



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/17 (2006.01); A61K 47/24 (2006.01); A61K 2121/00 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015120808, 31.10.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.10.2013

Дата регистрации:
12.10.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

02.11.2012 US 61/721,771;
04.02.2013 EP 13153903.3;
14.03.2013 US 13/803,863;
10.04.2013 AU 2013205684

(43) Дата публикации заявки: 20.12.2016 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 12.10.2018 Бюл. № 29

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 02.06.2015

(86) Заявка РСТ:
AU 2013/001260 (31.10.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/066943 (08.05.2014)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ВУЧИЦА Ивонне (СН),
УОРРЕН Гэри Ли (US)

(73) Патентообладатель(и):
СиЭсЭл Лимитед (AU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2012000048 A1, 05.01.2012. US
5652339 A, 29.07.1997. "Липопротеины
сыворотки крови при сахарном диабете
типа 2" / Потеряева О.Н., Панин Л.Е.,
Шевкопляс О.П., Воронова О.С., Костина
Н.Е., Поляков Л.М.// Проблемы
эндокринологии. Т.49.

(54) ВОССТАНАВЛИВАЕМЫЙ СОСТАВ HDL

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к
восстанавливаемым составам липопротеинов
высокой плотности (rHDL), содержащим
аполипопротеин, липид и стабилизатор
лиофилизации, а также к способу их получения.
Осуществление изобретения позволяет получить

восстановленный состав липопротеинов высокой
плотности, характеризующихся сниженной
почечной токсичностью и хорошей долгосрочной
стабильностью, в частности, в
лиофилизированной форме. 2 н. и 22 з.п. ф-лы, 7
пр., 2 табл., 21 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)*A61K 47/24* (2006.01)*A61P 3/06* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 38/17 (2006.01); *A61K 47/24* (2006.01); *A61K 2121/00* (2006.01)(21)(22) Application: **2015120808, 31.10.2013**(24) Effective date for property rights:
31.10.2013Registration date:
12.10.2018

Priority:

(30) Convention priority:

02.11.2012 US 61/721,771;
04.02.2013 EP 13153903.3;
14.03.2013 US 13/803,863;
10.04.2013 AU 2013205684(43) Application published: **20.12.2016 Bull. № 35**(45) Date of publication: **12.10.2018 Bull. № 29**(85) Commencement of national phase: **02.06.2015**(86) PCT application:
AU 2013/001260 (31.10.2013)(87) PCT publication:
WO 2014/066943 (08.05.2014)Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

VUCHITSA Ivonne (CH),
UORREN Geri Li (US)

(73) Proprietor(s):

SiEsEl Limited (AU)(54) **RECONSTITUTED HDL FORMULATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: present invention relates to reconstituted high density lipoprotein (rHDL) formulations comprising an apolipoprotein, a lipid and a lyophilization stabiliser, as well as a process for their preparation. Implementation of the invention makes it possible to obtain a reconstituted high density

lipoprotein formulation, characterised by reduced renal toxicity and good long-term stability, in particular, in a lyophilised form.

EFFECT: reconstituted HDL formulation is disclosed.

24 cl, 7 ex, 2 tbl, 21 dwg

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к восстанавливаемым составам липопротеинов высокой плотности и, в частности, к составам с подходящей стабильностью и биологическими свойствами для фармацевтического использования.

Предшествующий уровень техники

Липопротеины высокой плотности (HDL) образуют ряд липопротеиновых частиц, обнаруживаемых в нормальной сыворотке. Зрелые частицы HDL находятся в форме глобулярных структур, содержащих белки и липиды. Во внешнем слое этих частиц содержатся более полярные липиды, фосфолипиды и свободный холестерин, где все они содержат заряженные группы, ориентированные наружу по направлению к водной среде. Более гидрофобные липиды, такие как этерифицированные холестерин и триглицериды, располагаются в ядре частицы. Вновь образуемые или формирующиеся частицы HDL не содержат липид и имеют дискообразную форму. Белковые компоненты залегают во внешнем слое. Основным белковым компонентом являются аполипопротеин А-I (АроА-I) с меньшими количествами АроА-II, АроА-IV, АроСIII, АроD, АроЕ и АроJ. На частице HDL располагаются другие различные белки, такие как лецитин-холестерин ацетилтрансфераза, PAF ацетилгидролаза и параоксоназа. HDL характеризуются высокой плотностью ($>1,063$ г/мл) и небольшим размером (диаметр Стокса = от 5 до 17 нм).

Были предприняты попытки разработать искусственные HDL, которые можно вводить в кровоток пациентов для имитации биологического действия природных HDL. Такие искусственные частицы, как правило, обозначают как "восстанавливаемый HDL" (гHDL) или в некоторых случаях как миметики HDL или синтетические частицы HDL. Искусственные частицы содержат компоненты природных частиц, в частности АроА-I и липиды. Например, в WO 2012/000048 описан гHDL, содержащий АроА-I, фосфатидилхолин (PC) и небольшое количество холата натрия. В WO 2012/109162 описан гHDL, содержащий АроА-I, сфингомиелин (SM) и фосфатидилглицерин (например, 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-[фосфо-рац-(1-глицерин)] (DPPG)).

Для составов гHDL подходящей является лиофилизация (сушка вымораживанием) перед использованием. Лيوфилизация представляет собой широко используемый способ получения твердого фармацевтического средства на основе белка. Однако такой способ влечет за собой различные стрессовые факторы, связанные с замораживанием и сушкой, такие как концентрирование солиобилизованного белка, образование кристалликов льда, изменения pH и т.д. Все эти стрессовые факторы могут вызывать денатурацию белков в различной степени. Таким образом, в белковых составах, как правило, необходимыми являются стабилизаторы для сохранения стабильности белка во время процессов вымораживания и сушки. Для сохранения стабильности составов гHDL во время лиофилизации использовали стабилизаторы, такие как сахара и сахарные спирты. Например, в US 508 9602 раскрыты выделяемые из плазмы липопротеины, которые стабилизируют 10% сахарозой или смесью 10% сахарозы и 5% маннита. В WO 2012/000048 раскрыты стабилизаторы на основе сахара и сахарного спирта, используемые в концентрации приблизительно от 65 до 85 г/л состава гHDL (эквивалентной приблизительно от 6,5 до 8,5% масс./масс.). В WO 2012/109162 раскрыты сахароза и маннит как стабилизаторы, используемые в смеси при 4% масс./масс. и 2% масс./масс. соответственно. Kim et al., Biotechnology and Bioprocess Engineering 16, 785-792 (2011) проводили исследование стабильности гHDL при получении и хранении. В этом исследовании гHDL с АроА-I:PC из соевых бобов в соотношении 1:150 не удалось в достаточной степени стабилизировать 1% или 5% сахарозой, тогда как 10% сахароза была описана как оптимальная.

Составы rHDL этих документов предназначены для инфузионной терапии, но высокие концентрации сахара в продуктах для инфузий могут вызывать или усугублять проблемы с почками. Это является конкретной проблемой в целевой популяции пациентов для rHDL, т.к. такие пациенты, как правило, имеют нарушенную функцию почек.

Таким образом, целью настоящего изобретения являлось предоставление альтернативных или улучшенных составов rHDL по сравнению с такими предшествующими составами. В частности, авторы изобретения пытались найти стабильные составы rHDL с пониженной почечной токсичностью.

Состав по п.1 решает эту проблему. Дополнительные предпочтительные варианты осуществления определены в зависимых пунктах формулы изобретения.

Неожиданно было выявлено, что состав rHDL по п.1 обладает хорошей долгосрочной стабильностью. В результате содержание меньшего количества стабилизатора лиофилизации по сравнению с предшествующими составами, состав также характеризуется меньшим риском почечной токсичности. Низкая концентрация стабилизатора лиофилизации также может обеспечивать возможность того, что rHDL действует лучше в функциональных анализах функции rHDL. Авторы изобретения также выявили, что аминокислоты, в частности пролин, являются пригодными стабилизаторами лиофилизации для составов rHDL.

Сущность изобретения

Изобретение относится к составу rHDL, содержащему аполипопротеин, липид и стабилизатор лиофилизации, где отношение аполипопротеина к липиду составляет от приблизительно 1:20 до приблизительно 1:120 (моль:моль).

Предпочтительно, стабилизатор лиофилизации содержится в концентрации от приблизительно 1,0% до приблизительно 6,0% (масс./масс. состава rHDL), например, от 1,0, 1,1, 1,2 или 1,3 до 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или 6,0. Такое небольшое количество стабилизатора лиофилизации может снижать риск почечной токсичности. Она также является особенно подходящей для пациентов, получающих контрастные средства во время терапии острого коронарного синдрома (ACS), т.к. эти средства могут конкурировать со стабилизатором лиофилизации за клиренс в почках. В

предпочтительном варианте осуществления стабилизатор лиофилизации содержится в концентрации приблизительно от 1,0% до менее 6,0% например, приблизительно от 1,0% до 5,9%. Предпочтительно, стабилизатор лиофилизации содержится в концентрации приблизительно от 3,0 до менее 6,0%, например, приблизительно от 3,0 до 5,9%. Более предпочтительно, стабилизатор лиофилизации содержится в концентрации

приблизительно от 4,0 до 5,5%, в частности от 4,3 до 5,3%, более конкретно от 4,3 до 5,0% и наиболее предпочтительно от 4,6 до 4,8% (масс./масс.). Такие составы обладают хорошей стабильностью и низкой почечной токсичностью.

Альтернативно или кроме того, предпочтительно, чтобы отношение аполипопротеина к стабилизатору лиофилизации составляло от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3 (масс./масс.). В частности, отношение аполипопротеина к стабилизатору лиофилизации составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2,4 (масс./масс.), например, менее 1:2 (масс./масс.). Авторы изобретения обнаружили, что такие составы остаются стабильными, проявляя незначительные изменения или их отсутствие в распределении размера лиофилизированных образцов даже после хранения в течение нескольких месяцев. Однако в некоторых вариантах осуществления отношение аполипопротеина к стабилизатору лиофилизации может составлять менее чем, например, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:7, и в частности от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5 (масс./масс.).

Изобретение также относится к составу rHDL, содержащему аполипопротеин, липид и стабилизатор лиофилизации, где стабилизатор лиофилизации содержит аминокислоту. Предпочтительно аминокислота представляет собой пролин. Авторы изобретения обнаружили, что аминокислоты являются хорошими стабилизаторами лиофилизации для составов rHDL, в частности, когда находятся в смеси с небольшими количествами других стабилизаторов.

Изобретение также относится к указанному выше составу rHDL для предотвращения или лечения заболевания, нарушения или состояния у человека. Соответственно, заболевание, нарушение или состояние реагирует на профилактическое или терапевтическое введение состава rHDL.

Подробное описание изобретения

В контексте настоящего изобретения термин "восстанавливаемый состав HDL (rHDL)" означает любой искусственно получаемый состав липопротеина или композицию, которая является функционально сходной, аналогичной, соответствует или имитирует липопротеин высокой плотности (HDL), как правило, содержащийся в плазме крови. Составы rHDL включают в свой объем "миметики HDL" и "синтетические частицы HDL".

В контексте настоящего изобретения термин "стабилизатор лиофилизации" означает вещество, которое стабилизирует белок во время лиофилизации. Такие стабилизаторы лиофилизации хорошо известны в данной области и описаны, например, у Wang (2000), International Journal of Pharmaceuticals, 203:1-60. Предпочтительный стабилизатор лиофилизации для применения в изобретении содержит сахар, сахарный спирт, аминокислоту или их смесь. Например, авторы изобретения обнаружили, что дисахариды, такие как сахароза, являются особенно подходящими сахарами для применения в качестве стабилизатора лиофилизации. Другие дисахариды, которые можно использовать, включают фруктозу, трегалозу, мальтозу и лактозу. В дополнение к дисахаридам можно использовать трисахариды, такие как раффиноза и мальтотриоза. Также подходящими могут являться более крупные олигосахариды, например, мальтопентаоза, мальтогексаоза и мальтогептаоза. Альтернативно, можно использовать моносахариды, такие как глюкоза, манноза и галактоза. Эти моно-, ди-, три- и более крупные олигосахариды можно использовать отдельно или в комбинации друг с другом. Как указано выше, также можно использовать стабилизаторы лиофилизации, которые представляют собой сахарные спирты. Такие сахарные спирты также можно использовать отдельно или в комбинации. Конкретный сахарный спирт для применения в изобретении представляет собой маннит. Другие сахарные спирты, которые можно использовать, включают инозитол, ксилит, галактит и сорбит. Также подходящими могут являться другие полиолы, такие как глицерин. Аминокислоты, которые можно использовать в качестве стабилизаторов лиофилизации, включают пролин, глицин, серин, аланин и лизин. Также можно использовать модифицированные аминокислоты, например, 4-гидроксипролин, L-серин, глутамат натрия, саркозин и γ -аминомасляную кислоту. Авторы изобретения обнаружили, что пролин является особенно подходящей аминокислотой для применения в качестве стабилизатора лиофилизации.

В конкретных вариантах осуществления стабилизатор лиофилизации содержит смесь сахара и сахарного спирта. Например, можно использовать смесь сахарозы и маннита. Сахар и сахарный спирт можно смешивать в любом подходящем соотношении, например, от приблизительно 1:1 (масс./масс.) до приблизительно 3:1 (масс./масс.) и, в частности, приблизительно 2:1 (масс./масс.). В частности, предусматривают соотношения менее 2:1, например, менее 3:2. Как правило, соотношение является более 1:5, например, более 1:2 (масс./масс.). В некоторых вариантах осуществления состав содержит менее

4% сахарозы и 2% маннита (масс./масс., состава gHDL), например, 3% сахарозы и 2% маннита. В некоторых вариантах осуществления состав содержит 4% сахарозы и менее 2% маннита. В некоторых вариантах осуществления состав содержит менее 4% сахарозы и менее 2% маннита, например, приблизительно от 1,0% до 3,9% сахарозы и

5 приблизительно от 1,0% до 1,9% (масс./масс.) маннита.

В конкретных вариантах осуществления стабилизатор лиофилизации содержит смесь сахара и аминокислоты. Например, можно использовать смесь сахарозы и пролина. Сахар и аминокислоту можно смешивать в любом подходящем соотношении, например,

10 приблизительно 2:1 (масс./масс.). В частности предусматривают соотношения менее 2:1, например, менее 3:2 (масс./масс.). Как правило, соотношение составляет более 1:5, например, более 1:2 (масс./масс.). Предпочтительно, аминокислота содержится в концентрации от приблизительно 1,0 до приблизительно 2,5% например, от 1,0, 1,2 или 1,3 до 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4 или 2,5% (масс./масс. состава gHDL). В некоторых вариантах

15 осуществления состав содержит 1,0% сахарозы и 2,2% пролина, или 3,0% сахарозы и 1,5% пролина, или 4% сахарозы и 1,2% пролина. Для поддержания изотонического раствора к сахару можно добавлять аминокислоту. Растворы с осмолярностью более 350 мосмоль/кг, как правило, являются гипертоническими, тогда как растворы с менее 250 мосмоль/кг, как правило, являются гипотоническими. Растворы с осмолярностью

20 от 250 мосмоль/кг до 350 мосмоль/кг, как правило, являются изотоническими.

В конкретных вариантах осуществления стабилизатор лиофилизации содержит смесь сахарного спирта и аминокислоты. Стабилизатор лиофилизации может содержать смесь сахара, сахарного спирта и аминокислоты.

Аполипопротеин может представлять собой любой аполипопротеин, который

25 является функциональным биологически активным компонентом природного HDL или восстанавливаемого липопротеина высокой плотности/gHDL. Как правило, аполипопротеин представляет собой выделяемый из плазмы или рекомбинантный аполипопротеин, такой как ApoA-I, ApoA-II, Apo A-V, рго-ApoA-I или вариант, такой как ApoA-I Milano. Предпочтительно аполипопротеин представляет собой ApoA-1.

30 Более предпочтительно, ApoA-I получают рекомбинантно, как содержащий последовательность дикого типа или последовательность Milano, или, альтернативно, его выделяют из плазмы человека. Аполипопротеин может находиться в форме биологически активного фрагмента аполипопротеина. Такие фрагменты могут быть природными, химически синтезированными или рекомбинантными. Только в качестве

35 примера, биологически активный фрагмент ApoA-I предпочтительно обладает по меньшей мере от 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% до 100% или даже более 100% стимулирующей активностью лецитинхолестеринацилтрансферазы (LCAT) ApoA-I.

В настоящем изобретении молярное соотношение аполипопротеин:липид, как правило, составляет от приблизительно 1:20 до приблизительно 1:120 и предпочтительно

40 от приблизительно 1:20 до приблизительно 1:100, более предпочтительно от приблизительно 1:20 до приблизительно 1:75 (моль: моль) и в частности от 1:45 до 1:65. Этот диапазон включает молярные соотношения, такие как приблизительно 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95 и 1:100. Особенно предпочтительное соотношение аполипопротеин:липид составляет от 1:40 до 1:65 (моль:

45 моль). Это обеспечивает то, что состав gHDL по настоящему изобретению содержит липид на уровне, который не вызывает печеночную токсичность.

В других вариантах осуществления молярное соотношение аполипопротеин:липид может находиться в диапазоне от приблизительно 1:80 до приблизительно 1:120.

Например, соотношение может составлять от 1:100 до 1:115 или от 1:105 до 1:110. В этих вариантах осуществления молярное соотношение может составлять, например, от 1:80 до 1:90, от 1:90 до 1:100 или от 1:100 до 1:110. В предпочтительном варианте осуществления состав rHDL по настоящему изобретению дополнительно содержит

5 детергент для дополнительной стабилизации частиц HDL. Детергент может представлять собой любой ионный (например, катионный, анионный, цвиттерионный) детергент или неионный детергент, включая желчные кислоты и их соли, пригодный для использования в составах rHDL. Ионные детергенты могут включать желчные кислоты и их соли, полисорбаты (например, PS80), 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропан-

10 сульфонат (CHAPS), 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-2-гидрокси-1-пропансульфонат (CHAPSO), цетилтриметиламмонийбромид, лауроилсаркозин, трет-октилфенилпропансульфоновую кислоту и 4'-амино-7-бензамидотаурохолевую кислоту.

Желчные кислоты, как правило, представляют собой дигидроксилированные или тригидроксилированные стероиды с 24 атомами углерода, включая холевую кислоту,

15 дезоксихолевою кислоту, хенодезоксихолевою кислоту или урсодезоксихолевою кислоту. Предпочтительно, детергент представляет собой соль желчной кислоты, такую как соль холата, дезоксихолата, хенодезоксихолата или урсодезоксихолата. Особенно предпочтительный детергент представляет собой холат натрия. Концентрация детергента, в частности холата натрия, составляет предпочтительно от 0,3 до 1,5 мг/

20 мл. Концентрацию желчных кислот можно определять различными способами, включая колориметрический анализ (например, см. Lerch et. al., 1996, Vox Sang. 71:155-164; Sharma, 2012, Int. J. Pharm Biomed. 3(2), 28-34; и тестовый набор Gallsäuren и Gallsäuren-Stoppreagens (Trinity Biotech)). В некоторых вариантах осуществления изобретения состав rHDL содержит уровни холата от 0,5 до 1,5 мг/мл, как определяют колориметрическим

25 анализом, и стабилизатор лиофилизации в концентрации приблизительно от 4,0 до 5,5%, в частности от 4,3 до 5,3%, более конкретно от 4,3 до 5,0% и наиболее предпочтительно от 4,6 до 4,8% (масс./масс.). В конкретных вариантах осуществления стабилизатор лиофилизации представляет собой сахарозу. Такие составы демонстрируют хорошую стабильность и низкую почечную и печеночную токсичность.

30 Отношение аполипопротеина к стабилизатору лиофилизации, как правило, регулируют таким образом, чтобы это соотношение составляло от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:7 (масс./масс.). Более предпочтительно, соотношение составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3, в частности от приблизительно 1:1,1 до приблизительно 1:2. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления

35 соотношения составов rHDL составляют 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9 или 1:2 (масс./масс.). Однако предусматривают, что для конкретных вариантов осуществления, где представлены небольшие количества белка (например, <20 мг/мл), отношение аполипопротеина к стабилизатору лиофилизации может достигать

приблизительно до 1:7 (масс./масс.), например, приблизительно 1:4,5 (масс./масс.).

40 Соответственно, аполипопротеин содержится в концентрации от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/мл. Этот диапазон включает 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 и 50 мг/мл и любые диапазоны между этими количествами. Предпочтительно аполипопротеин содержится в концентрации приблизительно от 25 до 45 мг/мл. В других вариантах осуществления аполипопротеин может содержаться в концентрации

45 приблизительно от 5 до 20 мг/мл, например, приблизительно от 8 до 12 мг/мл.

Липид может представлять собой любой липид, который является функциональным биологически активным компонентом природного HDL или восстанавливаемого липопротеина высокой плотности (rHDL). Такие липиды включают фосфолипиды,

холестерин, сложные эфиры холестерина, жирные кислоты и/или триглицериды. Предпочтительно, липид представляет собой по меньшей мере один заряженный или незаряженный фосфолипид или их смесь.

В предпочтительном варианте осуществления состав rHDL по настоящему изобретению содержит комбинацию детергента и незаряженного фосфолипида. В альтернативном предпочтительном варианте осуществления состав rHDL содержит заряженный фосфолипид, но совершенно не содержит детергент. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления состав rHDL содержит заряженные и незаряженные липиды, а также детергент.

Как используют в настоящем описании "незаряженные фосфолипиды", также называемые нейтральными фосфолипидами, представляют собой фосфолипиды, которые имеют суммарный заряд приблизительно ноль при физиологическом pH. Незаряженные фосфолипиды могут представлять собой цвиттерионы, хотя известны другие типы суммарно нейтральных фосфолипидов, и их можно использовать. "Заряженные фосфолипиды" представляют собой фосфолипиды, которые имеют суммарный заряд при физиологическом pH. Заряженный фосфолипид может содержать один тип заряженного фосфолипида или смесь из двух или более различных, как правило, подобный заряженному фосфолипиду. В некоторых примерах заряженные фосфолипиды представляют собой отрицательно заряженные гликофосфолипиды.

Состав по настоящему изобретению также может содержать смесь различных липидов, таких как смесь из нескольких незаряженных липидов или из незаряженного липида и заряженного липида. Примеры фосфолипидов включают фосфатидилхолин (лецитин), фосфатидную кислоту, фосфатидилэтаноламин (цефалин), фосфатидилглицерин (PG), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилинозитол (PI) и сфингомиелин (SM) или их природные или синтетические производные. Природные производные включают яичный фосфатидилхолин, яичный фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин соевых бобов, гидрогенизированный фосфатидилхолин соевых бобов, фосфатидилглицерин соевых бобов, фосфатидилсерин головного мозга, сфинголипиды, сфингомиелин головного мозга, яичный сфингомиелин, галактоцереброзид, ганглиозиды, церебброзиды, цефалин, кардиолипин и дицетилфосфат. Синтетические производные включают дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дидеканоилфосфатидилхолин (DDPC), диэрукоилфосфатидилхолин (DEPC), димиристоилфосфатидилхолин (DLPC), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (PMPC), пальмитоилстеароилфосфатидилхолин (PSPC), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), дилауроилфосфатидилглицерин (DLPG), дистеароилфосфатидилглицерин (DSPG), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG), димиристоилфосфатидную кислоту (DMPA), дипальмитоилфосфатидную кислоту (DPPA), дистеароилфосфатидную кислоту (DSPA), дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), диолеоилфосфатидилсерин (DOPS), дипальмитоилсфингомиелин (DPSM) и дистеароилсфингомиелин (DSSM). Фосфолипид также может представлять собой производное или аналог любого из указанных выше фосфолипидов. Лучшие результаты можно получать с фосфатидилхолином. В другом варианте осуществления липиды в составе по настоящему изобретению представляют собой сфингомиелин и отрицательно заряженный фосфолипид, такой как фосфатидилглицерин (например, DPPG). Смесь сфингомиелина и фосфатидилглицерина (в частности DPPG) является конкретно предусмотренной для применения в изобретении. В этих вариантах осуществления сфингомиелин и фосфатидилглицерин могут содержаться в любом подходящем соотношении, например, от 90:10 до 99:1 (масс./

масс.), как правило, от 95:5 до 98:2 и наиболее предпочтительно, как правило, 97:3.

Состав по настоящему изобретению, как правило, содержит стабилизатор лиофилизации в концентрации от приблизительно 1,0% до приблизительно 6,0% например, от 1,0, 1,1, 1,2 или 1,3% до 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или 6,0%, предпочтительно
 5 приблизительно от 1,0% до менее 6,0%, например, приблизительно от 1,0% до 5,9% (масс./масс, состава rHDL). Предпочтительно, приблизительно от 3,0% до менее 6,0%, например, приблизительно от 3,0% до 5,9%, предпочтительно приблизительно от 4,0 до 5,9%, предпочтительно приблизительно от 4,0% до 5,5%, предпочтительно от 4,3 до 5,3%, предпочтительно от 4,3 до 5,0% и наиболее предпочтительно от 4,6 до 4,8% (масс./
 10 масс.), и в указанном составе отношение аполипопротеина к липиду составляет предпочтительно от приблизительно 1:20 до приблизительно 1:75, более предпочтительно от приблизительно 1:45 до приблизительно 1:65 (моль:моль).

Стабилизатор лиофилизации предпочтительно

представляет собой сахар (например, сахарозу), необязательно в комбинации с
 15 сахарным спиртом, таким как маннит или сорбит, или аминокислоту, такую как пролин.

В предпочтительном варианте осуществления рН состава rHDL по настоящему изобретению находится в диапазоне от 6 до 8, предпочтительно в диапазоне от 7 до 8. Даже более предпочтительно рН находится в диапазоне от 7,3 до 7,7.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения состав является
 20 лиофилизированным. Вследствие наличия стабилизатора лиофилизации, предпочтительно сахарозы, сахарозы и маннита или сахарозы и пролина, в сочетании с соотношением аполипопротеин:липид лиофилизация приводит к стабильному порошку с большим сроком хранения. Такой порошок можно восстанавливать, использовать непосредственно или после хранения в виде порошка или использовать после
 25 регидратации с образованием восстановленного состава липопротеинов высокой плотности.

Изобретение можно использовать для крупномасштабного производства восстанавливаемого липопротеина высокой плотности. Лيوфилизированный продукт можно получать для нефасованных препаратов, или, альтернативно, смешанный раствор
 30 белка/липид можно распределять в контейнеры меньшего размера (например, единицы однократной дозы) до лиофилизации, и такие единицы меньшего размера можно использовать в качестве стерильных стандартных лекарственных форм. Лيوфилизированный состав можно восстанавливать с получением раствора или суспензии комплекса белок-липид, который представляет собой восстанавливаемый
 35 липопротеин высокой плотности. Лيوфилизированный порошок подвергают регидратации водным раствором до подходящего объема. Предпочтительные водные растворы представляют собой воду для инъекции (WFI), забуференный фосфатом физиологический раствор или физиологический раствор. Смесь можно перемешивать для облегчения регидратации. Предпочтительно, этап восстановления проводят при
 40 комнатной температуре.

Специалисту в данной области хорошо известно, как получать раствор, содержащий липид и аполипопротеин, такой, как описано в W0 2012/000048.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу получения состава rHDL, включающему этап добавления стабилизатора лиофилизации
 45 к раствору, содержащему липид и аполипопротеин, до тех пор, пока не получают концентрацию от приблизительно 1,0% до приблизительно 6,0% (масс./масс. состава rHDL), например, от 1,0, 1,1, 1,2 или 1,3 до 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или 6,0. В предпочтительном варианте осуществления стабилизатор лиофилизации добавляют

до тех пор, пока не получают концентрацию приблизительно от 1,0% до менее 6,0%, например, приблизительно от 1,0% до 5,9%. Предпочтительно, стабилизатор лиофилизации добавляют до тех пор, пока не получают концентрацию приблизительно от 3,0 до менее 6,0%, например, приблизительно от 3,0 до 5,9%. Более предпочтительно, стабилизатор лиофилизации добавляют до тех пор, пока не получают концентрацию приблизительно от 4,0 до 5,5%, в частности от 4,3 до 5,3%, более конкретно от 4,3 до 5,0% и наиболее предпочтительно от 4,6 до 4,8% (масс./масс.). Раствор уже может содержать стабилизатор.

В предпочтительных вариантах осуществления раствор дополнительно содержит детергент, такой как холат натрия. В предпочтительном варианте осуществления состав rHDL получают посредством объединения ApoA-I, выделяемого из плазмы, с фосфатидилхолином (PC) в присутствии холата натрия и сахарозы в концентрации от приблизительно 1,0% до приблизительно 6,0%, предпочтительно приблизительно от 1,0% до менее 6,0% масс./масс. с получением дискообразных нековалентно связанных частиц (M_w приблизительно 144 кДа).

В конкретных вариантах осуществления состав rHDL состоит из ApoA-I (рекомбинантного или выделяемого из плазмы) и фосфатидилхолина, стабилизированного холатом и сахарозой, в концентрации от приблизительно 1,0% до приблизительно 6,0% масс./масс., предпочтительно приблизительно от 1,0% до менее 6,0%. В конкретных вариантах осуществления уровни холата составляют от приблизительно 0,5 до приблизительно 1,5 мг/мл. Предпочтительно рекомбинант ApoA-I содержит последовательность дикого типа или последовательность Milano (которая при экспрессии образует димеры).

Лиофилизированный состав rHDL по настоящему изобретению можно получать любым известным в данной области способом лиофилизации, включая, но не ограничиваясь ими, сушку вымораживанием, т.е. содержащий аполипопротеин/липид раствор подвергают вымораживанию с последующим выпариванием при пониженном давлении.

Лиофилизированные составы rHDL, которые предоставляют, могут сохранять по существу свои исходные характеристики стабильности в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 или более месяцев. Например, лиофилизированные составы rHDL, хранящиеся при 2-8°C или 25°C, как правило, могут сохранять по существу такое же распределение молекул по размеру, как измеряют ВЭЖХ-SEC при хранении в течение 6 месяцев или больше. Конкретные варианты осуществления состава rHDL могут являться стабильными и подходящими для коммерческого фармацевтического использования в течение по меньшей мере 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев, 36 месяцев или даже больше при хранении при 2-8°C и/или при комнатной температуре.

Состав rHDL по настоящему изобретению можно использовать для предотвращения или лечения заболевания, нарушения или состояния у человека. Соответственно, заболевание, нарушение или состояние реагирует на профилактическое или терапевтическое введение состава rHDL по настоящему изобретению. Примеры таких заболеваний, нарушений или состояний включают атеросклероз, сердечно-сосудистое заболевание (например, острый коронарный синдром (ACS), такой как стенокардия и инфаркт миокарда) или заболевания, нарушения или состояния, такие как диабет, который провоцирует ACS, гиперхолестеринемия (например, повышенный уровень холестерина в сыворотке или повышенный уровень холестерина LDL) и гипохолестеринемия, возникающая в результате пониженных уровней липопротеина высокой плотности (HDL), такая как являющаяся симптоматической танжерской

болезни.

Составы rHDL по настоящему изобретению можно вводить любым путем введения, известным в данной области. Предпочтительно, составы rHDL вводят парентерально, таким образом, как внутривенной (в/в) инфузией или инъекцией. В предпочтительных вариантах осуществления состав rHDL содержит ApoA-I (рекомбинантный или выделенный из плазмы), который восстанавливали из частиц, подходящих для в/в инфузии.

Вводимая доза состава rHDL может находиться в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 120 мг/кг масса тела. Предпочтительно доза находится в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 80 мг/кг, включая дозы 8 мг/кг, 10 мг/кг, 12 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг и 70 мг/кг. Альтернативно, доставку можно проводить путем фиксированных доз rHDL, т.е. в количестве, зависящем от массы тела пациента. Предпочтительные фиксированные дозы включают 0,1-15 г, 0,5-12 г, 1-10 г, 2-9 г, 3-8 г, 4-7 г или 5-6 г аполипопротеина. Особенно предпочтительные фиксированные дозы включают 1-2 г, 3-4 г, 5-6 г или 6-7 г аполипопротеина.

Неограничивающие примеры конкретных фиксированных доз включают 0,25 г, 0,5 г, 1,0 г, 1,7 г, 2,0 г, 3,4 г, 4,0 г, 5,1 г, 6,0 г, 6,8 г и 8,0 г аполипопротеина. Таким образом, флакон предпочтительно содержит лиофилизированный состав rHDL с содержанием белка 0,25 г, 0,5 г, 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 8 или 10 г на флакон. Более предпочтительно содержание белка составляет 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 или 10 г на флакон.

Изобретение также относится к набору аполипопротеин, содержащему одну или более стандартных доз состава аполипопротеина, описываемого в настоящем документе, и один или более других компонентов набора.

Соответственно, набор предназначен для профилактического или терапевтического лечения заболевания, нарушения или состояния у человека, как описано выше в настоящем описании.

Неограничивающие примеры одного или более других компонентов набора включают инструкции по использованию; флаконы, контейнеры или другие сосуды для хранения, где каждый содержит стандартные дозы; средства доставки, такие как иглы, катетеры, шприцы, трубки и т.п., и/или упаковку, подходящую для безопасного и подходящим образом хранения и/или транспортировки набора. Предпочтительно, инструкции по применению представляют собой этикетку или вкладыш в упаковку, где на этикетке или вкладыше в упаковку указано, что состав аполипопротеина можно использовать для лечения заболевания или состояния, такого как сердечно-сосудистое заболевание, путем введения количества фиксированной дозы являющемуся человеком индивидууму, нуждающемуся в этом.

"Вкладыш в упаковку" относится к инструкциям, содержащимся в коммерческих упаковках составов аполипопротеина, которые содержат информацию о показаниях, использовании, дозе, введении, противопоказаниях и/или предостережениях, касающихся использования таких составов аполипопротеина.

Для целей настоящего описания "флакон" относится к контейнеру, который содержит состав аполипопротеина. Флакон можно запечатывать пробкой, которую можно прокалывать шприцем. Как правило, флакон выполнен из стеклянного материала. Состав аполипопротеина во флаконе может находиться в различных состояниях, включая жидкое, лиофилизированное, замороженное и т.д. Фиксированная доза состава аполипопротеина предпочтительно является стабильной, поэтому предпочтительно измерять мутность. Как правило, уровень мутности ниже приблизительно 5, 10, 15, 20 или 30 NTU можно рассматривать как стабильный дозированный состав

аполипопротеина. Измерения мутности можно проводить посредством инкубации составов аполипопротеина в течение периодов времени, таких как 0 часов, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов, 72 часа, 7 суток и 14 суток, при температурах хранения, таких как комнатная температура или от 2 до 8°C.

- 5 Предпочтительно считают, что состав аполипопротеина является стабильным как жидкость, когда его хранят в течение 14 суток при комнатной температуре и выявляют мутность менее приблизительно 15 NTU.

Набор может облегчать введение состава аполипопротеина медицинским работником или самостоятельное введение пациентом или лицом, осуществляющим уход.

- 10 Как используют в настоящем описании, термин "содержащий" охватывает "включающий", а также "состоящий", например, состав или компонент состава, который описывают как "содержащий" X, состоять исключительно из X или может содержать некоторое дополнение, например, X+Y.

- 15 Термин "приблизительно" в отношении числовой величины x означает, например, $x \pm 10\%$.

Слово "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, которая "по существу не содержит" Y, может абсолютно не содержать Y. При необходимости слово "по существу" можно исключать из определения изобретения.

- 20 В случае, когда изобретение относится к способу, включающему многие последовательные этапы, изобретение также может относиться к способу, включающему меньше чем общее число этапов. Различные этапы можно проводить в очень различные моменты времени различными людьми в различных местах (например, в различных странах).

- 25 Если конкретно не указано, для способа, включающего этап смешивания двух или более компонентов, не требуется какого-либо конкретного порядка смешивания. Таким образом, компоненты можно смешивать в любом порядке. В случае если присутствует три компонента, то два компонента можно комбинировать друг с другом, а затем комбинацию можно комбинировать с третьим компонентом и т.д.

- 30 В настоящем описании описаны различные варианты осуществления изобретения. Следует понимать, что признаки, описываемые в каждом варианта осуществления, можно комбинировать с другими конкретными признаками с получением дополнительных вариантов осуществления. В частности, варианты осуществления, освещенные в настоящем описании как являющиеся подходящими, как правило или предпочтительно можно комбинировать друг с другом (за исключением случаев, когда
- 35 они являются взаимоисключающими).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: распределение по размеру молекул составов, содержащих от 5 до 10% масс./масс. сахарозы.

- 40 Фигура 2А: непосредственное сравнение распределения по размеру молекул составов, содержащих от 4 и 7,5% масс./масс. сахарозы.

Фигура 2 В: распределение по размеру молекул составов, содержащих 1, 2, 3, 4 и 7,5% (масс./масс.) сахарозы.

Фигура 2С: распределение по размеру молекул составов, содержащих сахарозу и пролин и 7,5% сахарозы.

- 45 Фигуры 3А и 3В: активность LCAT для составов с от 4 до 10% масс./масс. сахарозы.

Фигура 3С: активность LCAT для составов с 1, 2, 3, 4 и 7,5% масс./масс. сахарозы.

Фигура 3D: активность LCAT для составов, содержащих сахарозу и пролин.

Фигура 4А-4В: влияние концентрации сахарозы на истечение холестерина.

Фигура 4С: влияние составов, содержащих сахарозу и пролин, на истечение холестерина.

Фигуры 5А-5Н: мутность составов с различными концентрациями сахарозы и составов, содержащих сахарозу и пролин.

5 Фигура 6: изображение лиофилизатов с различной концентрацией сахарозы.

Фигура 7: изображение лиофилизатов с различными концентрациями сахарозы и сахарозы и пролина.

Примеры

Пример 1: Получение образцов

10 Для получения образцов для последующих экспериментов в буфере (10 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 10 mM TRIS, pH 8,0) растворяли холат натрия (New Zealand Pharmaceuticals) и перемешивали до получения чистого раствора. К соответствующему объему холата добавляли фосфатидилхолин соевых бобов (Phospholipid GmbH) и перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Раствор ApoA-I разбавляли до
15 концентрации белка 9,0 мг/мл (определяли по OD280) 10 mM NaCl и перемешивали с подходящим объемом раствора липида с получением отношения белка к липиду в диапазоне от 1:45 до 1:65. Смесь перемешивали при 2-8°C в течение от 30 минут до 16 часов. Миметики HDL получали диализом холата с использованием 1% сахарозы в качестве буфера для диалфильтрации. Элюат концентрировали до концентрации белка
20 от 33 до 38 г белок/л. Добавляли сахарозу с получением желаемой концентрации (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6,5%, 7%, 10% масс./масс.). pH раствора доводили 0,2 M NaOH до pH 7,50±0,1, после чего добавляли WFI (воду для инъекции) с получением концентрации белка 30 мг/мл. Затем конечные составы стерильно фильтровали через 0,2+0,1-мкм фильтр и фильтровали в 100-мл стеклянные флаконы по 1,7 г белка во флакон и
25 лиофилизировали.

В некоторые составы добавляли пролин до желаемой концентрации. Пролин поддерживает изотонический состав.

Пример 2. Распределение по размеру молекул.

Образование частиц определяли с использованием ВЭЖХ-SEC и оценивали по
30 распределению по размеру молекул различных составов. Эксклюзионную хроматографию (ВЭЖХ-СЕК) проводили на колонке Superose 6 HR 10/30 (GE Healthcare) с 140 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л фосфата Na, 0,02% NaN₃, pH 7,4 при скорости потока 0,5 мл/мин. Применяли образцы приблизительно 90 мкг белка и регистрировали профили элюирования при 280 нм.

35 Наблюдали небольшое различие для составов, содержащих 5-10% масс./масс. сахарозы в конечном составе (фигура 1), что свидетельствует о том, что составы, содержащие ≥5% масс./масс. сахарозы, не влияли на стабильность после восстановления. На фигуре 1 представлена полная хроматограмма (1) внутреннего контроля, 2: 5% масс./масс. сахарозы, 3: 6,5% масс./масс. сахарозы, 4: 7,5% масс./масс. сахарозы и 5:
40 10% масс./масс. сахарозы.

Кроме того, непосредственное сравнение состава с 7,5% масс./масс. сахарозы и состава с 4% масс./масс. сахарозы демонстрировало, что эти составы обладают аналогичным распределением по размеру молекул (фигура 2А).

На фигурах 2В и 2С представлены результаты для концентраций сахарозы 1, 2, 3 и
45 4% (масс./масс.) и составов, содержащих сахарозу и пролин.

Все тестируемые составы являются стабильными. Содержание сахарозы от 4 до 7,5% масс./масс. являлось оптимальным и не оказывало влияния на стабильность частиц после восстановления.

Пример 3. Активация LCAT.

Измерение эффективности частиц гHDL в различных составах определяли измерением активности LCAT. Частицы HDL способны связывать холестерин из бляшек, образуемых вдоль стенок артерий или клеток посредством взаимодействия с АТФ-связывающим кассетным транспортером А1 (ABCA1). Лецитинхолестеринацилтрансфераза (LCAT), фермент плазмы, преобразует свободный холестерин в холестерилловый эфир (более гидрофобную форму холестерина), который затем изолируется в ядре частицы HDL перед транспортировкой в печень, чтобы метаболизироваться. Если содержание сахарозы в конечном составе оказывала влияние на эффективность частицы гHDL, активность LCAT снижается.

Активность этерификации лецитинхолестеринацилтрансферазы (LCAT) оценивали, как описано Stokke and Norum (Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1971; 27(1):21-7). 150 мкл объединенной плазмы человека (CSL Behring) инкубировали с 10 мкл образца гHDL и 150 мкл PBS в присутствии 20 мкл [4-14C]холестерина (7,5 мКи/мл) в течение 1,5 час при 4°C. Для инициации этерификации холестерина половину реакционной смеси помещали при 37°C в течение 30 минут, в то время как другую половину дополнительно инкубировали при 4°C в течение 30 минут (для определения фона шума). Для обоих образцов холестерин и холестерилловый эфир экстрагируют экстрагированием жидкости жидкостью с использованием н-гексана. Холестерилловый эфир отделяли от неэтерифицированного холестерина с использованием колонки для твердофазной экстракции (SampliQ Амино, Agilent) и измеряли посредством сцинтилляционного счета. Скорость счета образца, хранящегося при 4°C, вычитали из скорости счета образца, хранящегося при 37°C. Аналогичную процедуру также проводили с эталонным образцом. Активность LCAT выражают как % от эталонного образца.

На фигурах 3А и 3В представлена активность LCAT для составов с 4-10% масс./масс. сахарозы. На фигуре 3С представлена активность LCAT для составов с 1-4% масс./масс. сахарозы. Очень небольшое различие можно наблюдать в активности LCAT, когда сахароза содержится в диапазоне 5-10% масс./масс. в конечном составе (фигура 3А), однако незначительная тенденция к понижению становится очевидной, когда сахарозу дополнительно снижают до 4% масс./масс. (фигура 3В). На фигуре 3D представлена активность LCAT для составов, содержащих сахарозу и пролин. Не наблюдают выявляемую тенденцию в активности LCAT для составов, содержащих сахарозу и пролин. Таким образом, сохраняется эффективность частицы HDL в составах сахарозы/пролина.

Пример 4. Истечение холестерина

Обратный транспорт холестерина (RCT) представляет собой путь, по которому накапливаемый холестерин транспортируется из сосудистой стенки в печень для экскреции. Клетки выводят свободный холестерин на АроА-I с низким содержанием липида через путь ABCA1. В анализе истечения холестерина измеряют способность HDL акцептировать холестерин, выделяемый клетками. Предполагают, что содержание сахарозы оказывает влияние на образование и/или целостность частиц, различия влияют на истечение холестерина.

Истечение холестерина из линий клеток макрофагов мыши J774 и RAW 264.7 в значительной степени реагирует на стимуляцию цАМФ, которая приводит к активации ABCA1 (Bortnick et. al., J Biol Chem., 2000; 275(37):28634-40). Клетки RAW264.7 получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки культивировали в DMEM (модифицированной Дульбекко среде Игла, Gibco) с добавлением 10% (об./об.) эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, Gibco), 2 mM глутамина, 100 единиц/мл

пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в увлажненном инкубаторе CO₂ при 37°C. Для экспериментов истечения клетки высевали в 24-луночные планшеты при плотности 0,35×10⁶ клеток на лунку. На следующие сутки клетки метили [1,2-³H]холестерином (1 мкКи/мл, GE) в DMEM с добавлением 5% (об./об.) FCS. После периода мечения в течение 36 часов клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), а затем инкубировали в DMEM, содержащей 0,2% бычьего сывороточного альбумина (BSA), не содержащего жирных кислот, в отсутствие или присутствии 0,3 мМ 8-бромаденозин-3',5'-циклической монофосфатной натриевой соли-цАМФ (8Br-цАМФ) в течение 16 часов для активации ABCA1. После двух промываний PBS клетки инкубировали с различными акцепторами холестерина в среде DMEM/0,2% не содержащего жирных кислот BSA. Через 5-6 часов после инкубации планшеты центрифугировали при 500g в течение 10 минут для удаления любых плавающих клеток и клеточного дебриса. Радиоактивность в клеточных супернатантах измеряли путем подсчета импульсов в жидкой фазе. Общий

ассоциированный с клетками [³H]холестерин определяли после экстракции клеток в контрольных лунках 0,1 М Triton X-100 в течение по меньшей мере 30 минут. Истечение холестерина выражали в виде процента радиоактивности, выделяемой клетками в среду, относительно общей радиоактивности в клетках и среде. Разницу истечения между контролем и стимулированными 8 Br-цАМФ клетками принимали за величину ABCA1-зависимого истечения.

На фигурах 4А и 4В продемонстрировано, что по мере снижения концентрации сахарозы от 7,5% масс./масс. до 4% масс./масс. истечение холестерина увеличивалось. Не наблюдали видимого различия истечения холестерина между содержащими пролин составами и составом с 7,5% сахарозой (фигура 4С).

Пример 5. Мутность.

Термин мутность используют для описания непрозрачности или замутненности в растворе. В узком смысле мутность возникает в результате явления множественного рассеяния видимого света элементами, содержащимися в растворе. Вследствие того, что мутность является результатом суммарного рассеянного света, она зависит от длины оптического пути в образце, концентрации белка и размера белка/агрегатов/частиц. При условии, что все составы с пониженным содержанием сахарозы содержали одинаковую концентрацию белка после восстановления и их измеряли при одинаковой длине оптического пути, различия в мутности могут быть связаны с различиями размера и/или числа белка/агрегатов/частиц, обусловленного различными составами сахарозы.

Мутность определяли нефелометром LED (Nach 2100AN Turbidimeter, Loveland, CO.) с использованием формазина в качестве стандарта. Результаты приводят в виде относительного светорассеяния (NTU).

Из составов, содержащих 4-10% масс./масс. сахарозы, после восстановления получали аналогичные мутные растворы (фигуры 5А и 5В). Концентрации сахарозы менее 4% демонстрировали увеличенную мутность (фигуры 5Е и 5G). На основании мутности сахарозы концентрации 4% (масс./масс.) и выше являются оптимальными.

Относительные увеличения мутности раствора после хранения, как правило, приводят как показатель агрегации в биофармацевтических препаратах на основе белков. На фигурах 5С, 5D, 5F и 5H продемонстрировано, что при хранении в жидкой форме наблюдают незначительное увеличение мутности или ее отсутствие, что, таким образом, свидетельствует о стабильности частиц.

Пример 6. Внешний вид лиофилизата.

С составами сахарозы с 4% масс./масс. и 7,5% масс./масс. сахарозы получали наиболее

стабильные лиофилизаты (фигура 6).

С составами с сахарозой с 1-4% масс./масс. и составами, содержащими сахарозу и пролин, также получали стабильные лиофилизаты (фигура 7).

Пример 7. Стабильность составов rHDL.

Анализировали стабильность лиофилизированных составов rHDL (получаемых в соответствии с примером 1) до и после хранения (в защищенных от света условиях) при 40°C в течение 12 недель. Тестируемые параметры включали pH, мутность, активацию LCAT, ВЭЖХ-SEC (содержание агрегатов, % липопротеина в одном пике и его относительное время удержания) и истечение холестерина (С-истечение) (таблицы 1 и 2). Результаты свидетельствуют о том, что составы остаются стабильными в течение периода хранения.

Таблица 1

1385.E009, 09- 13/40°C	t=0					t=12 недель				
	1% сахара- розы	2% сахара- розы	3% сахара- розы	4% сахара- розы	7,5% сахара- розы	1% сахара- розы	2% сахара- розы	3% сахара- розы	4% сахара- розы	7,5% сахара- розы
Мутность	12,4	10,4	8,63	6,87	6,06	13,7	11,1	7,24	5,41	5,16
Активация LCAT	97	102	104	110	111	94	101	100	98	105
ВЭЖХ-SEC - агрегаты	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
ВЭЖХ-SEC - пик липопротеина	98,8	99,2	99,5	99,6	99,6	99,3	99,7	99,6	99,6	99,6
С-истечение (общее истечение)	110	95	103	119	102	109	85	114	116	84

Таблица 2

1385.E009, 14-	t=0	t=12 недель
----------------	-----	-------------

16/40°C	1%	3%	4%	1%	3%	4%
	сахарозы/ 2,2% пролина	сахарозы/ 1,5% пролина	сахарозы/ 1,2% пролина	сахарозы/ 2,2% пролина	сахарозы/ 1,5% пролина	сахарозы/ 1,2% пролина
Мутность	8,20	8,48	7,48	8,74	6,14	6,12
Активация LCAT	104	116	109	95	103	99
ВЭЖХ-SEC - агрегаты	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
ВЭЖХ-SEC -пик липопротеина	98,6	99,4	99,5	99,2	99,5	99,7
C-истечение (общее истечение)	114	80	97	120	108	99

(57) Формула изобретения

1. Восстановленный состав липопротеинов высокой плотности (rHDL) для лечения
заболевания, нарушения или состояния у человека, выбранного из группы, состоящей
из сердечно-сосудистого заболевания, гиперхолестеринемии или гипохолестеринемии,
содержащий аполипопротеин, липид и стабилизатор лиофилизации, где отношение
аполипопротеина к липиду составляет от 1:20 до 1:120 моль:моль, и стабилизатор
лиофилизации представляет собой сахарозу и содержится в общей концентрации от
1,0% до менее 6,0% масс./масс. от состава rHDL и содержит сахарозу.

2. Состав rHDL по п. 1, где отношение аполипопротеина к стабилизатору
лиофилизации составляет от 1:1 масс./масс. до 1:3 масс./масс.

3. Состав rHDL по п.1, где стабилизатор лиофилизации содержится в концентрации
от 4,0 до 5,5% масс./масс.

4. Состав rHDL по п.1, где состав дополнительно содержит детергент.

5. Состав rHDL по п. 4, где детергент содержит холат натрия.

6. Состав rHDL по п.1, где отношение аполипопротеина к липиду составляет от 1:20
до 1:100 моль:моль.

7. Состав rHDL по п.1, где концентрация аполипопротеина составляет от 5 до 50 мг/
мл.

8. Состав rHDL по п.1, где аполипопротеин содержит аполипопротеин A-I (ApoA-I).

9. Состав rHDL по п. 8, где ApoA-I выбран из группы, состоящей из ApoA-I
выделенного из плазмы и рекомбинантного ApoA-I.

10. Состав rHDL по п. 9, где ApoA-I содержит последовательность дикого типа или
Milano.

11. Состав rHDL по п.1, где липид содержит, по меньшей мере, один заряженный или
незаряженный фосфолипид или их смесь.

12. Состав rHDL по п.11, где липид содержит фосфатидилхолин.

13. Состав rHDL по п.1, где аполипопротеин представляет собой ApoA-I, выделяемый из плазмы, липид представляет собой фосфатидилхолин, стабилизатор лиофилизации представляет собой сахарозу, и состав дополнительно содержит детергент на основе холата натрия.

5 14. Состав rHDL по п. 13, где отношение аполипопротеина к липиду составляет от 1:45 до 1:65 моль:моль, стабилизатор лиофилизации содержится в концентрации от 4,6 до 4,8% масс./масс., и холат натрия содержится в концентрации от 0,5 до 1,5 мг/мл.

15. Состав rHDL по п.1, где pH состава находится в диапазоне от 6 до 8.

16. Состав rHDL по п.1, где состав является лиофилизированным.

10 17. Состав rHDL по п.1, где состав пригоден для парентерального введения.

18. Состав rHDL по п.1, где состав пригоден для внутривенного введения.

19. Состав rHDL по п. 1, где отношение аполипопротеина к стабилизатору лиофилизации составляет от 1:1 масс./масс. до 1:2,4 масс./масс.

15 20. Состав rHDL по п. 19, где отношение аполипопротеина к стабилизатору лиофилизации составляет от 1:1 масс./масс. до менее чем 1:2 масс./масс.

21. Состав rHDL по п. 1, где стабилизатор лиофилизации содержится в концентрации от 4,3 до 5,3% масс./масс.

22. Состав rHDL по п. 21, где стабилизатор лиофилизации содержится в концентрации от 4,6 до 4,8% масс./масс.

20 23. Состав rHDL по п. 1, где заболевание, нарушение или состояние выбрано из группы, состоящей из острого коронарного синдрома (ACS), атеросклероза, стенокардии и инфаркта миокарда.

24. Способ получения состава rHDL, включающий объединение аполипопротеина, липида и стабилизатора лиофилизации, который представляет собой сахарозу, таким
25 образом, чтобы отношение аполипопротеина к липиду составляло от 1:20 до 1:120 моль:моль, и где стабилизатор лиофилизации присутствовал в общей концентрации от 1,0% до менее 6,0% масс./масс. от состава rHDL.

30

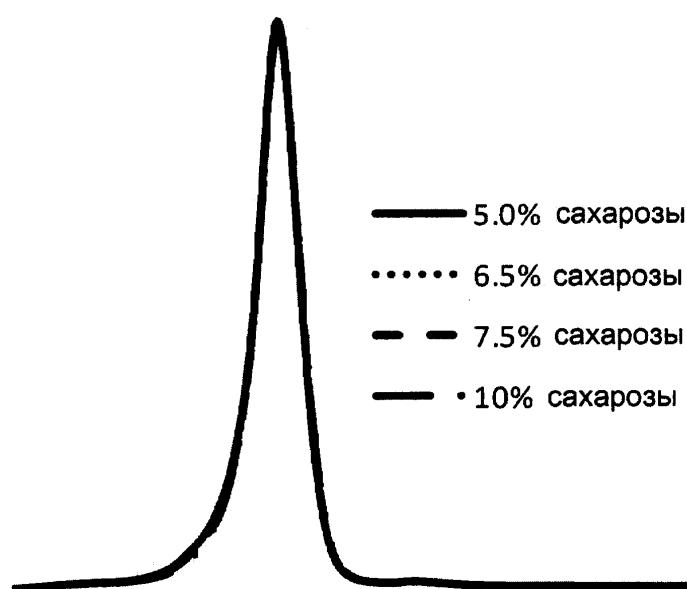
35

40

45

1

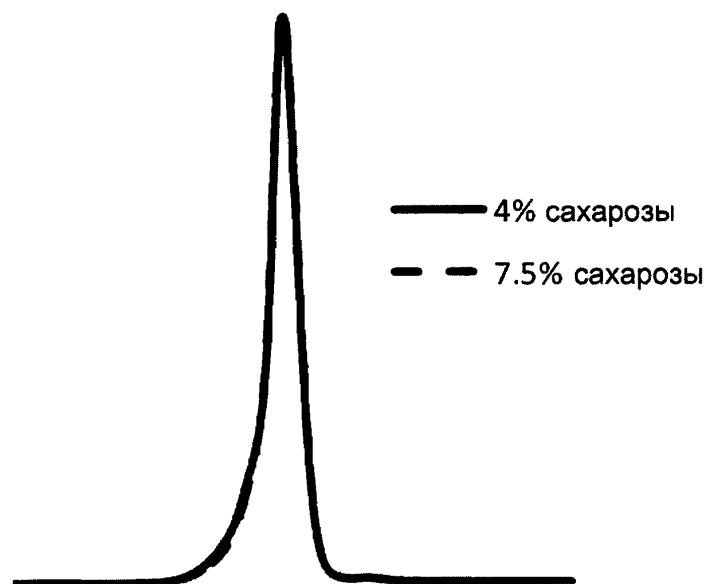
1/13



Фиг.1

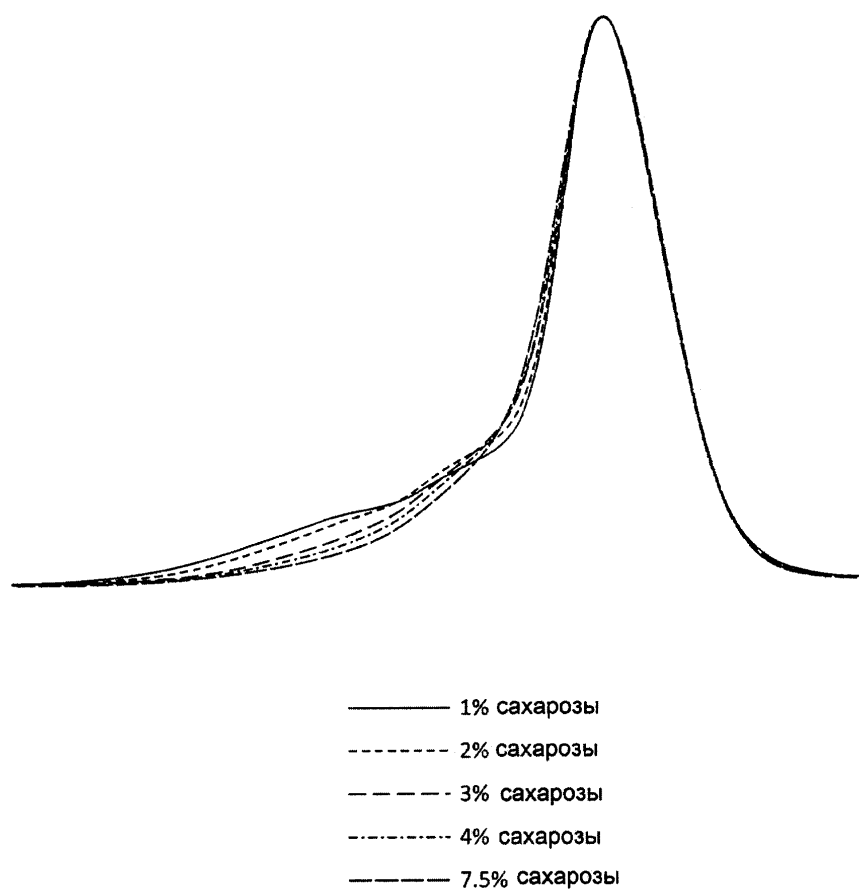
2

2/13



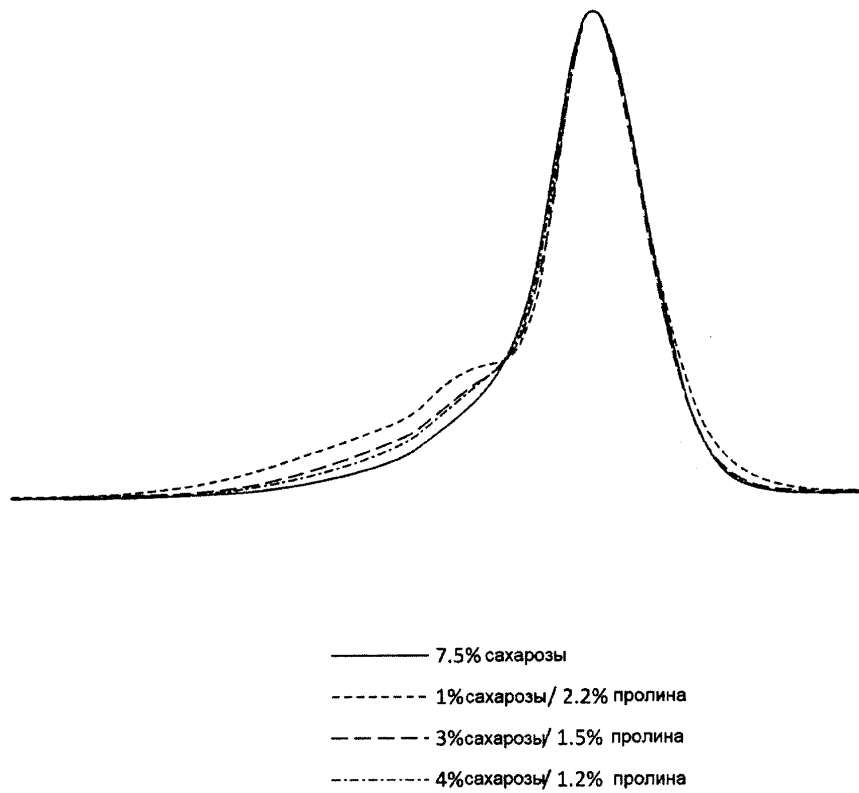
Фиг.2А

3/13



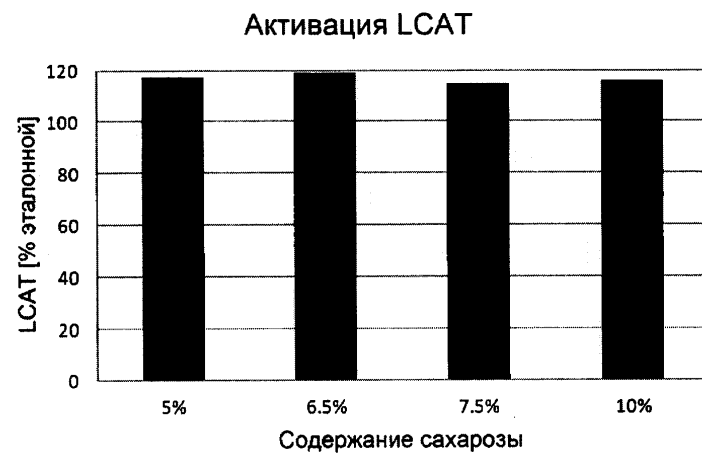
Фиг.2В

4/13

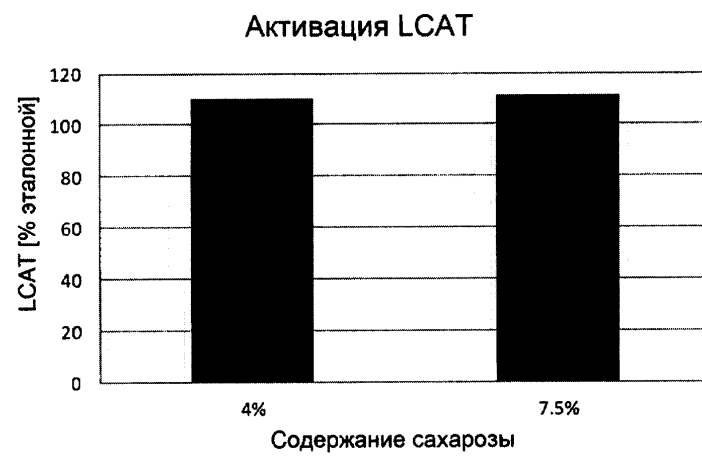


Фиг.2С

5/13

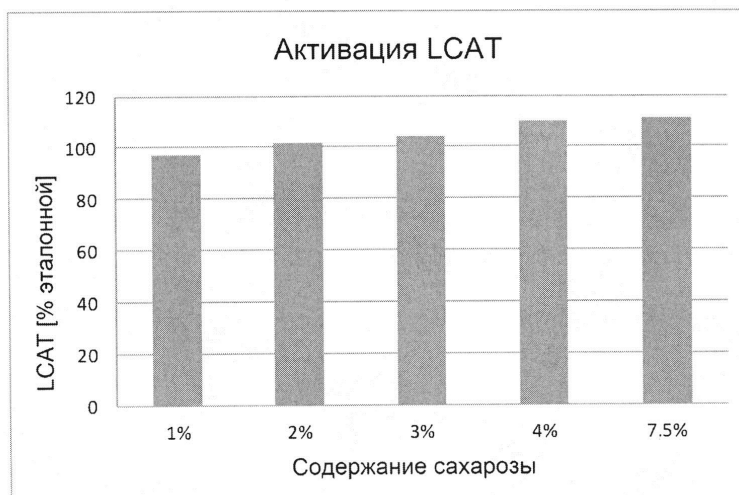


Фиг.3А

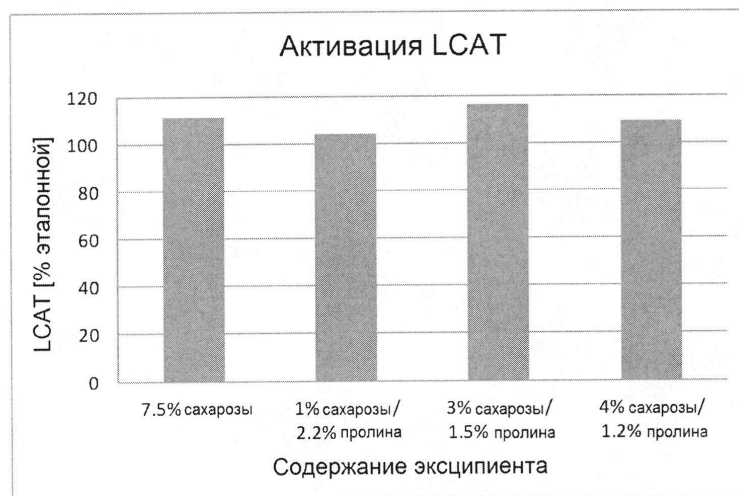


Фиг.3В

6/13

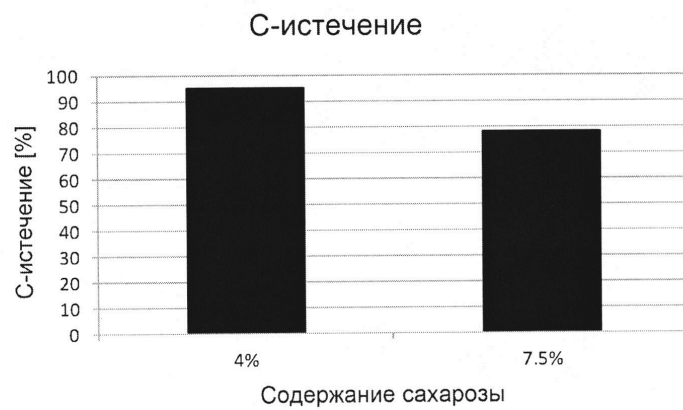


Фиг.3С



Фиг.3D

7/13

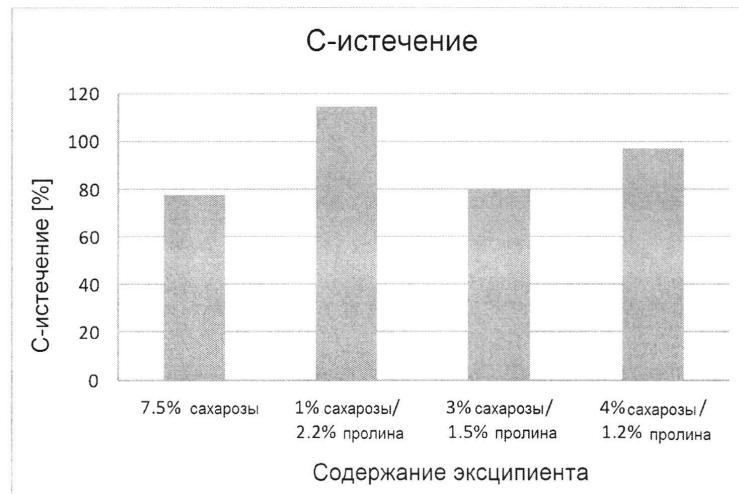


Фиг.4А



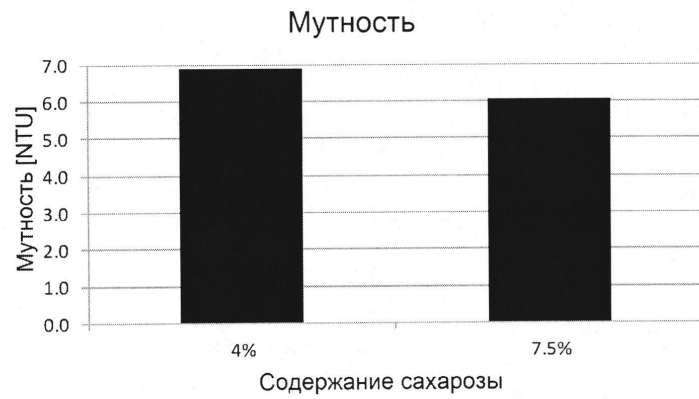
Фиг.4В

8/13

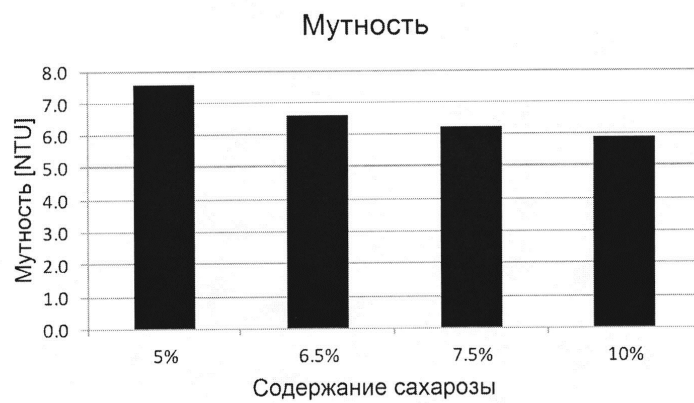


Фиг.4С

9/13

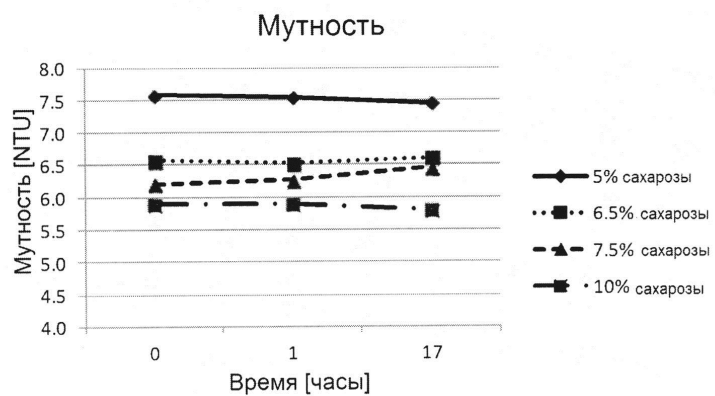


Фиг.5А



Фиг.5В

10/13

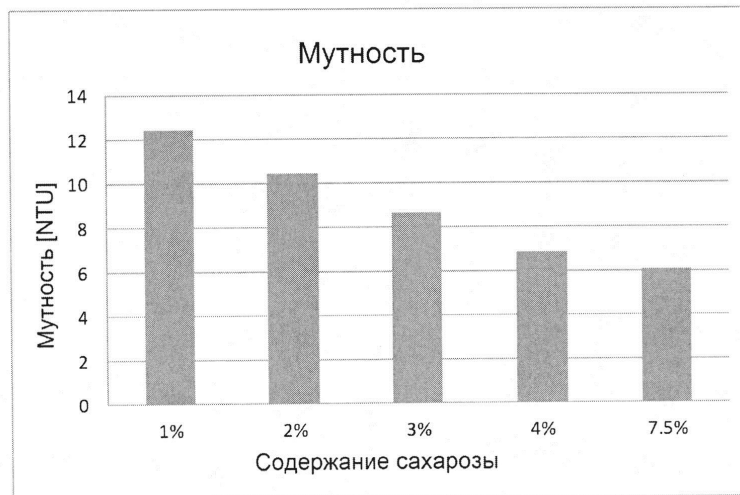


Фиг.5С

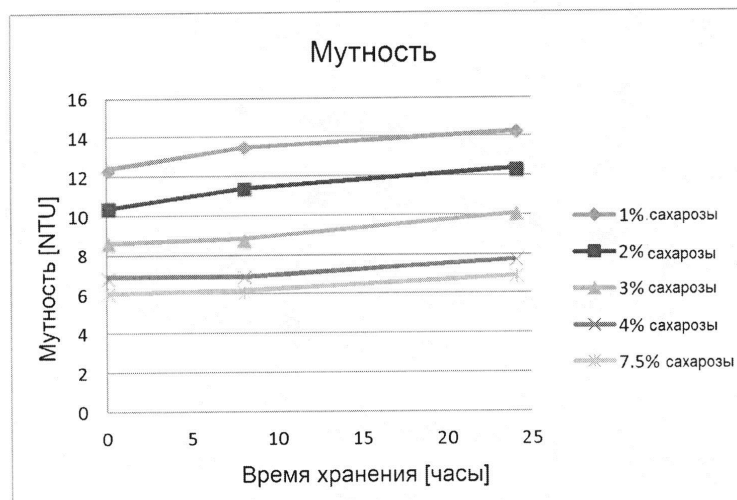


Фиг.5D

11/13



Фиг.5Е

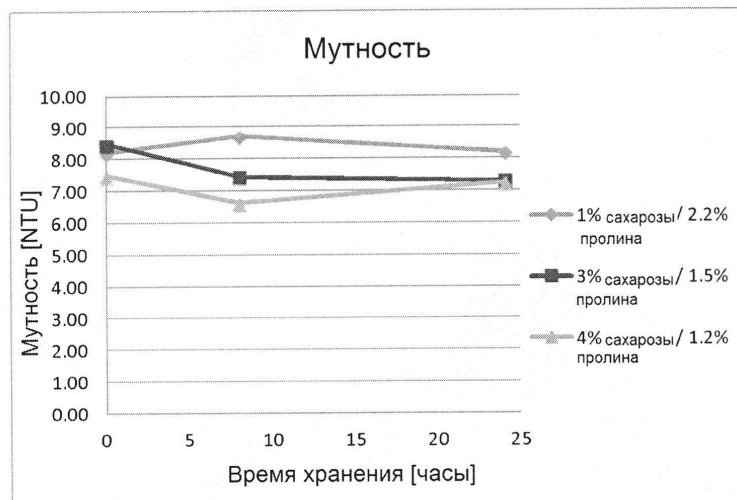


Фиг.5F

12/13

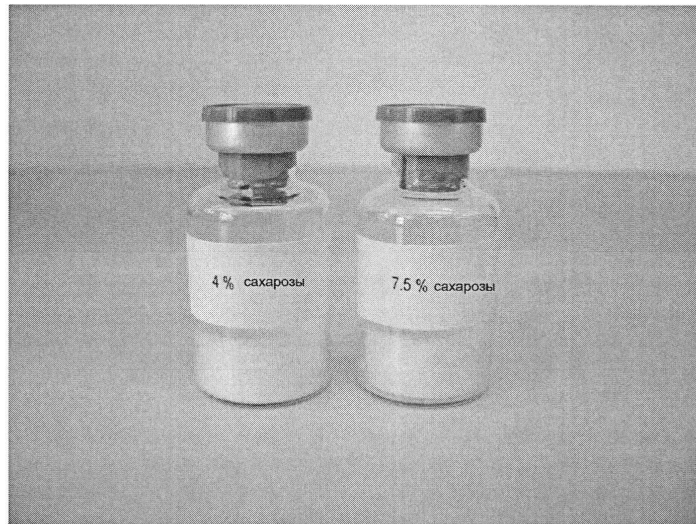


Фиг.5G

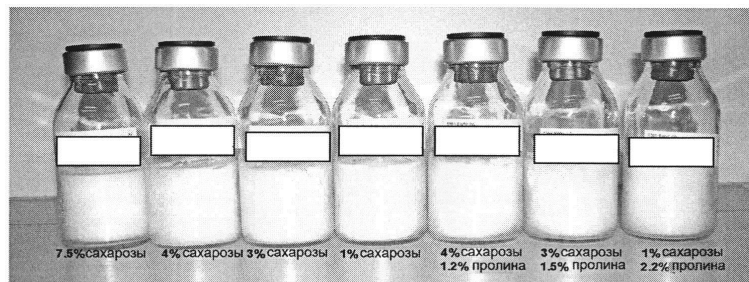


Фиг.5H

13/13



Фиг.6



Фиг.7