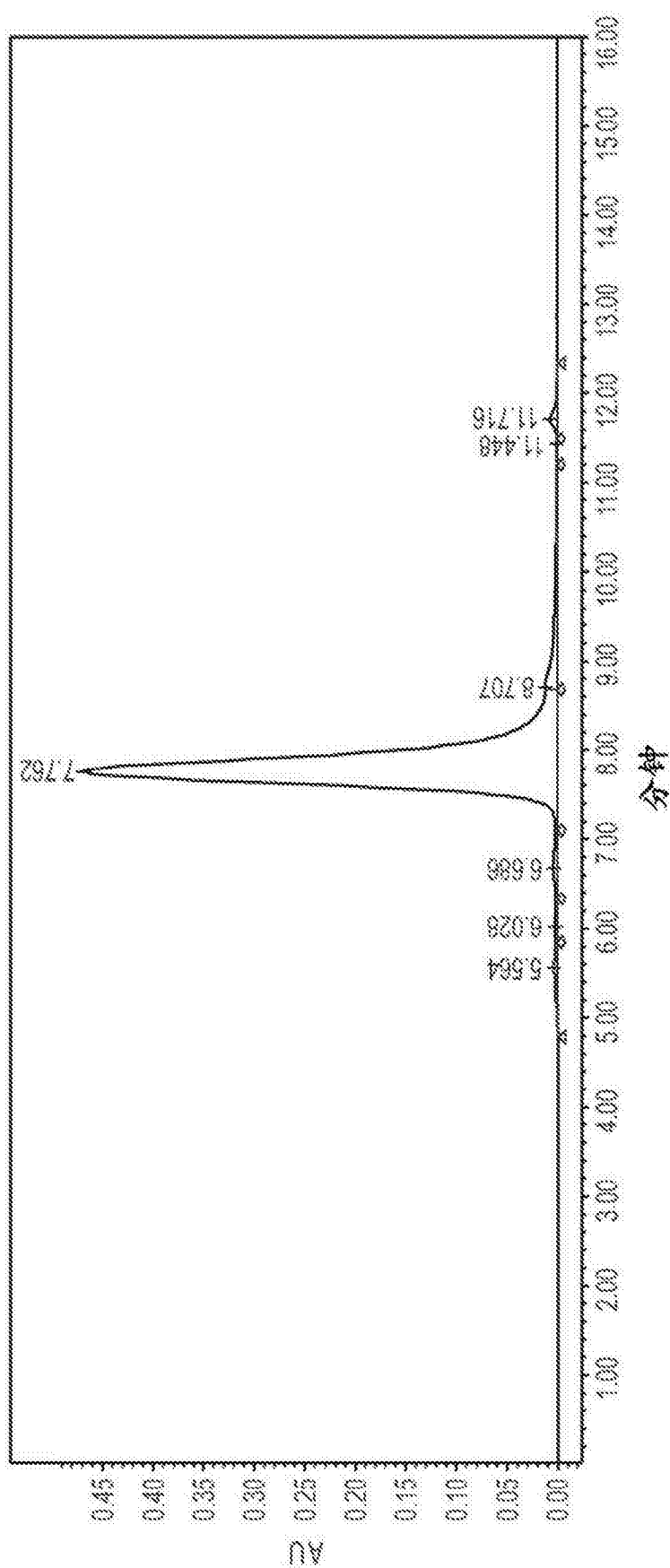


图 17

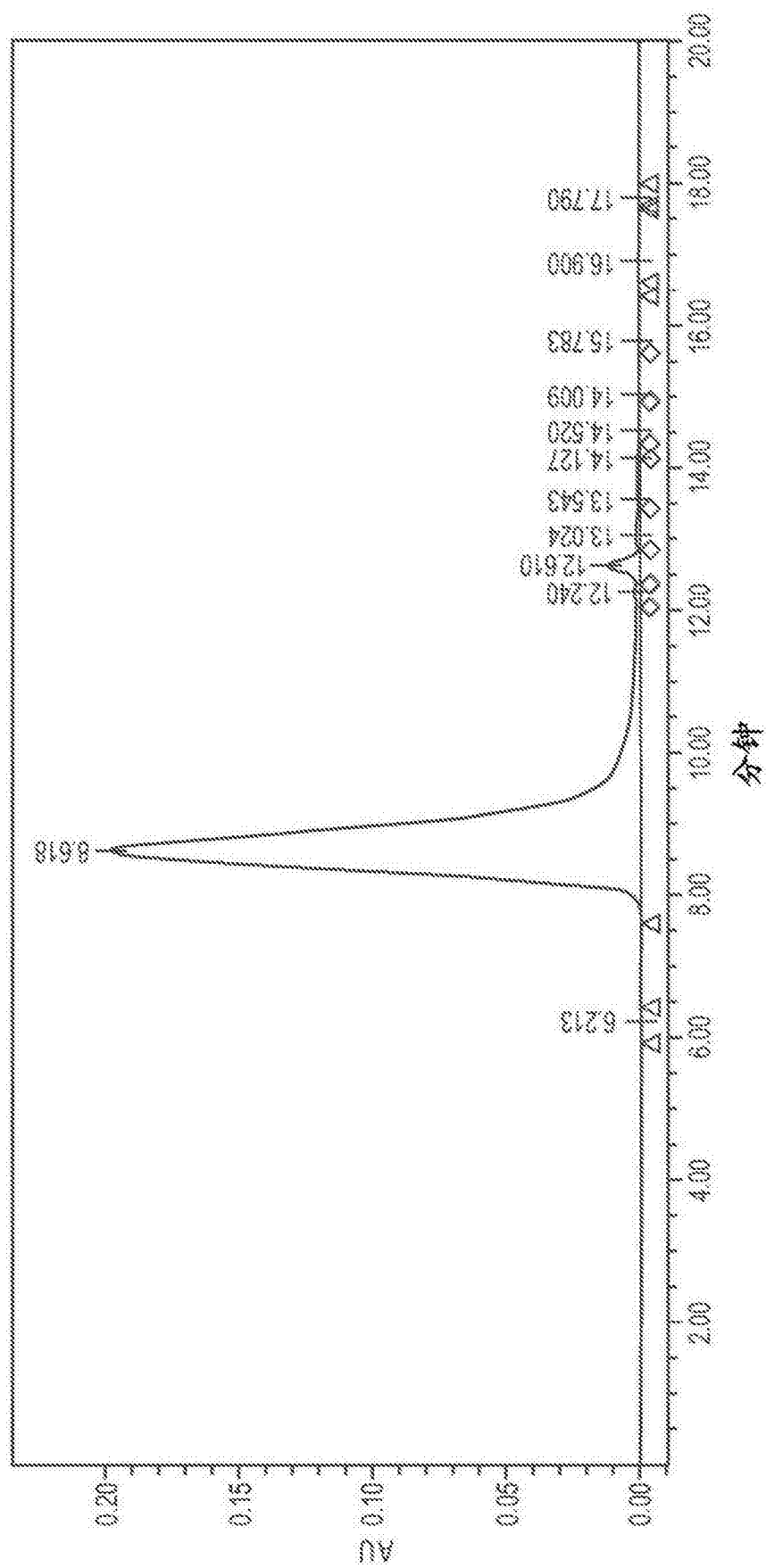


图 18

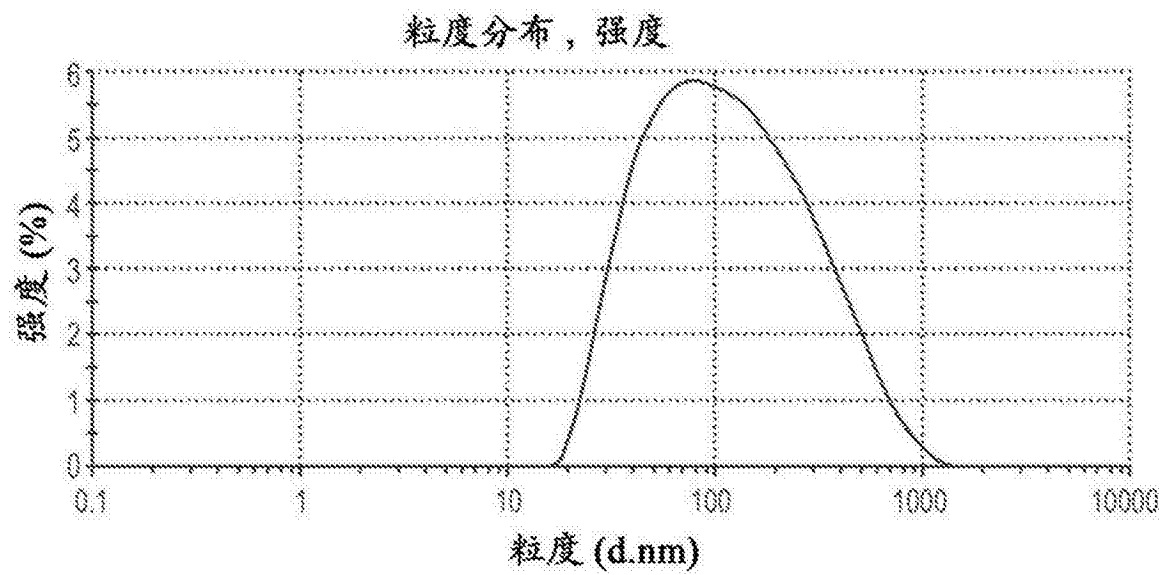


图 19A

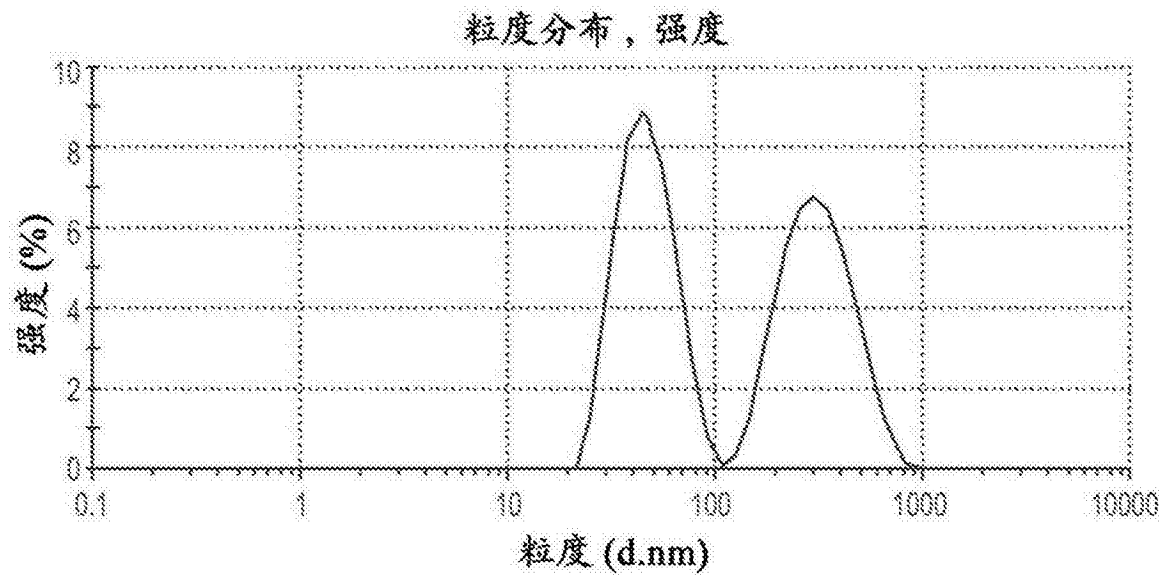


图 19B

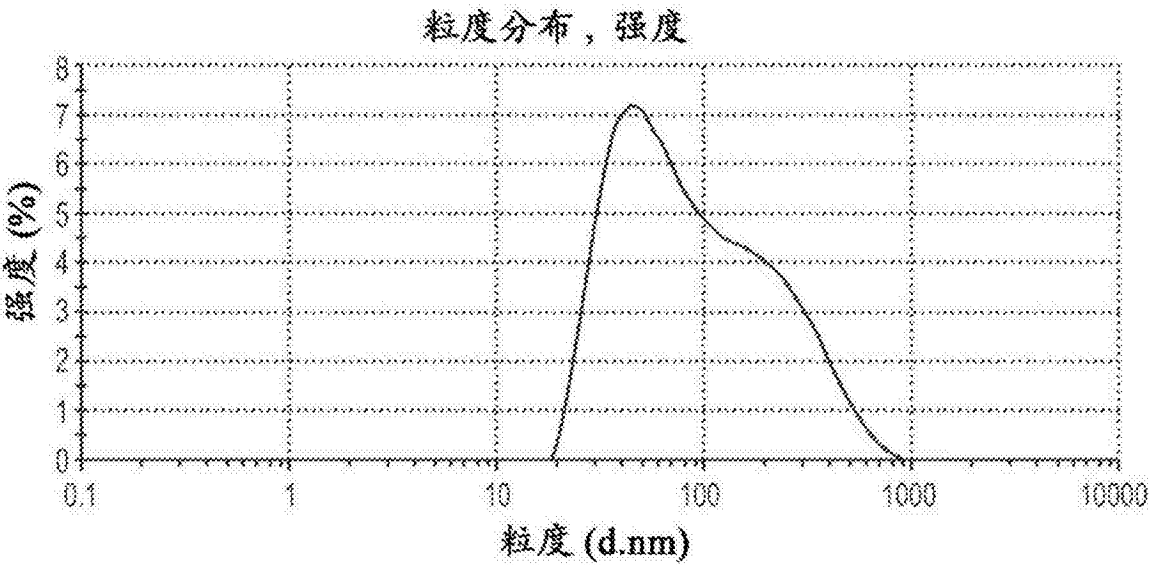


图 19C

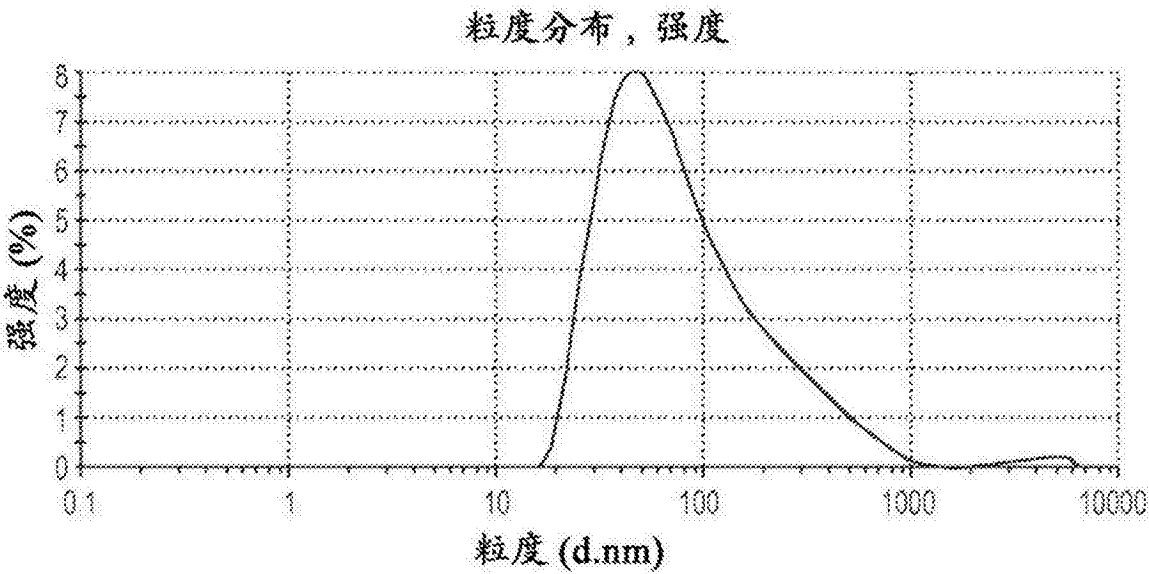


图 19D

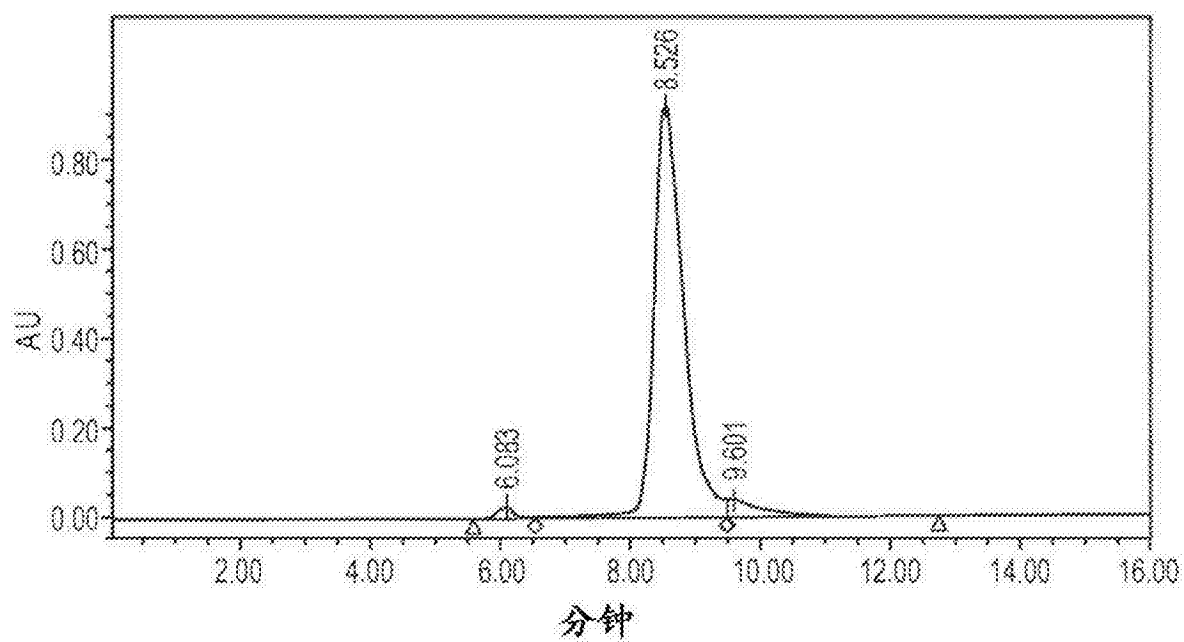


图 20A

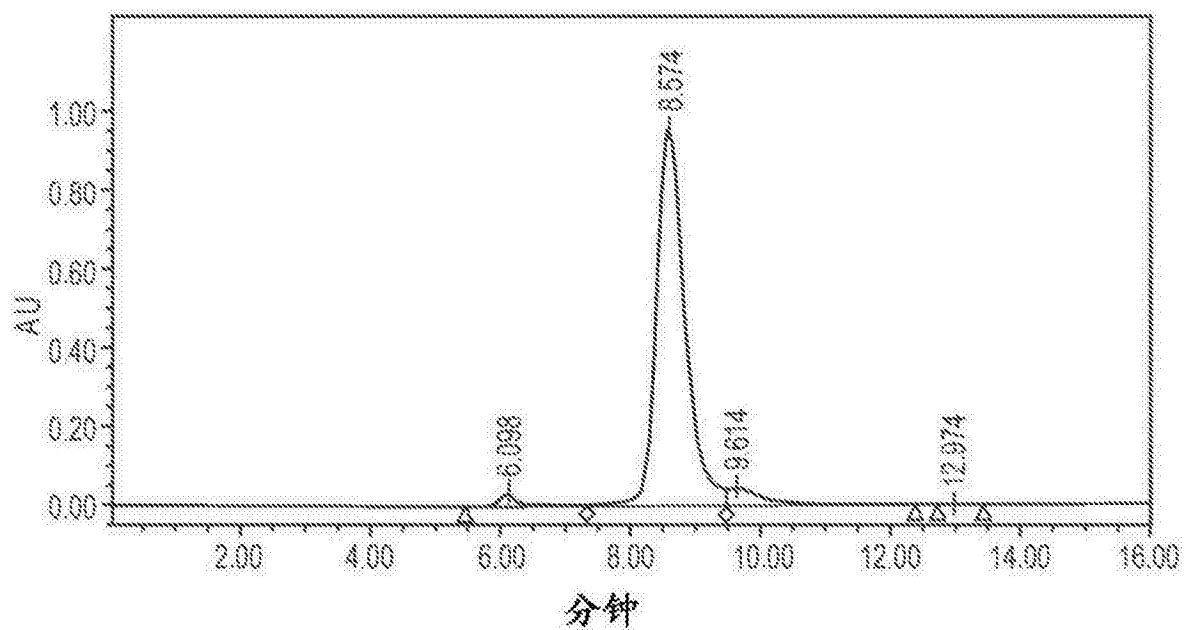


图 20B

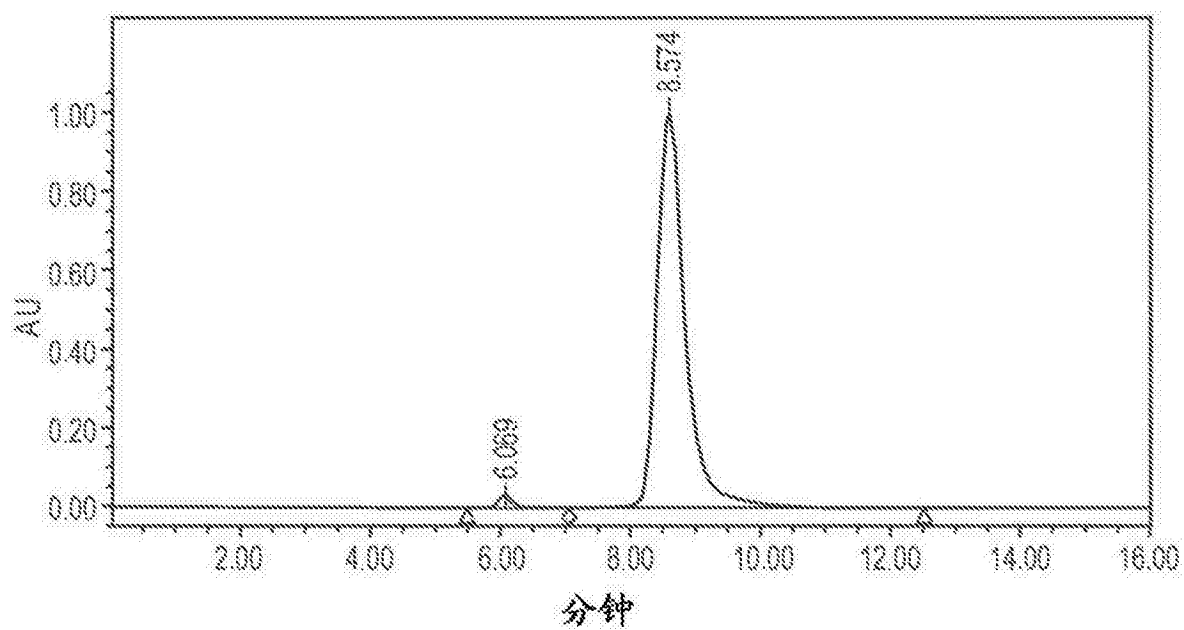


图 20C

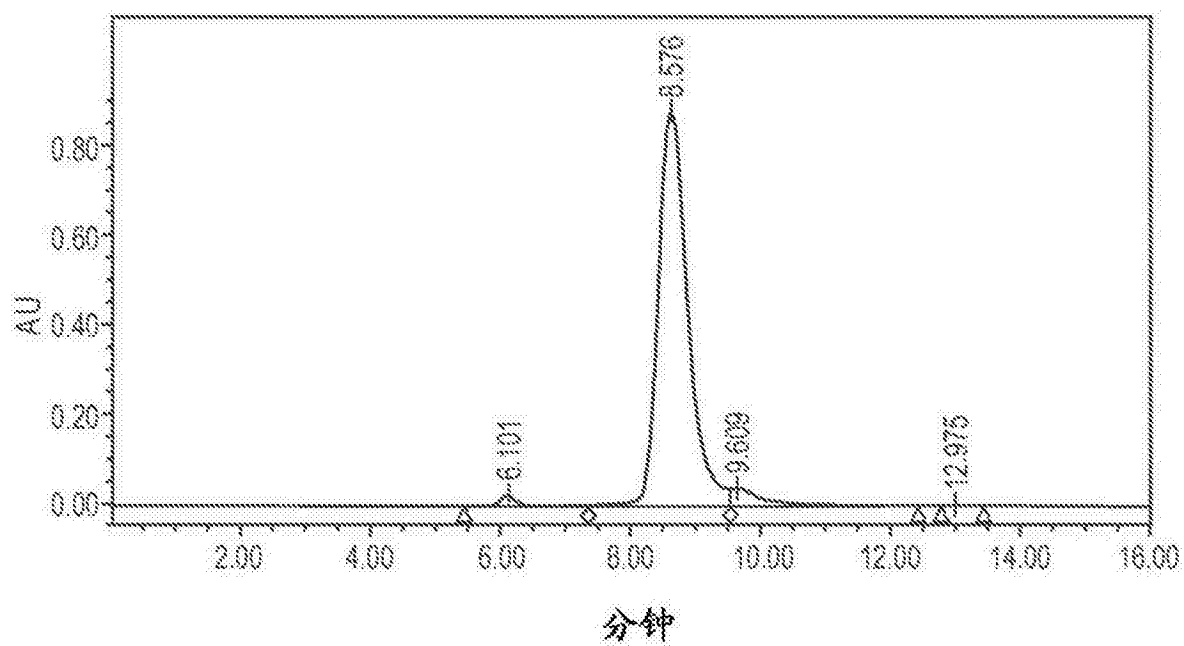


图 20D

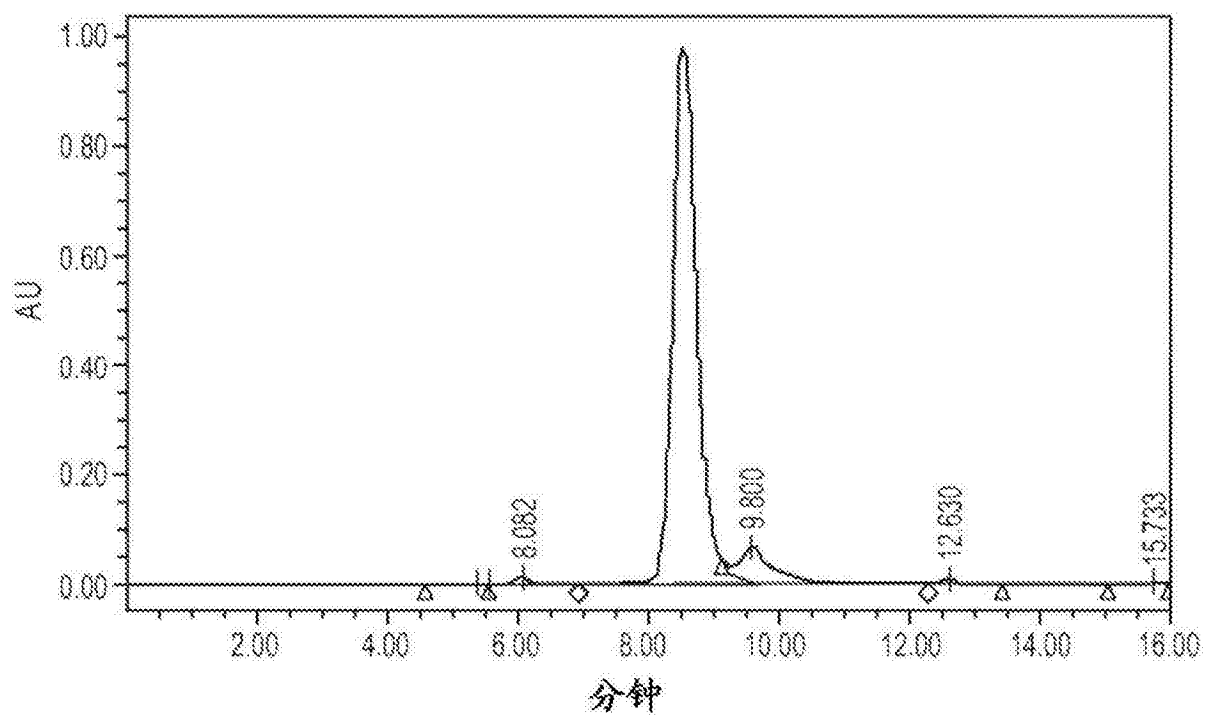


图 21A

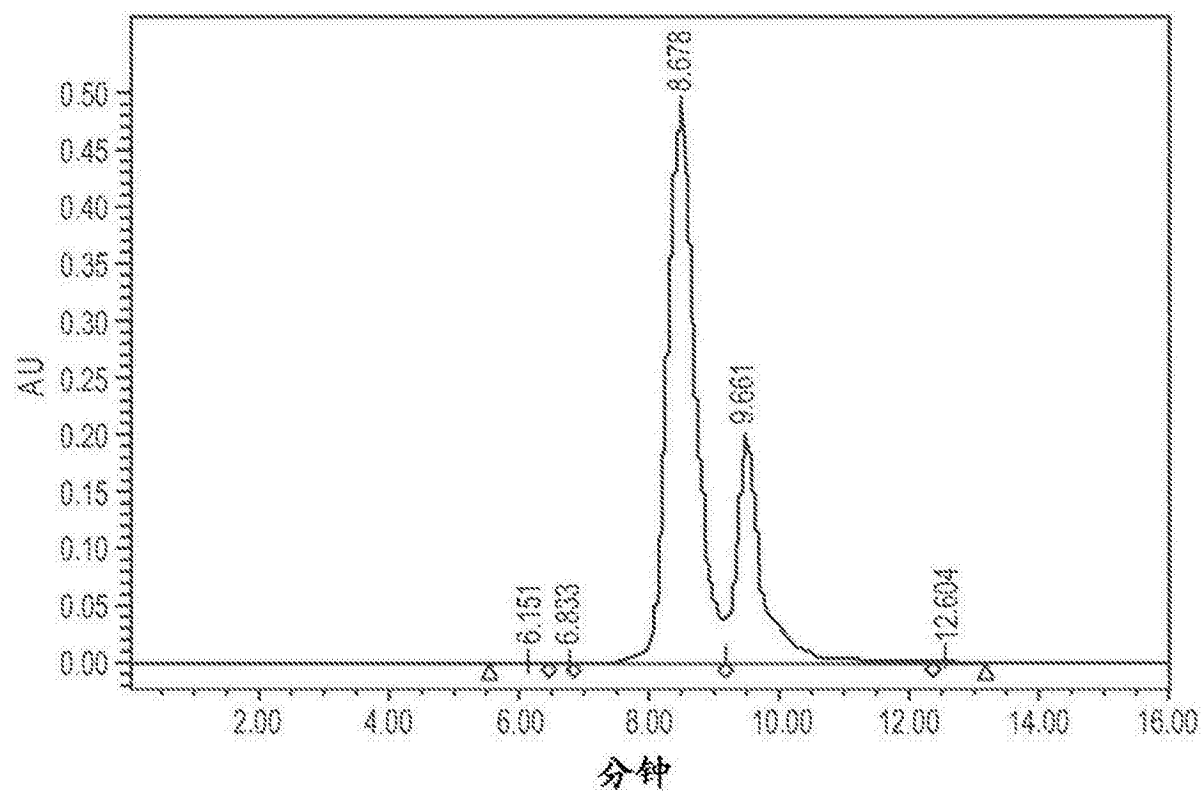


图 21B

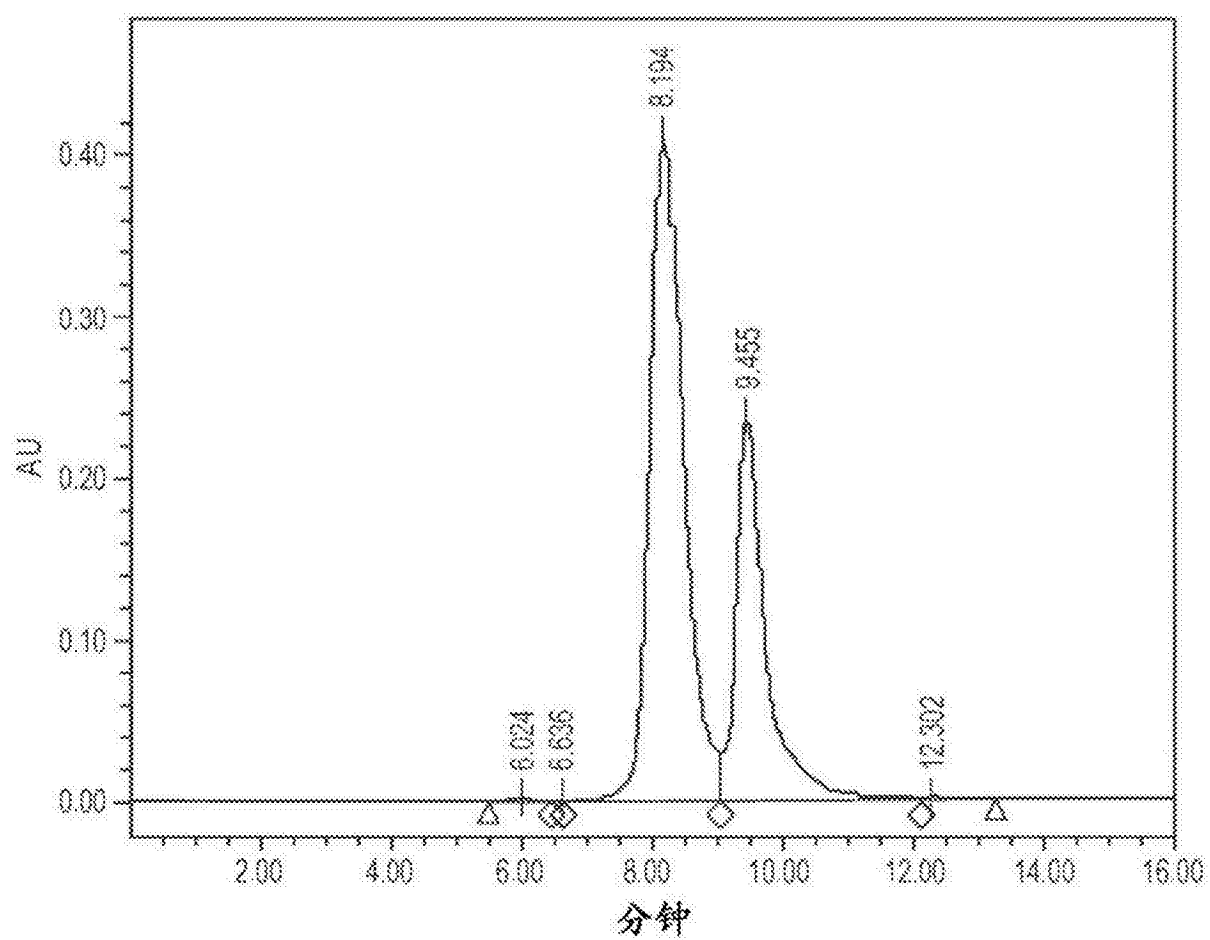


图 22

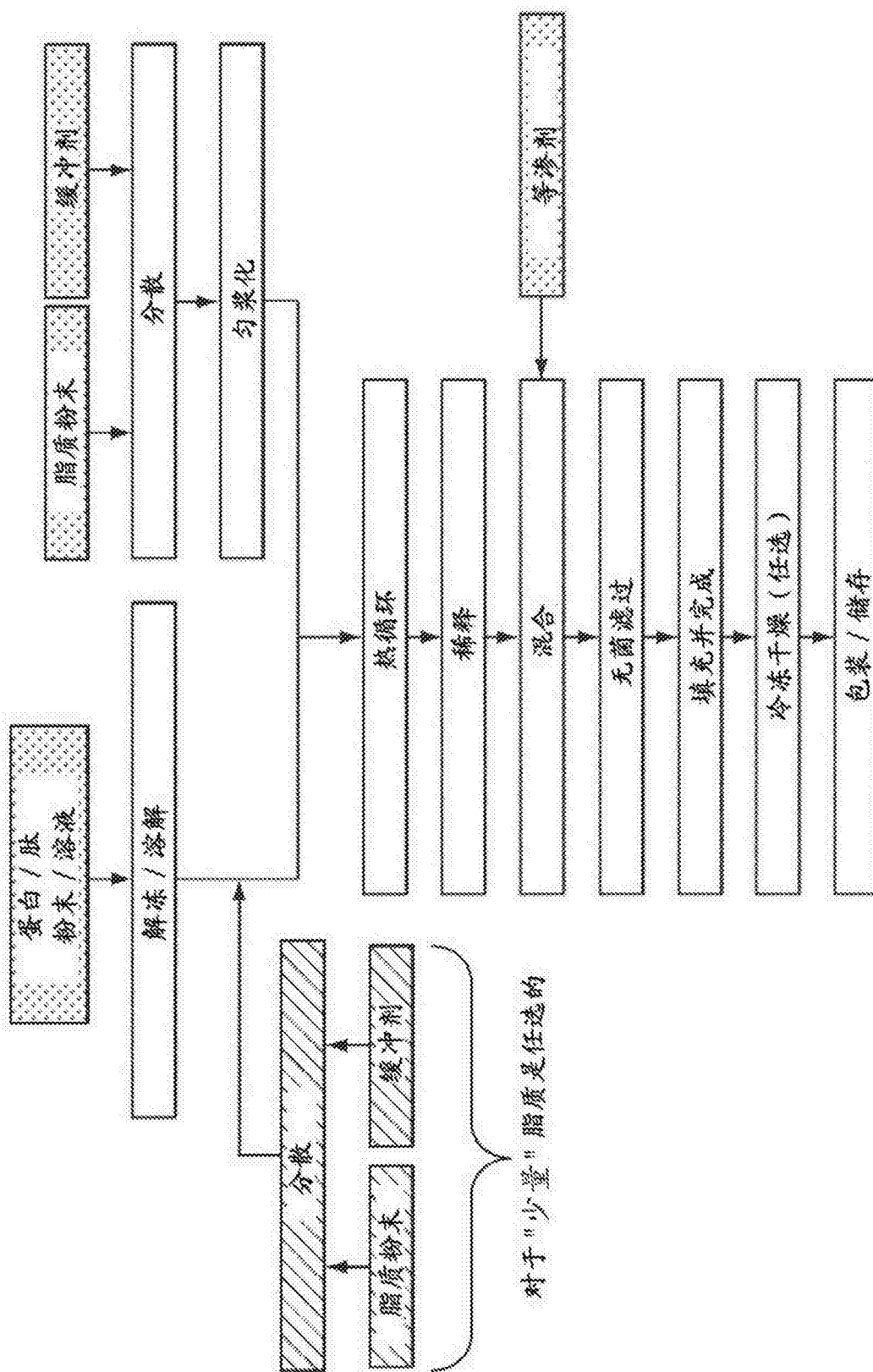


图 23

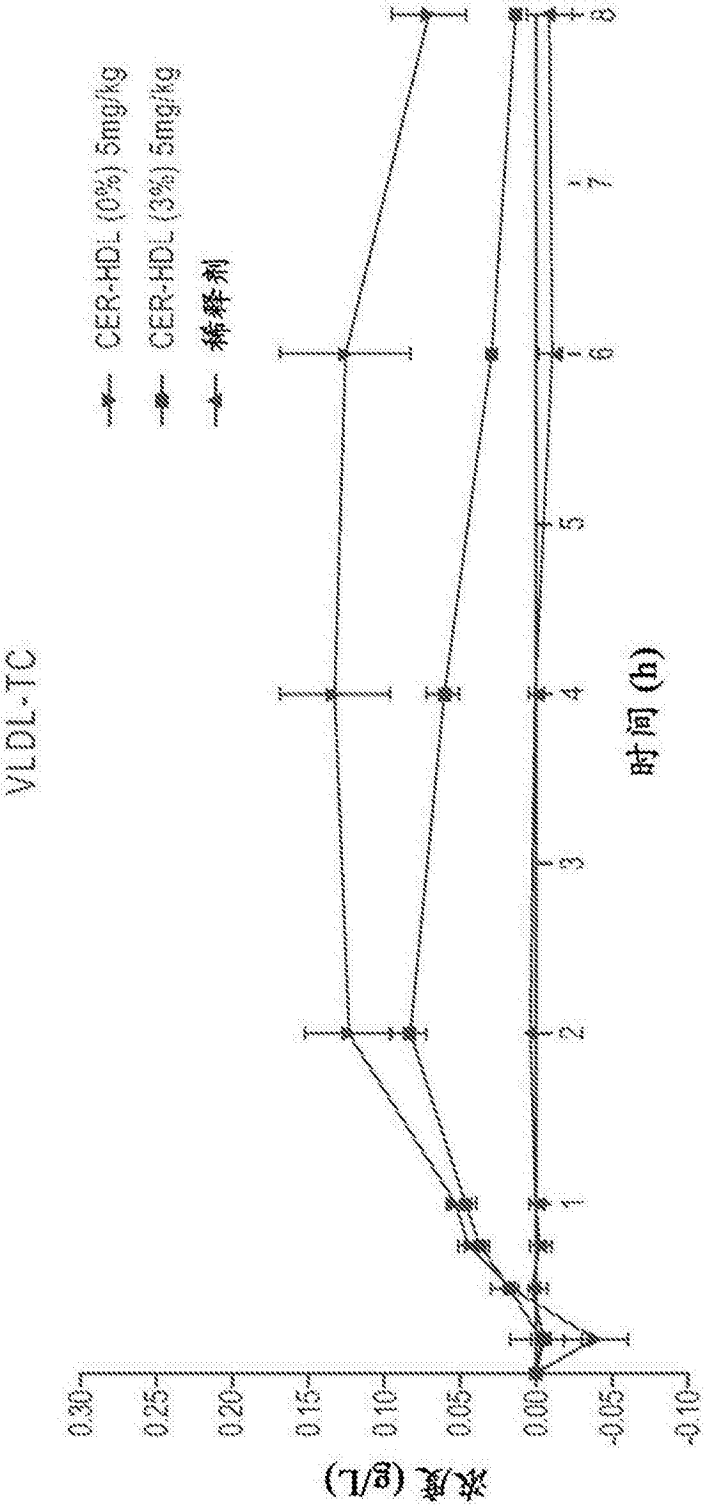


图 24

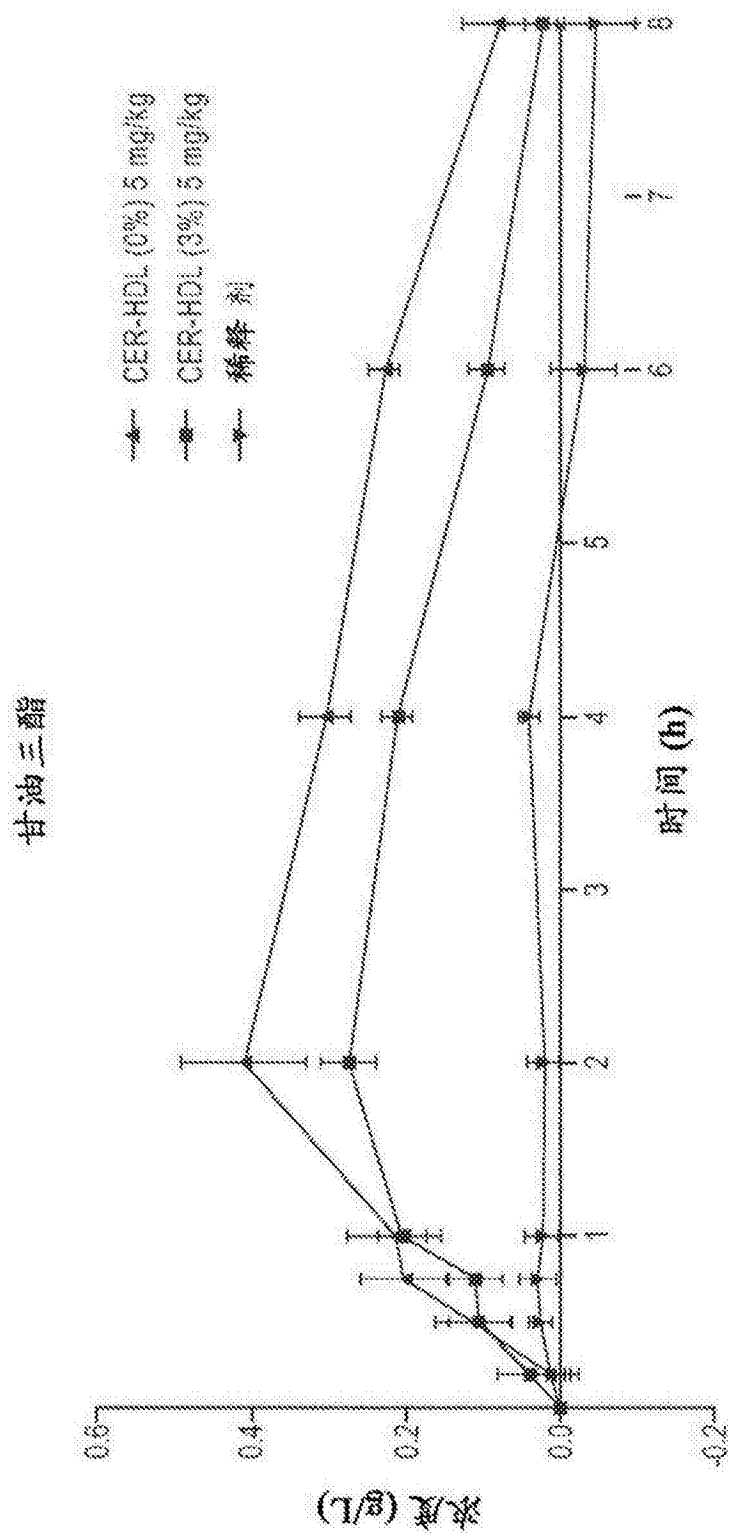


图 25

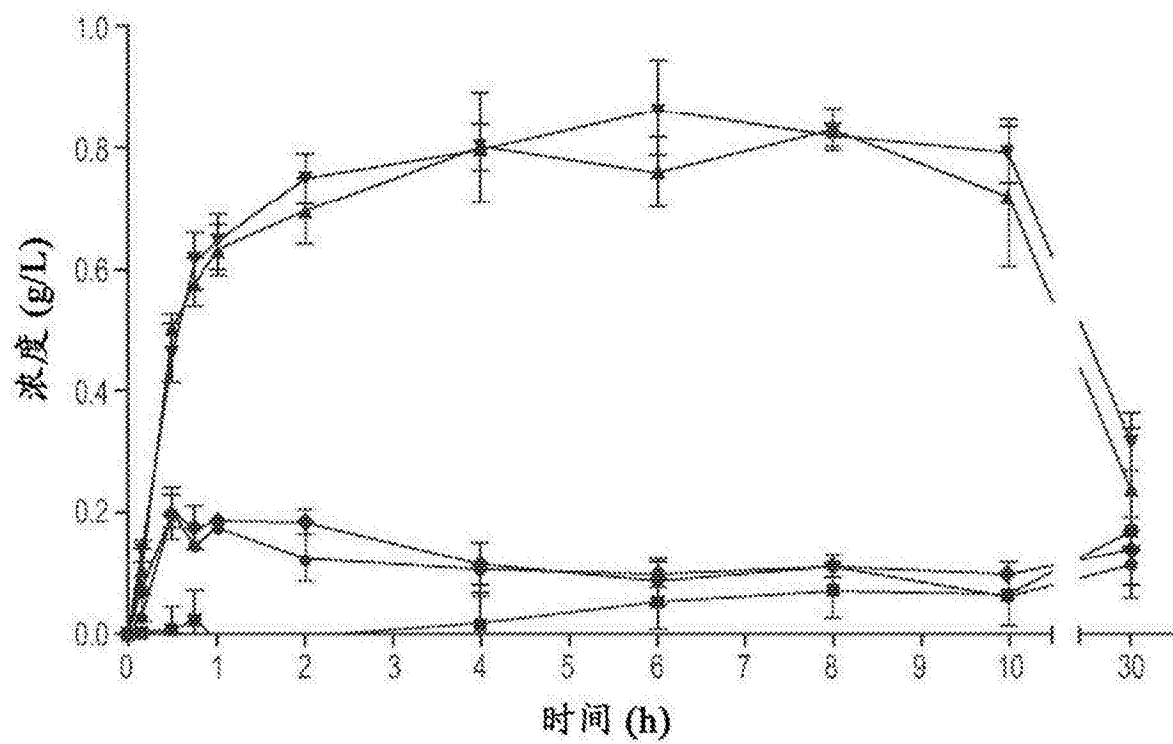


图 26A

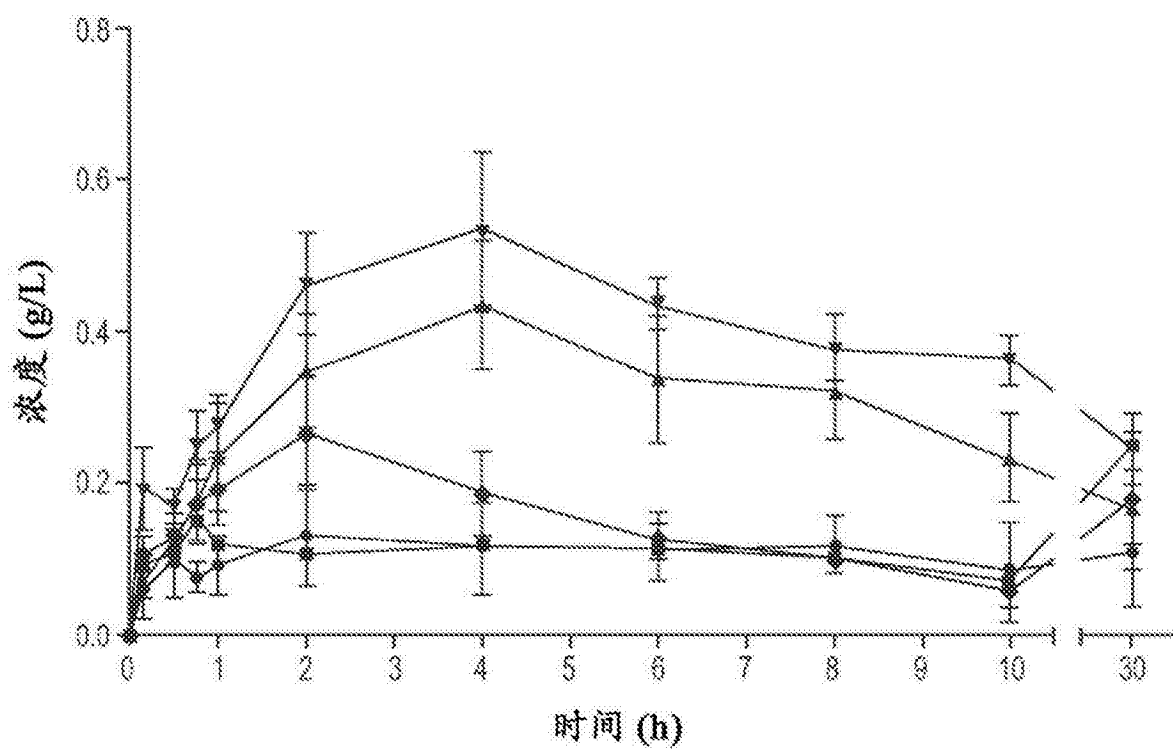


图 26B

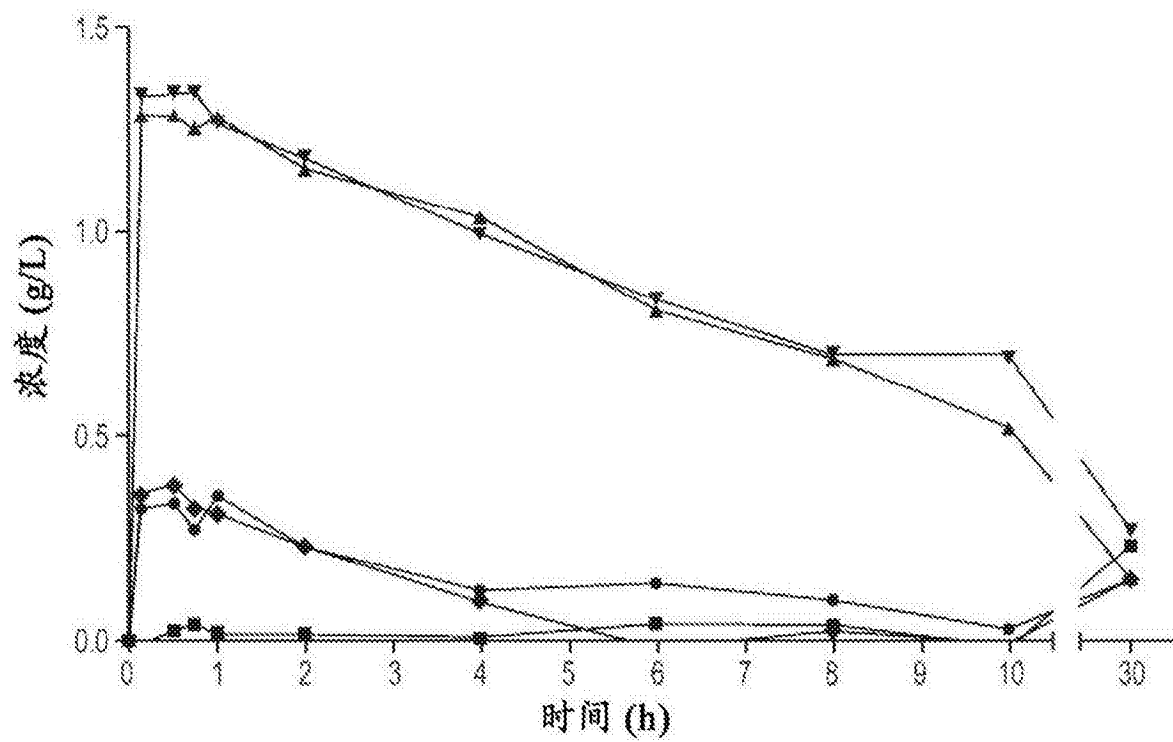


图 26C

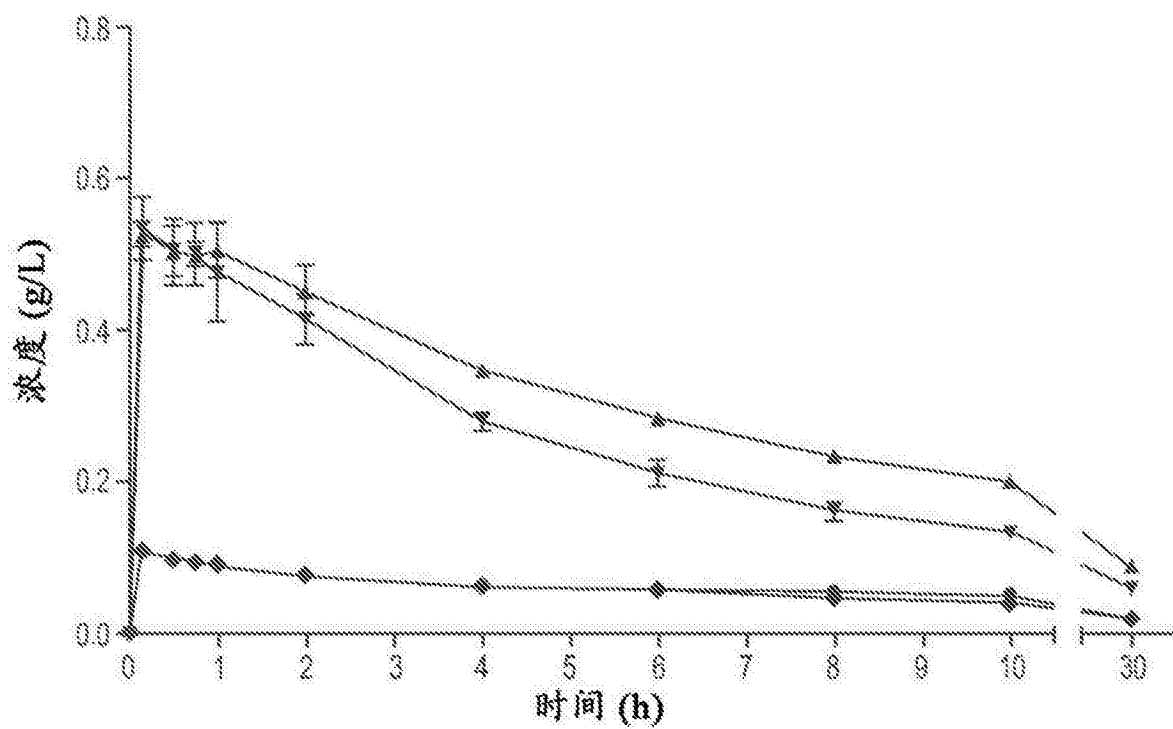


图 26D

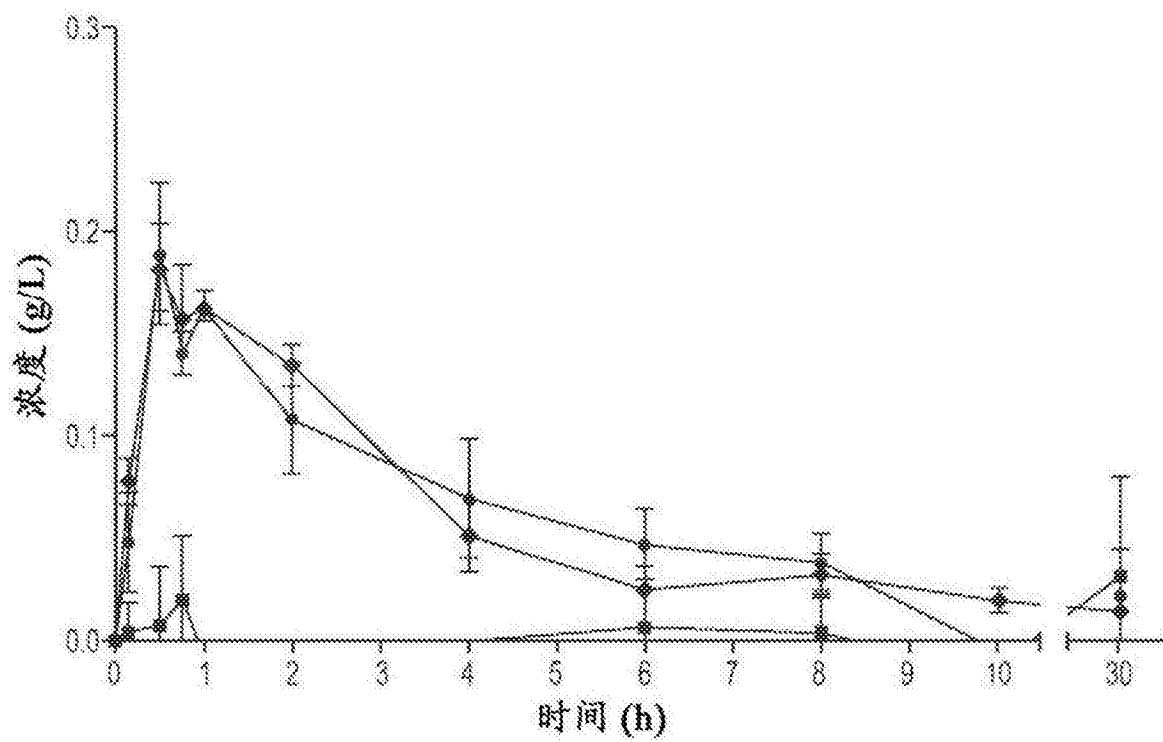


图 27A

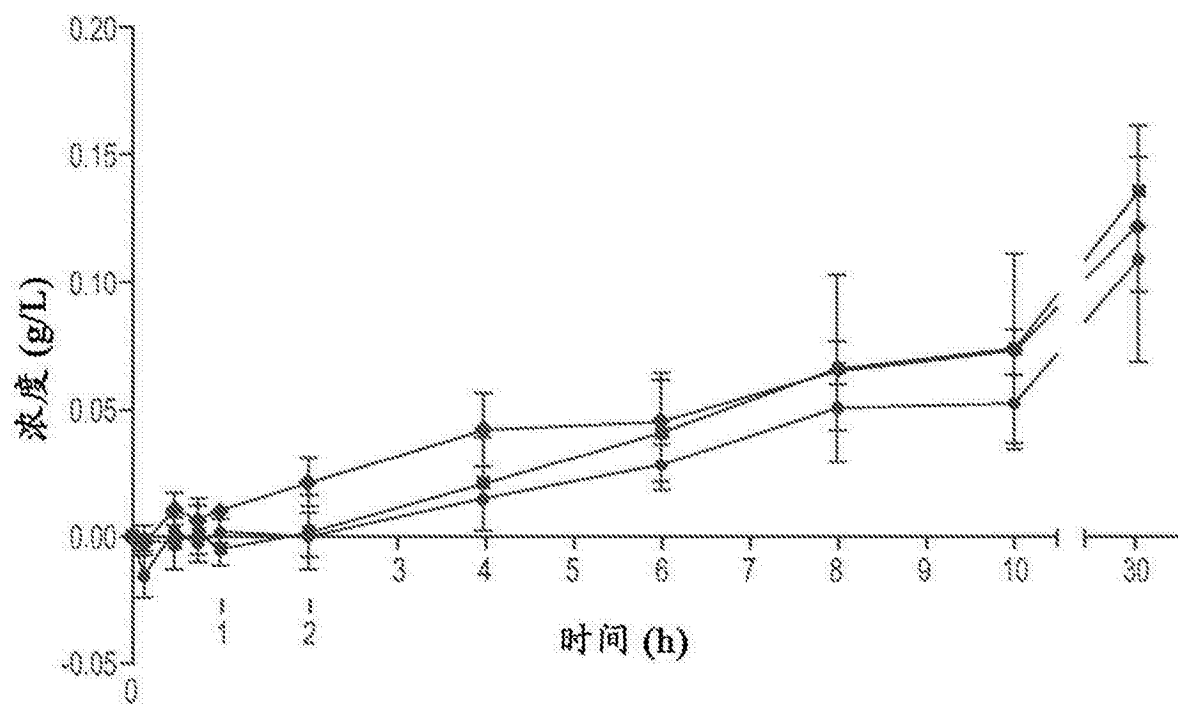


图 27B

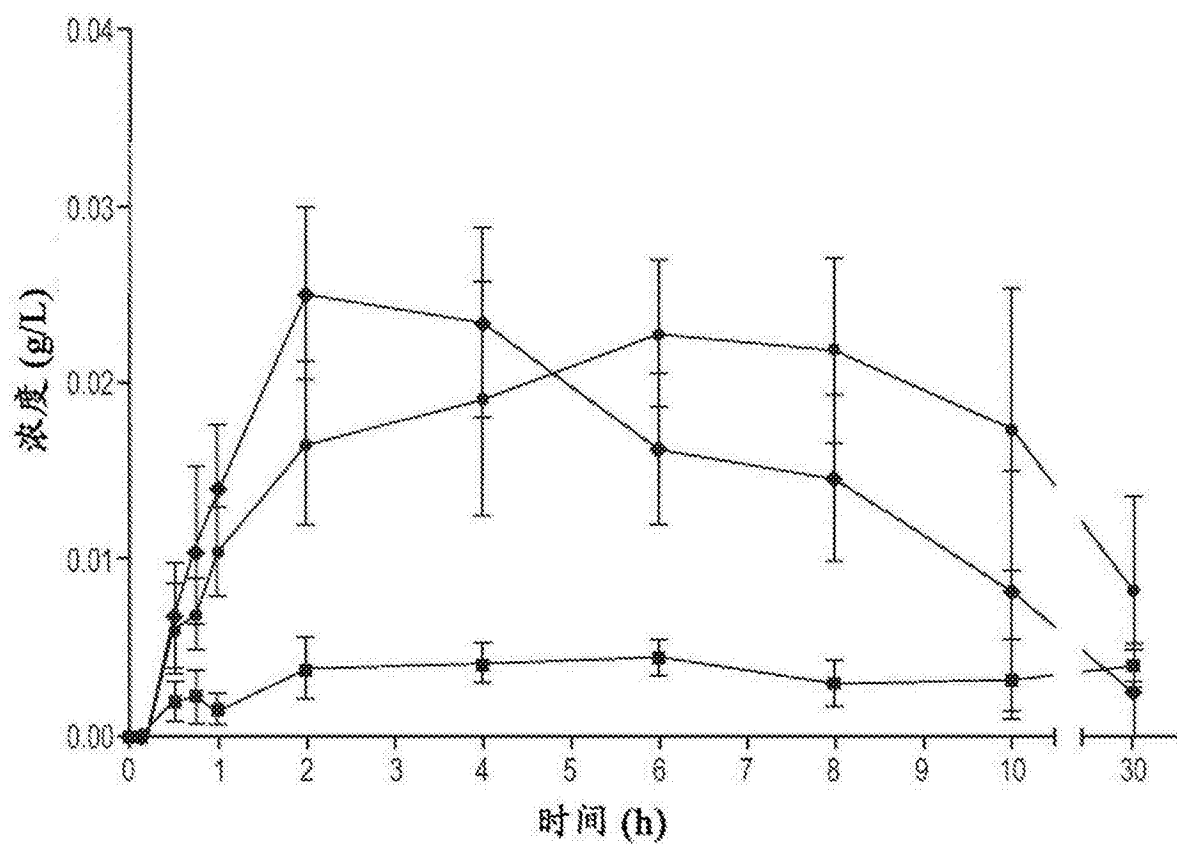


图 27C