

(11) *Número de Publicação:* **PT 725629 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K009/127 A A61K038/17 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) *Data de depósito:* 1994.10.25

(73) *Titular(es):*

THE LIPOSOME COMPANY, INC.
ONE RESEARCH WAY, PRINCETON FORRESTAL C. PRINCETON
NEW JERSEY 08540 US

(30) *Prioridade:* 1993.10.25 US 142691

(43) *Data de publicação do pedido:*
1996.08.14

(72) *Inventor(es):*

ANDREW S. JANOFF US
WALTER PERKINS US
IMRAN AHMAD US

(45) *Data e BPI da concessão:*
2000.05.24

(74) *Mandatário(s):*

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* DEFENSINAS EM LIPOSSOMAS

(57) *Resumo:*





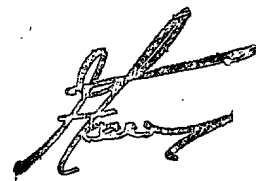
DESCRIÇÃO

"Defensinas em lipossomas"

Este trabalho foi realizado, em parte, com subvenção concedida por *National Institutes of Health* N.º AI31696-01. Em conformidade, o governo dos Estados Unidos da América tem alguns direitos sobre o invento.

Este pedido refere-se a formulações de defensinas em lipossomas e à sua utilização terapêutica. As defensinas são componentes de proteínas do sistema de defesa hospedeiro de um animal. Encontram-se nas células especializadas responsáveis pela destruição de micróbios e parasitas invasores, assim como de células anormais ou senescentes, num animal. Bactérias, tanto gram-positivas como gram-negativas, fungos, e parasitas estão sujeitos à acção de defensinas (ver, por exemplo, T. Ganz *et al.*, *Med. Microbiol. Immunol.* 181:99 (1992)). As defensinas também inactivam vírus. A este respeito, Daher *et al.* afirmaram (*J. Virol.* 60(3):1068 (1986)) que as defensinas humanas inactivaram vírus encapsulados tais como o vírus do herpes simples do tipo 1 e 2, citomegalovírus, vírus de estomatite vesicular e um vírus da gripe. Ganz *et al.* afirmou (*Eur. J. Haematol.* 44:1 (1990)) que algumas defensinas mataram células de mamífero em cultura. Lichtenstein *et al.* (*Blood* 68(6):1407 (1986)) afirmou que as defensinas humanas conseguiam provocar a lise de células de linfoma de murino e humano. As defensinas de coelho eram também citotóxicas para os linfomas de murino. Para além disso, Charp *et al.* (*Biochem. Pharmacol.* 37(5):951 (1988)) afirmaram que as defensinas humanas (HNP-1, HNP-2 e HNP-3) inibiam a actividade de proteína-quinase C.

Encontram-se defensinas em mamíferos tais como humanos, vacas, coelhos, porquinhos-da-índia e ratinhos. As defensinas típicas dos mamíferos são proteínas catiónicas, anfifílicas, de cerca de 29-34 aminoácidos, possuindo um padrão conservado de seis resíduos de cisteína. No entanto, nem todas as defensinas encontradas nos grânulos do citoplasma de mamíferos se adequam a este padrão prototípico. A indolicidina, por exemplo, é uma defensina citotóxica, rica em triptofano, de treze aminoácidos, derivada de neutrófilos bovinos (ver M. Selsted *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267(7):4292 (1992)). O mesmo grupo (ver Selsted *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268(9):6641 (1993)) reportou o isolamento de beta-defensinas, uma família de proteínas catiónicas, anfifílicas



com seis resíduos de cisteína conservados possuindo actividades citotóxicas semelhantes às das defensinas prototípicas de mamíferos, apesar das suas dimensões e estruturas serem um tanto diferentes. As magaininas, proteínas originalmente obtidas de sapos, também são semelhantes às defensinas de mamíferos (ver, por exemplo, patente norte-americana N.º 4 962 277; patente norte-americana N.º 5 045 531). Também se encontraram defensinas em insectos (para uma recapitulação, ver J. Hoffman e C. Hetru, *Immunology Today* 13(10):411 (1992)).

Os fagócitos tais como os neutrófilos, os eosinófilos, os macrófagos e os linfócitos assassinos têm grânulos citoplasmáticos contendo defensinas, sendo os neutrófilos uma fonte de defensinas particularmente rica. Os grânulos citoplasmáticos fundem-se com as vesículas endocíticas, permitindo que as defensinas entrem em contacto com o material que sofreu endocitose, tal como micróbios invasores (ver J. Gabay *et al.*, *J. Exp. Med.* 164:1407 (1986); W. Rice *et al.*, *Blood* 70(3):757 (1987)).

As defensinas podem ligar-se às membranas externas de fosfolípidos dos seus alvos, e permeabilizá-las, destruindo desse modo o equilíbrio osmótico da célula (ver, por exemplo, Ganz *et al.*, *Med. Microbiol. Immunol.* 181:99 (1992); Ganz *et al.*, *Eur. J. Haematol.* 44:1 (1990); Kagan *et al.*, *PNAS* 87:210 (1990); Lichtenstein *et al.*, *J. Immunol.* 140:2686 (1988); Lichtenstein *et al.*, *Blood* 68(6):1407 (1986)). Esta permeabilização pode, ou não, ser suficiente em, e de si própria, para induzir a morte da célula; a actividade metabólica da célula alvo e uma adicional acção de defensinas podem também ser necessárias.

Atingir o total potencial terapêutico das defensinas, em animais, requer que as proteínas tenham de ser administradas de forma a que atinjam os seus alvos, numa forma activa, mas que evitem danos colaterais, nas células normais do animal. Isto pode ser conseguido aprisionando as defensinas em lipossomas.

Os lipossomas são estruturas de auto-montagem compreendendo uma ou mais camadas duplas de moléculas anfipáticas de lípido que encerram um volume interno aquoso. As moléculas anfipáticas de lípidos que constituem as camadas duplas de lípido compreendem uma zona de grupos de cabeça polar (hidrófila), ligada covalentemente a uma ou duas cadeias de acilo não polares (hidrófobas). O contacto, desfavorável do ponto de vista energético, entre as

cadeias de acilo hidrófobas e o meio aquoso, provocam o rearranjo das moléculas de lípido, de forma a que os grupos de cabeça polares se orientem no sentido do meio aquoso, enquanto que as cadeias de acilo se reorientam no sentido do interior das camadas duplas. O resultado líquido é uma estrutura estável do ponto de vista energético, na qual as cadeias de acilo são eficazmente protegidas de entrarem em contacto com o meio aquoso.

Os lipossomas podem ser produzidos através de vários métodos (para uma recapitulação, ver, por exemplo, Cullis *et al.*, em: *Liposomes, From Biophysics to Therapeutics* M. J. Ostro, ed., Marcel Dekker, pp. 39-72 (1987)). O procedimento de Bangham (*J. Mol. Biol.* 13:238-252 (1965)) produz vesículas multilamelares vulgares (MLV). Lenk *et al.* (Patentes norte-americanas N.ºs 4 522 803 (Publicação PCT N.º WO 83/03383 (10/13/83), 5 030 453 e 5 169 637), Fountain *et al.* (Patente norte-americana N.º 4 588 578 (Publicação PCT N.º WO 85/00751 (02/28/85)) e Cullis *et al.* (Patente norte-americana N.º 4 975 282 (Publicação PCT N.º WO 87/00043 (01/15/87)) divulgam métodos para produzir lipossomas multilamelares, possuindo uma distribuição interlamelar de soluto substancialmente igual.

Podem-se produzir vesículas unilamelares a partir de MLV por aplicação de ultra-sons (ver Paphadjopoulos *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* 135:624 (1968)) ou por extrusão (Cullis *et al.*, (Patente norte-americana N.º 5 008 050 (Publicação PCT N.º WO 86/00238 (01/16/86) e Loughrey *et al.*, patente norte-americana N.º 5 059 421 (Publicação PCT N.º WO 91/00289 (01/10/89)). Janoff *et al.* (Patente norte-americana N.º 4 721 612 (Publicação PCT N.º 85/04578 (10/24/85)) e Bolcsak *et al.* (Patente norte-americana N.º 5 100 662) descrevem a utilização de esteróis na preparação de lipossomas com maior estabilidade. Incluem-se aqui estas divulgações como referência para indicar o estado da arte, relativamente à preparação de lipossomas.

Os lipossomas podem ser carregados passivamente com agentes bioactivos, isto é, solubilizando a molécula no meio em que se formam os lipossomas, no caso de agentes solúveis em água, ou adicionando agentes solúveis em lípidos às soluções de lípidos com as quais se fazem os lipossomas. Os lipossomas também se podem ser carregados activamente com agentes bioactivos ionizáveis, por exemplo, estabelecendo um gradiente de potencial electroquímico que acesse a membrana do lipossoma e depois adicionando o



agente ao meio exterior ao lipossoma (ver Balley *et al.*, Patente norte-americana. N.º 5 077 056, cujo conteúdo se inclui aqui como referência).

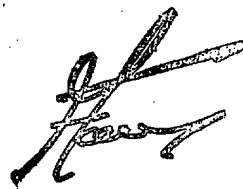
As drogas aprisionadas dentro de lipossomas podem ter um maior índice terapêutico por redução da toxicidade, por aumento da eficácia, ou por ambos. Para além disso, os lipossomas, tal como outros materiais em partículas na circulação, são captados pelas células fagocíticas do sistema reticuloendotelial em tecidos possuindo capilares sinusoidais, e por isso são frequentemente direccionados para os locais de infecções intracelulares.

Os requerentes proporcionam aqui um lipossoma contendo uma defensina e um lípido inibidor de libertação, no qual a defensina é uma defensina neutralizada, isto é, uma defensina cuja libertação do lipossoma está inibida. A patente norte-americana N.º 5 032 574 divulga lipossomas contendo uma proteína antimicrobiana cuja sequência, embora alterada, se baseia na sequência conservada de defensinas de mamífero. No entanto, esta referência não divulga lipossomas concebidos para inibir a libertação de defensinas neles aprisionadas.

Sumário do Invento

Este pedido proporciona um lipossoma compreendendo uma camada dupla de lípido, um compartimento aquoso e uma defensina, no qual a defensina é uma defensina neutralizada. O lipossoma pode ser unilamelar ou multilamelar, mas de preferência é multilamelar. O lipossoma é, de maior preferência, um lipossoma multilamelar possuindo um soluto aprisionado nos seus compartimentos aquosos, em que a concentração do soluto em cada um dos compartimentos aquosos é substancialmente igual, isto é, o lipossoma é uma vesícula multilamelar possuindo uma distribuição interlamelar de soluto substancialmente igual. A defensina pode estar contida numa camada dupla de lípido do lipossoma e/ou num compartimento aquoso do lipossoma. A defensina pode ser qualquer proteína do sistema de defesa microbiana e/ou antitumorigénica do hospedeiro animal, por exemplo, uma defensina prototípica de mamífero, beta-defensina, indolicidina, magainina ou defensina de insecto. Presentemente, a defensina preferida é a indolicidina.

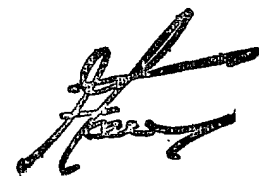
O lipossoma deste invento pode compreender um lípido inibidor de



libertação. Presentemente, os lípidos inibidores de libertação preferidos são 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) e diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e colesterol, de preferência numa razão de DSPC para colesterol (mole/mole) de cerca de 3:2. Por consequência, nas concretizações do invento presentemente preferidas, a defensina é indolicidina e o lipossoma compreende um lípido inibidor de libertação compreendendo POPC, DOPC ou DSPC e colesterol. Os lipossomas de indolicidina/POPC compreendem tipicamente pelo menos cerca de 0,5 por cento em moles de indolicidina e no máximo cerca de 99,5 por cento em moles de POPC, de preferência, cerca de 5 por cento em moles de indolicidina e cerca de 95 por cento em moles de POPC. Os lipossomas de indolicidina/(DSPC e colesterol) compreendem tipicamente pelo menos cerca de 0,5 por cento em moles de indolicidina e no máximo cerca de 99,5 por cento em moles de DSPC e colesterol, de preferência, cerca de 20 por cento em moles de indolicidina e cerca de 80 por cento em moles de DSPC e colesterol. Os lipossomas de indolicidina/DOPC compreendem tipicamente pelo menos cerca de 5 por cento em moles de indolicidina e no máximo cerca de 95 por cento em moles de DOPC.

Os lipossomas que aqui se proporcionam podem ainda compreender um tampão aquoso inibidor de libertação, um lípido de grupo de cabeça modificado e um agente bioactivo adicional. Os lipossomas podem ainda compreender uma camada dupla de lípido que compreende um lípido ionizável. De preferência, mais de cerca de 50 por cento do lípido ionizável que existe na camada dupla de lípido mais exterior do lipossoma, existe na monocamada interna da camada dupla de lípido mais exterior. O lípido ionizável compreende tipicamente pelo menos cerca de cinco por cento em moles do lípido na camada dupla de lípidos, desejavelmente, cerca de dez por cento em moles. Numa concretização do invento presentemente preferida, o lípido ionizável compreende DPDAP (1,2-dipalmitoil-3-(N,N-dimetilamino)propano).

Este invento também proporciona um lipossoma desidratado compreendendo uma defensina, no qual a defensina é uma defensina neutralizada. É ainda proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo um transportador farmaceuticamente aceitável e um lipossoma compreendendo uma camada dupla de lípido, um compartimento aquoso e uma defensina, na qual a defensina é uma defensina neutralizada.



Podem-se administrar aos animais, quantidades anti-infecção eficazes da composição farmacêutica, para o tratamento ou prevenção de infecções provocadas por organismos sensíveis a uma defensina, por exemplo, indolicidina. Os sujeitos terapêuticos preferidos são mamíferos, particularmente, humanos, por exemplo os humanos cujos sistemas imunitários foram comprometidos, por exemplo, por vírus como o HIV, por quimioterapia ou por transplante de órgãos. Podem-se tratar com os lipossomas deste invento as infecções causadas por fungos sensíveis a uma defensina, tais como as infecções causadas por fungos *Cryptococcus* ou *Aspergillus*. Por consequência, numa concretização do invento presentemente preferida, o animal tratado é um humano imunologicamente comprometido e a infecção compreende uma infecção provocada por um fungo *Cryptococcus* ou *Aspergillus*.

Podem-se administrar aos animais, quantidades anti-cancro eficazes da composição farmacêutica que aqui se proporciona para o tratamento de cancros que reagem a uma defensina, por exemplo, uma leucemia ou um linfoma.

Proporciona-se aqui ainda um método para tratar um animal de uma desordem, por exemplo, Síndrome de deficiência de grânulos específicos, caracterizada por uma deficiência de actividade citotóxica microbicida e/ou tumoricida mediada por proteínas nos grânulos do citoplasma, que compreende a administração ao animal de uma quantidade citotóxica eficaz da composição farmacêutica aqui proporcionada. Este método pode ser particularmente útil para tratar animais sofrendo deste síndrome que também possuem uma infecção microbiana.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Difusão de luz, em ângulo recto, de indolicidina aquosa. Dissolveu-se indolicidina em várias concentrações, em soluções tampão contendo HEPES 10 mM e NaCl 150 mM, pH 7,5. Colocaram-se amostras em células de fluorescência e mediu-se a difusão de luz a comprimentos de onda de 500 nm (comprimento de onda de excitação) no fluorímetro a um ângulo de 90 graus. Só o tampão (sem indolicidina) tinha uma difusão de luz relativa de $0,4 \times 10^6$. O eixo vertical corresponde à medição da intensidade de difusão relativa; o eixo horizontal indica a concentração de indolicidina ($\mu\text{g/ml}$).



Figura 2. Fluorescência de indolicidina aquosa. Dissolveu-se de indolicidina em tampão HEPES 10 mM, pH 7,5 contendo NaCl 150 mM. Estabeleceu-se o comprimento de onda de excitação em 285 nm, e fez-se um varrimento de comprimentos de onda de emissão de 325 nm a 450 nm. Representou-se a área sob a curva de emissão (eixo vertical) em função da concentração de indolicidina ($\mu\text{g/ml}$) (eixo horizontal). O gráfico inserido na figura mostra a tendência a concentrações de indolicidina inferiores a cerca de 5 $\mu\text{g/ml}$. A linha pontuada que representa esse declive é também mostrada no perfil maior. Observam-se três declives diferentes. Alteraram-se as larguras de fenda entre concentrações mais baixas e mais altas; examinaram-se as concentrações intermédias em ambas as larguras de fenda para assegurar uma normalização apropriada.

Figura 3. Retenção de indolicidina em lipossomas contendo POPC e DPPC. Formaram-se lipossomas de POPC (1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina), POPC/Chol (colesterol), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) e DPPC/Chol como se descreve abaixo e aprisionou-se neles indolicidina. Determinou-se a percentagem da indolicidina inicialmente aprisionada nos lipossomas que neles se manteve após 48 horas (de acordo com procedimentos descritos abaixo) e apresenta-se para cada uma das formulações de lipossoma.

Figura 4. Retenção de indolicidina em lipossomas contendo DOPE. Formaram-se lipossomas contendo indolicidina com dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) como se descreve abaixo. Apresenta-se a concentração de indolicidina nos lipossomas, tanto inicialmente como depois de sucessivas lavagens.

Figura 5. Retenção de indolicidina em lipossomas contendo DSPC/Chol. Formaram-se lipossomas contendo indolicidina, com diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e colesterol, como se descreve abaixo. Determinou-se, em conformidade com os procedimentos descritos abaixo, a concentração de indolicidina no sobrenadante, e portanto, o nível da indolicidina inicialmente aprisionada que posteriormente escapa do lipossoma. A concentração de indolicidina no sobrenadante (mM) é dada após a primeira, segunda, terceira, quarta, quinta e sexta lavagens.

Figura 6. A fluorescência de indolicidina livre e de indolicidina em lipossomas. Submeteram-se a extrusão vesículas multilamelares (MLV) de

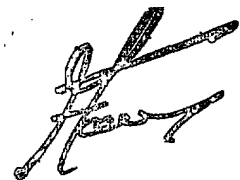


POPC, DOPC e DSPC/Chol (3:2) através de dois filtros de polycarbonato, empilhados, de poros de tamanho de 0,1 micra, a 50 graus C. Diluíram-se quantidades alíquotas das amostras de lipossoma resultantes até uma concentração final de lípido de 0,1 mg/ml e registaram-se os perfis de emissão de fluorescência com, e sem, a presença de 0,5 µg de indolicidina. Fez-se o varrimento de comprimentos de onda de emissão de 325 nm a 450 nm; estabeleceu-se o comprimento de onda de excitação em 285 nm. A: indolicidina em solução tampão; B: lipossomas de indolicidina/DPPC/Chol; C: lipossomas de indolicidina/DOPC; D: lipossomas de indolicidina/POPC/Chol; E: lipossomas de indolicidina/POPC.

Figura 7. Parâmetro de ordem de sistemas de indolicidina em lipossomas. O eixo vertical mostra o efeito da adição de indolicidina no parâmetro de ordem de vários sistemas de lipossomas, com concentrações de indolicidina crescentes (percentagem em moles, eixo horizontal) usando o marcador de *spin* 1-palmitoil-2(12 doxilestearoil)-fosfatidilcolina numa concentração de 1 por cento em moles. Quadrados a branco: lipossomas de DPPC; triângulos a branco: lipossomas de DSPC; círculos a branco: lipossomas de DSPC/Chol. (3:2); asteriscos: lipossomas de DHPC; quadrados a cheio: lipossomas de POPC; triângulos a cheio: lipossomas de POPC/Chol/DOTAP (dioleoiltrimetilaminopropano) (5:4:1); círculos a cheio: lipossomas de POPC/DOTAP (9:1); e barras a cheio: lipossomas de DSPC/Chol/DDAB (brometo de dimetilaminodioctadecilamónio).

Figura 8. Actividade hemolítica de indolicidina em lipossomas contendo POPC e DPPC. Incubou-se indolicidina, tanto na sua forma livre (não aprisionada) como fazendo parte de formulações de lipossomas, com glóbulos vermelhos (RBC). Mediu-se a percentagem de RBC que sofreram lise como se descreve abaixo e fornece-se como função da concentração de indolicidina (quadrados a branco: indolicidina livre; triângulos a branco: lipossomas de POPC/indolicidina; círculos a branco: lipossomas de DPPC/indolicidina; quadrados a cheio: lipossomas de interdigitação-fusão de DPPC/indolicidina).

Figura 9. Efeito da variação da concentração de indolicidina na actividade hemolítica de lipossomas contendo POPC. Prepararam-se lipossomas de POPC/indolicidina como se descreve abaixo. Incubaram-se as vesículas contendo indolicidina (juntamente com indolicidina livre) com RBC, e



determinou-se o número dos que sofreram lise (também em conformidade com os procedimentos descritos abaixo). A percentagem de hemólise de RBC induzida pela indolicidina é apresentada em função da concentração de indolicidina (mg/ml) nas amostras de RBC (quadrados a cheio: indolicidina livre; triângulos a cheio: 3,8 por cento em moles de indolicidina em lipossomas de POPC; estrelas: 2,5 por cento em moles de indolicidina; círculos a cheio: 1,8 por cento em moles de indolicidina; quadrados a cheio: 1,0 por cento em moles de indolicidina; triângulos a cheio: 0,4 por cento em moles de indolicidina).

Figura 10. Actividade hemolítica de indolicidina em lipossomas de DSPC/Chol. Prepararam-se lipossomas de DSPC/Chol contendo indolicidina, como se descreve abaixo, para se ter 4,8 por cento em moles de indolicidina. Incubaram-se os lipossomas com RBC. O número de lises, determinado como se descreve abaixo, é apresentado como a percentagem de hemólise de RBC observadas com a variação da concentração de indolicidina nas amostras de RBC (círculos a cheio: 4,8 por cento em moles de indolicidina em lipossomas de DSPC/Chol; quadrados a cheio: indolicidina livre).

Figura 11. Efeito de lípidos diferentes na hemólise de glóbulos vermelhos. Prepararam-se lipossomas de DSPC/Chol e DSPC/Chol/DDAB e usaram-se em ensaios de hemólise para medir o efeito dos lípidos indicados na hemólise de RBC. Apresentam-se os resultados como percentagem de hemólise (em relação a controlos de zero e cem por cento de hemólise) induzida a várias concentrações de lípidos nas amostras de RBC.

Figura 12. Actividade hemolítica de lipossomas de DOPE/indolicidina. Prepararam-se lipossomas de DOPE/indolicidina e usaram-se em ensaios de hemólise. Apresentam-se os resultados como a percentagem de hemólise (em relação a controlos de zero e cem por cento de hemólise) induzida a várias concentrações de lípidos.

Figura 13. Citotoxicidade de indolicidina livre *versus* indolicidina em lipossomas. Mediu-se a inibição específica de proliferação *in vitro* de células CHO/K1 por indolicidina livre a concentrações crescentes ($\mu\text{g/ml}$), por lipossomas vazios e por indolicidina em lipossomas a concentrações crescentes de indolicidina ($\mu\text{g/ml}$) (eixo horizontal) através de um ensaio padrão de incorporação de timidina ($\text{cpm} \times 10^3$, eixo vertical).

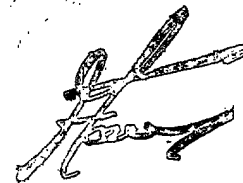


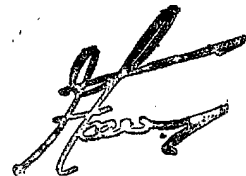
Figura 14. Eficácia terapêutica de indolicidina livre e de indolicidina em lipossomas contra infecções por *Aspergillus* em ratinhos. Infectou-se cada ratinho Balb/c com 2×10^7 esporos de *A. fumigatus* e depois injectou-se quer com tampão PBS, indolicidina livre, quer com indolicidina em lipossomas. Monitorizou-se a sobrevivência dos animais durante um período de quinze dias. A percentagem de sobrevivência (eixo vertical) está representada em função do tempo em dias (eixo horizontal).

Descrição detalhada do invento

O presente invento proporciona um lipossoma compreendendo uma camada dupla de lípido, um compartimento aquoso e uma defensina, em que a defensina é uma defensina neutralizada. As defensinas são proteínas, polipéptidos ou péptidos citotóxicos microbicidas e/ou tumoricidas encontrados em, ou segregados por, células especializadas do sistema de defesa de hospedeiros animais. As proteínas podem ser citotóxicas para organismos infecciosos, por exemplo, bactérias, fungos e parasitas, assim como para células hospedeiras anormais, por exemplo cancerosas, ou senescentes, e verificou-se inactivarem vírus encapsulados. Encontraram-se as proteínas em mamíferos tais como humanos, vacas, porquinhos-da-índia, coelhos e ratinhos. Também se obtiveram a partir de animais não mamíferos tais como sapos, insectos e tubarões.

"Defensinas prototípicas de mamíferos" são proteínas catiónicas encontradas de forma variável nos grânulos citoplasmáticos de fagocitos de mamíferos. Essas defensinas compreendem tipicamente entre cerca de 29 e 34 aminoácidos, têm um padrão conservado de seis resíduos de cisteína e são anfifílicas. As defensinas prototípicas de mamífero incluem as proteínas neutrófilas humanas 1, 2 e 3 (HNP-1, HNP-2 e HNP-3) assim como proteínas neutrófilas de coelho, ratinho e porquinho-da-índia.

Outras defensinas, incluindo outras defensinas de mamífero assim como as derivadas de animais que não mamíferos, possuem actividades citotóxicas semelhantes, embora difiram na sequência e/ou estrutura deste padrão prototípico. As beta-defensinas, por exemplo, podem ter um conjunto de actividades citotóxicas semelhante ao das defensinas prototípicas de mamífero



e podem também ser obtidas a partir de neutrófilos bovinos, mas têm sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais de consenso diferentes. A indolicidina é uma proteína citotóxica microbicida, tumoricida de treze aminoácidos que também pode ser isolada a partir de neutrófilos bovinos. A indolicidina tem actividade citotóxica comparável às defensinas prototípicas de mamífero, mas é menor e falta-lhe as suas seis cisteínas conservadas. As defensinas de insecto são também catiónicas, têm um padrão de seis cisteínas conservado, são altamente anfifílicas e são citotóxicas, embora difiram das defensinas prototípicas de mamífero em tamanho e estrutura tridimensional. As magaininas são proteínas catiónicas, anfifílicas, microbicidas, do sistema de defesa hospedeiro originalmente obtidas de sapos. Além disso, encontraram-se também defensinas em tubarões.

Consequentemente, o termo "defensina", tal como aqui se utiliza, significa uma proteína, um péptido ou um polipéptido microbicida e/ou tumoricida que é um componente do sistema de defesa hospedeiro animal contra células infecciosas, anormais ou senescentes e que pode ser encontrada em, ou pode ser segregada por, células do sistema de defesa hospedeiro do animal. As "defensinas" incluem, mas não se limitam a, "defensinas prototípicas de mamífero", beta-defensinas, indolicidina, magaininas e defensinas de insecto, assim como outras proteínas do sistema de defesa hospedeiro animal, por exemplo, as derivadas de tubarões. O termo "defensinas" inclui essas proteínas, sejam elas isoladas de células animais ou produzidas sinteticamente, e inclui também variantes que retêm substancialmente as actividades citotóxicas das proteínas de que são originárias, mas cujas sequências foram alteradas por inserção ou deleção de um ou mais aminoácidos. Presentemente, a defensina preferida para utilizar nas formulações de lipossomas deste invento é a indolicidina.

Uma defensina "neutralizada" é uma defensina que está associada a um lipossoma e que é inibida de destruir a organização da camada dupla do lipossoma, por um ou mais dos componentes da vesícula. O termo "associado" descreve as defensinas que estão contidas num compartimento aquoso do lipossoma ou as defensinas que estão contidas numa camada dupla de lípido do lipossoma. As defensinas neutralizadas, na generalidade, não escapam dos lipossomas de forma substancial, mas conservam as suas actividades citotóxicas, isto é, são capazes de destruir a organização da camada dupla de



um alvo quando expostas ao alvo. As defensinas são neutralizadas, de preferência, inibindo a sua interacção com as camadas duplas de lípido. Os componentes da vesícula que inibem a interacção defensina-camada dupla, por exemplo, aumentando a rigidez da camada dupla para inibir a introdução de defensina, ou induzindo defensinas a agregar-se num compartimento aquoso de forma a que depois não se introduzam, de modo geral, na camada dupla, podem neutralizar as defensinas. Em alternativa, as defensinas podem ser neutralizadas induzindo a sua introdução estável nas camadas duplas de lípido. Os componentes de vesícula podem induzir uma inserção estável de defensinas, por exemplo, formando interacções favoráveis do tipo Van der Waal com as porções hidrófobas das proteínas, deixando espaço para as proteínas no interior da camada dupla ou formando interacções electrostáticas favoráveis com as defensinas. As interacções defensina-camada dupla preferidas resultam na menor perturbação da organização estrutural da camada dupla. As alterações na organização da camada dupla podem ser avaliadas medindo as alterações no parâmetro de ordem da camada dupla logo que esta seja perturbada, por exemplo, adicionando uma defensina à camada dupla. Os parâmetros de ordem, que se podem medir por métodos bem conhecidos dos vulgarmente peritos na arte, medem o grau em que a orientação das ligações carbono-carbono dos lípidos que constituem a camada dupla está correlacionada com a normal, para a interface camada dupla – meio aquoso (ver, por exemplo, S. Gruner, *Nonlamellar Lipid Phases*, em: *The Structure of Biological Membranes* (P. Yeagle, ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton (1992), pp. 222-223, cujo conteúdo é aqui incluído como referência). Pode-se esperar que a perturbação da organização da camada dupla diminua a correlação. Os lípidos preferidos inibidores de libertação que induzem interacções favoráveis com as defensinas são os que exibem a menor alteração no parâmetro de ordem, a menor perturbação na organização da camada dupla.

Os lipossomas são estruturas de auto-montagem compreendendo uma ou mais camadas duplas de lípido envolvendo um volume interno aquoso. As camadas duplas de lípido compreendem duas monocamadas opostas de moléculas de lípido anfipáticas, compreendendo cada uma um grupo de cabeça polar (hidrófilo) adjacente a uma fase aquosa, interna ou externa, e cadeias de acilo hidrófobas dispostas em série na camada dupla interior. O grupo de cabeça pode ser fosfato, sulfato, amino ou outras porções polares adequadas, mas de preferência são grupos fosfato; as cadeias de acilo são tipicamente de



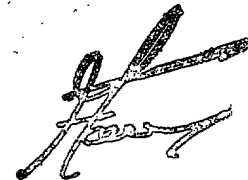
14-24 átomos de carbono em comprimento e podem possuir uma ou mais ligações duplas, ou seja, as cadeias de acilo podem ser saturadas ou insaturadas. A formação de camadas duplas de lípidos estáveis reflecte um balanço de energia de efeitos hidrófobos da interacção das cadeias de acilo e o meio aquoso envolvente, limitações de compactação espacial nas cadeias de acilo, interacções atractivas e repulsivas na interface da camada dupla com o meio aquoso, elasticidade de curvatura da camada dupla, e outros do género.

Os lipossomas podem ter uma camada dupla de lípido, ou seja, podem ser unilamelares, ou múltiplas camadas duplas, ou seja, podem ser multilamelares (MLV). As vesículas unilamelares podem ser vesículas unilamelares pequenas (SUV) ou grandes (LUV), lipossomas com diâmetros médios superiores a cerca de 50 nm.

As MLV podem ser preparadas dissolvendo lípidos num solvente orgânico, evaporando o solvente e depois adicionando um meio aquoso à película de lípido resultante (ver, por exemplo, Bangham, *J. Mol. Biol.* 13:238 (1965)). Cullis *et al.* (patente norte-americana N.º 4 975 282), Lenk *et al.* (patentes norte-americanas N.ºs 4 522 803, 5 030 453 e 5 169 637) e Fountain *et al.* (patente norte-americana N.º 4 588 578) divulgam métodos para produzir lipossomas multilamelares nos quais os lipossomas contêm um soluto aprisionado nos seus compartimentos aquosos e nos quais a concentração do soluto em cada compartimento é substancialmente igual, ou seja, os lipossomas têm uma distribuição interlamelar de soluto substancialmente igual.

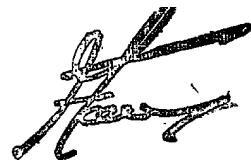
As vesículas unilamelares podem ser produzidas a partir de MLV por aplicação de ultra-sons (ver Pahadjopoulos *et al.*, *Biochem Biophys. Acta.* 135:624 (1968)) ou por extrusão sob pressão através de filtros (ver Cullis *et al.*, Patente norte-americana N.º 5 008 050 e Loughrey *et al.*, Patente norte-americana N.º 5 059 421). Incluem-se aqui estas divulgações como referência para descrever o estado da arte relativamente à preparação de lipossomas.

O lipossoma do presente invento pode ser unilamelar ou multilamelar, mas de preferência é multilamelar. As múltiplas camadas duplas de lípidos oferecem um maior número de obstáculos à libertação de defensinas dos lipossomas. O lipossoma multilamelar pode ser uma vulgar MLV, ou seja, uma



MLV produzida por um processo semelhante ao de Bangham *et al.* (*J. Mol. Biol.* 13:238 – dissolve lípido(s) anfipático(s) num solvente orgânico, evapora o solvente e depois hidrata de novo os lípidos secos com um meio aquoso). Essas MLV podem ser adicionalmente processadas. Por exemplo, podem-se preparar lipossomas de POPC contendo indolicidina, preparando uma mistura de indolicidina e POPC num ou em mais solventes orgânicos (por exemplo, etanol, metanol e clorofórmio), evaporando o solvente orgânico e hidratando os lípidos secos com um tampão aquoso. Os lipossomas resultantes são vulgares MLV e podem ser submetidos a extrusão através de filtros de poros com um tamanho definido (por exemplo, cinco micra) para reduzir a sua capacidade de formar lamelas e homogeneizar o seu tamanho, em conformidade com os procedimentos de Cullis *et al.* (patente norte-americana N.º 5 008 050) e Loughrey *et al.* (patente norte-americana N.º 5 059 421). No entanto, o lipossoma multilamelar deste invento contém, de preferência, um soluto aprisionado nos seus compartimentos aquosos, em que a concentração de soluto em cada um dos compartimentos aquosos é substancialmente igual, ou seja, o lipossoma multilamelar tem uma distribuição interlamelar de soluto substancialmente igual. Pode-se preparar o lipossoma, por exemplo, com DSPC e colesterol e este pode ser mais estável do ponto de vista osmótico que uma MLV vulgar.

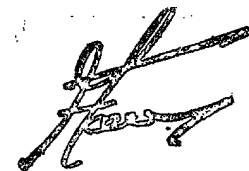
O lipossoma deste invento pode ainda compreender um lípido inibidor de libertação, ou seja, um lípido que inibe a libertação de defensinas pelos lipossomas. Um "lípido inibidor de libertação" pode ser um lípido que inibe as interacções defensina-camada dupla de tal forma que as proteínas não conseguem, na generalidade, introduzir-se nas camadas duplas de lípido, e dessa forma não destroem, na generalidade, a organização da camada dupla. Esses lípidos podem inibir a interacção defensina-camada dupla, por exemplo, por meio de alterações nos grupos de cabeça que formam repulsões electrostáticas com os grupos com carga nas defensinas, e aumentando a rigidez da membrana, ou caso contrário limitando a capacidade dos domínios hidrófobos da defensina para interagir favoravelmente com as cadeias de acilo hidrófobas nos interiores das camadas duplas. De preferência, o lípido inibidor de libertação deste invento é um lípido que inibe as interacções defensina-camada dupla. Esse lípido inibidor de libertação presentemente preferido compreende DSPC e colesterol, desejavelmente numa razão molar de 3:2 de DSPC para colesterol. Em alternativa, um lípido inibidor de libertação pode ser



um lípido que possa interagir favoravelmente com uma defensina numa camada dupla de lípido. Os lípidos inibidores de libertação podem interagir com as defensinas por meio de interações favoráveis do tipo Van der Waal entre as cadeias de acilo hidrófobas e os domínios hidrófobos das defensinas; os lípidos inibidores de libertação podem também formar ligações covalentes com as defensinas. Podem-se formar interações electrostáticas entre os grupos de cabeça com carga dos lípidos e as defensinas com carga, com a manutenção da porção hidrófoba das defensinas no interior da camada dupla. Essas interações "favoráveis" resultam na menor perturbação na organização da camada dupla, o que minimiza o potencial para a libertação de defensinas. Os lípidos inibidores de libertação podem também estabelecer condições espaciais favoráveis à introdução dos domínios hidrófobos de defensinas no interior da camada dupla. Além disso, os lípidos inibidores de libertação podem induzir uma defensina a introduzir o seu domínio hidrófobo numa camada dupla de lípido de forma a que a defensina não forme poros na camada dupla. Os lípidos inibidores de libertação presentemente preferidos que interagem favoravelmente com as defensinas são 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) ou dioleoilfosfatidilcolina (DOPC).

Consequentemente, numa concretização do invento, a defensina compreende indolicidina e o lípido inibidor de libertação compreende POPC. Tipicamente, os lipossomas de indolicidina/POPC compreendem pelo menos cerca de 0,5 por cento em moles de indolicidina e no máximo cerca de 99,5 por cento em moles de POPC; desejavelmente, os lipossomas compreendem cerca de 5 por cento em moles de indolicidina e cerca de 95 por cento em moles de POPC. Numa outra concretização do invento, a defensina compreende indolicidina e o lípido inibidor de libertação compreende DOPC. Tipicamente, o lipossoma compreende pelo menos cerca de 0,5 por cento em moles de indolicidina e no máximo cerca de 99,5 por cento em moles de DOPC. Como aqui se usa, "por cento em moles" de um lípido ou proteína significa o número de moles do lípido ou da proteína dividido pelo número total de moles existentes (ou seja, por cento em moles de $A = (A)/(A + B)$).

Numa concretização do presente invento presentemente preferida, a defensina compreende indolicidina e o lípido inibidor de libertação compreende DSPC e colesterol, estando o DSPC e o colesterol, de preferência, presentes numa razão molar de cerca de 3 para 2 de DSPC:colesterol. O lipossoma



compreende, tipicamente, pelo menos cerca de 0,5 por cento em moles de indolicidina e no máximo cerca de 99,5 por cento em moles de DSPC e colesterol, desejavelmente, cerca de 20 por cento em moles de indolicidina e cerca de 80 por cento em moles de DSPC e colesterol.

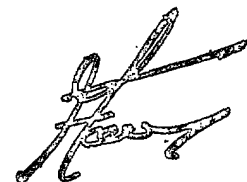
O lipossoma que aqui se proporciona pode ainda compreender um tampão inibidor de libertação. Como aqui se utiliza, um "tampão inibidor de libertação" é uma solução aquosa que inibe ou previne a libertação de uma defensina aprisionada num lipossoma. Estes tampões inibem a libertação de defensinas, inibindo as proteínas de destruírem as camadas duplas de lípidos, de preferência, inibindo a interacção da defensina com as camadas duplas. Pode-se inibir a interacção defensina-camada dupla, induzindo as moléculas de defensina a interagirem, ou a ligarem-se de forma cruzada, umas com as outras de modo a que os agregados resultantes não se introduzam, na generalidade, nas camadas duplas de lípidos. Podem-se induzir as defensinas a formar complexos, colocando-as em soluções aquosas aniónicas, de preferência polianiónicas, de tal forma que várias moléculas de defensina e aniões estabeleçam interacções electrostáticas. Por exemplo, pode-se precipitar indolicidina na forma de um complexo colocando-a numa solução de citrato 50 mM. A precipitação é facilitada pelo emparelhamento electrostático entre as cargas positivas na indolicidina (total de cinco por molécula) e as cargas negativas no citrato (total de três por molécula a pH 7), e é indicativa das ligações cruzadas de moléculas de proteínas. Os complexos de defensina, com ligações cruzadas, precipitados, podem ser aprisionados em lipossomas adicionando uma suspensão aquosa dos complexos aos lípidos com os quais se preparam as vesículas. Podem-se também aprisionar em lipossomas os complexos de defensina formando vesículas de tal forma que estas contenham a defensina ou o polianião, mas não ambos, e sejam impermeáveis às espécies aprisionadas, ao mesmo tempo que são permeáveis às não aprisionadas. Quando se introduz a espécie permeável, não aprisionada, no meio externo que envolve o lipossoma, forma-se um precipitado na vesícula à medida que a espécie permeável migra para o seu interior e interacções electrostáticas induzem a agregação de defensinas.

As defensinas em lipossomas que aqui se proporcionam podem ainda compreender um segundo agente bioactivo, ou seja, um agente bioactivo em adição à defensina. O "agente bioactivo", como aqui se utiliza, denota qualquer composto ou composição de materiais que possuam actividades biológica em

animais, por exemplo, humanos. Os agentes bioactivos incluem, mas não se limitam a: compostos antivirais, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antimetabólicos, antiglaucomas, anti-inflamatórios ou antineoplásicos, esteróis, hidratos de carbono, aminoácidos, péptidos, proteínas, imunoglobulinas, imunomoduladores, pigmentos, toxinas, enzimas, hormonas, neurotransmissores, glicoproteínas, radiomarcadores, compostos radio-opacos, compostos fluorescentes, proteínas receptoras de células, ligandos de receptores de células, compostos midriáticos, broncodilatadores, anestésicos locais, agentes promotores de crescimento, agentes regenerativos e outros do género. Este segundo agente bioactivo pode ser uma defensina adicional.

O lipossoma que aqui se proporciona pode ainda compreender um lípido de grupo de cabeça modificado. Os lipossomas são depurados do corpo de um animal através do seu sistema reticuloendotelial (RES) que consiste em macrófagos fixos e circulantes. Evitar a depuração pelo RES permite aos lipossomas permanecer durante mais tempo na circulação, o que significa ser necessário administrar menos quantidade de droga para atingir os níveis no soro desejados. Tempos em circulação aumentados também permitem direccionar os lipossomas para tecidos que não contêm RES. As superfícies dos lipossomas revestem-se com proteínas do soro quando administradas a animais. As taxas de depuração através do RES podem estar relacionadas com a taxa e com o nível desse revestimento de proteínas; consequentemente, a depuração pode ser inibida modificando a superfície externa dos lipossomas de tal forma que a ligação de proteínas do soro seja geralmente inibida. Isto pode ser conseguido minimizando ou protegendo as cargas negativas da superfície, que podem promover a ligação de proteínas, ou de outro modo, oferecendo impedimento estereoquímico à ligação de proteínas do soro.

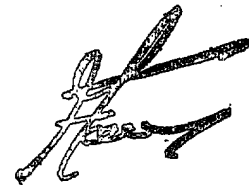
A modificação eficaz da superfície, ou seja, as alterações às superfícies externas de lipossomas que resultam em inibição de captação pelo RES, podem ser conseguidas introduzindo lípidos com grupo de cabeça modificado nas camadas duplas do lipossoma. Os "lípidos com grupo de cabeça modificado", tal como aqui se utiliza, são lípidos anfipáticos cujos grupos de cabeça polares foram obtidos ligando-lhes uma porção química, por exemplo, polietilenoglicol, um éter polialquílico, um gangliósido, um ácido orgânico dicarboxílico ou outro do género, que pode inibir a ligação de proteínas do soro aos lipossomas de tal forma que o comportamento farmacocinético das vesículas nos sistemas



circulatórios dos animais é alterado (ver, por exemplo, Blume *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1149:180 (1993); Gabizon *et al.*, *Pharma. Res.* 10(5):703 (1993); Park *et al.* *Biochim. Biophys. Acta.* 1108:257 (1992); Woodle *et al.*, patente norte-americana N.º 5 013 556; Allen *et al.*, patentes norte-americanas N.º 4 837 028 e 4 920 016 (Publicação PCT N.º WO 88/04924 (07/14/88)); inclui-se aqui o conteúdo destas divulgações como referência). O lipossoma que se proporciona neste invento pode ainda compreender um destes lípidos com grupo de cabeça modificado. A quantidade do lípido com grupo de cabeça modificado incorporada no lipossoma depende de um número de factores bem conhecidos dos que são vulgarmente peritos na arte, que é de sua competência determinar sem excessiva experimentação. Estes incluem, mas não se limitam a: tipo de lípido e tipo de modificação no grupo de cabeça; o tipo e dimensão do lipossoma; e a utilização terapêutica planeada para a formulação de defensina em lipossomas. Tipicamente, a concentração do lípido de grupo de cabeça modificado no lipossoma é pelo menos cerca de cinco por cento em moles, desejavelmente, cerca de dez por cento em moles.

A camada dupla de lípido do lipossoma deste invento pode compreender um lípido ionizável. Os lípidos ionizáveis colocados num meio com pH adequado comportarão uma ou mais cargas positivas ou negativas. As interacções entre as proteínas aprisionadas em lipossomas e os componentes lípidos dos lipossomas portadores do mesmo tipo de carga podem conduzir a repulsões electrostáticas entre a proteína e o lípido; essas repulsões electrostáticas podem inibir a libertação das proteínas dos lipossomas.

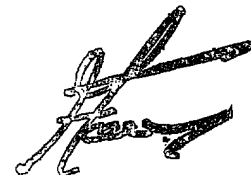
As defensinas são normalmente proteínas catiónicas. Consequentemente, a introdução de um lípido catiónico, ionizável, numa camada dupla do lipossoma pode induzir repulsões electrostáticas com uma defensina e desse modo inibir a libertação da defensina a partir do lipossoma. A quantidade de lípido ionizável a introduzir numa camada dupla lipídica é qualquer quantidade que possa prevenir a interacção defensina-camada dupla e desse modo iniba a libertação de defensina, o que é, de outro modo, compatível com a preparação, estabilidade e utilização de lipossomas. A quantidade dependerá de vários factores bem conhecidos dos vulgarmente peritos na arte, ou que é de sua competência determinar sem excessiva experimentação, dado este invento. Estes factores incluem, mas não se limitam a: tipo de lípido e quantidade de carga por molécula, defensina e tipo de lipossoma utilizado. Tipicamente, a quantidade de



lípidio ionizável introduzido na camada dupla de lípidio é cerca de cinco por cento em moles de lípidio na camada dupla, desejavelmente, cerca de dez por cento em moles.

De preferência, mais de cerca de cinquenta por cento do lípidio ionizável existente na camada dupla lipídica mais exterior do lipossoma encontra-se na monocamada interna da camada dupla lipídica mais exterior. As camadas duplas de lípidos compreendem duas monocamadas opostas de moléculas de lípidio anfipáticas, uma monocamada interna e uma externa. A camada dupla de lípidio mais exterior de um lipossoma é a camada dupla de lípidio cuja monocamada externa está adjacente ao meio exterior que circunda o lipossoma. A acumulação de um lípidio ionizável na monocamada interna de uma camada dupla de lípidio maximizará as forças electrostáticas repulsivas com as proteínas ionizáveis aprisionadas no compartimento aquoso rodeado pela camada dupla, ao mesmo tempo que minimiza a exposição dos lípidos com carga ao meio externo. Os lípidos ionizáveis podem acumular-se na monocamada interna de uma camada dupla de lípidio, estabelecendo um gradiente de potencial electroquímico, por exemplo, um gradiente de protões que atravessa a camada dupla, em conformidade com o procedimento de Hope *et al.* (Patente norte-americana N.º 5 204 112, (Publicação PCT N.º WO 87/07530 (12/17/87) e patente norte-americana N.º 5 252 263). Presentemente, prefere-se que o lípidio ionizável introduzido no lipossoma deste invento seja DPDAP (1,2-dipalmitoil-3-(N,N-dimetilamino)propano.

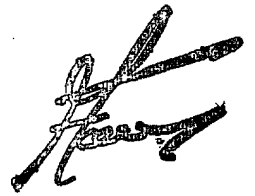
O presente invento proporciona ainda um lipossoma desidratado compreendendo uma defensina, no qual a defensina é uma defensina neutralizada. A desidratação do lipossoma permite que as vesículas sejam armazenadas durante períodos de tempo prolongados; estas podem depois ser reconstituídas numa base de "conforme necessário". Os lipossomas podem ser desidratados, com congelação, utilizando equipamento *standard* de criodessecagem, ou os seus equivalentes. Efectua-se a liofilização, de preferência, após a introdução de um ou mais açúcares protectores na preparação de lipossomas em conformidade com os procedimentos descritos por Schneider *et al.* (patente norte-americana N.º 4 229 360) e Janoff *et al.*, (patente norte-americana N.º 4 880 635 (Publicação PTC N.º WO 86/01103 (02/27/86)), cujo teor aqui se engloba como referência). O açúcar protector pode ser omitido se a desidratação for conduzida sem congelação e se for



deixada ficar água suficiente na preparação de lipossomas para manter a integridade de uma porção substancial das camadas duplas dos lipossomas ao longo do processo de desidratação – nova hidratação.

O presente invento também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um transportador farmaceuticamente aceitável e um lipossoma compreendendo uma camada dupla de lípido, um compartimento aquoso e uma defensina, na qual a defensina é uma defensina neutralizada. "Transportador farmaceuticamente aceitável" tal como aqui se usa significa qualquer um dos transportadores, diluentes, excipientes convencionais e outros do género geralmente destinados para usar com administração de agentes biologicamente activos a animais. Esses transportadores são bem conhecidos na arte e são geralmente escolhidos tendo em conta vários de factores, tais como a própria droga a ser usada e o modo de administração planeado, que são bem compreendidos pelos que são vulgares peritos na arte, ou que é de sua competência determinar. Os transportadores adequados incluem, mas não se limitam a, soluções de sais tais como solução salina fisiológica, soluções aquosas tamponadas, e outros do género. As composições farmacêuticas podem ainda compreender agentes auxiliares tais como conservantes, antioxidantes e outros no género, em quantidades e por razões, bem conhecidas dos que são vulgares peritos na arte. Pode-se proporcionar a composição farmacêutica como uma forma de dosagem unitária, que pode compreender uma quantidade anti-infecção eficaz ou anti-cancro eficaz da composição farmacêutica.

Podem-se utilizar as composições farmacêuticas que aqui se proporcionam, em métodos de tratamento ou prevenção de uma infecção num animal, por exemplo, um mamífero, de preferência um humano e com maior preferência, humanos, cujos sistemas imunitários foram comprometido, por exemplo, por vírus como o HIV, por quimioterapia ou transplante de órgãos. Estes métodos compreendem administrar ao animal uma quantidade anti-infecção eficaz da composição farmacêutica utilizada. A infecção pode ser uma infecção viral, bacteriana, fúngica, parasitária ou outro tipo de infecção microbiana que seja sensível a uma defensina. A reacção de organismos infecciosos a vários agentes anti-infecciosos pode ser determinada através de métodos facilmente disponíveis bem conhecidos dos peritos na arte, por exemplo, através de testes de sensibilidade microbiana.



Como objectos de tratamento, com os métodos deste invento, preferem-se presentemente as infecções fúngicas sensíveis a uma defensina, tais como as infecções por *Cryptococcus* e *Aspergillus* em animais. Consequentemente, em concretizações do invento presentemente preferidas, tratam-se para uma infecção por *Cryptococcus* ou uma infecção por *Aspergillus*, humanos imunocomprometidos, com uma defensina em lipossomas aqui proporcionada.

A acção da defensina, na generalidade, não é específica nem da espécie nem do tipo de célula. Ou seja, as defensinas de um animal podem ser activas num outro animal e podem induzir a citólise das células do outro animal. Uma determinada defensina pode também ser activa contra vários micróbios e tipos de células e geralmente não se limita à acção contra células específicas. Consequentemente, a prática deste invento contempla a administração de uma quantidade anti-infecção eficaz de uma defensina obtida originalmente de um tipo de animal, para um outro tipo de animal, para uma variedade de infecções microbianas ou cancro. Por exemplo, a indolicidina, derivada de neutrófilos bovinos, pode ser usada para tratar humanos.

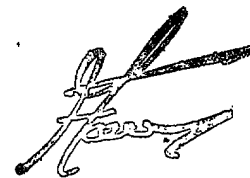
Os métodos de administração de composições farmacêuticas a animais incluem a administração intravenosa, intra-arterial, intra-ocular, intraperitoneal, intramuscular, intranasal, intravaginal, subcutânea, rectal e tópica. O modo de administração escolhido para uma determinada composição farmacêutica dependerá de vários factores bem conhecidos dos peritos na arte ou que é de sua competência determinar sem excessiva experimentação. Estes incluem, mas não se limitam a: indivíduo em tratamento e sua idade, tamanho e condição geral; agente activo a administrar; a doença, desordem ou condição a tratar. Presentemente, a via de administração preferida compreende administração intravenosa.

"Quantidade anti-infecção eficaz" de uma composição farmacêutica significa qualquer quantidade de uma composição farmacêutica que seja eficaz para inibir ou prevenir o estabelecimento, crescimento ou difusão de uma infecção sensível a uma defensina. Tipicamente, o "anti-infecção eficaz" da composição farmacêutica aqui proporcionada é uma quantidade contendo entre 1 mg de uma defensina em lipossomas por kg de peso do corpo do animal ao



qual se administra a composição e cerca 1000 mg por kg de peso do corpo; desejavelmente, a quantidade anti-infecção eficaz da composição farmacêutica contém cerca de 10 mg de uma defensina em lipossoma por kg de peso do corpo a cerca de 200 mg por kg. Dentro desta gama, a quantidade ou dose da composição farmacêutica fornecida a um determinado animal dependerá de vários factores bem conhecidos dos peritos na arte, ou que é de sua competência determinar sem excessiva experimentação. Estes incluem, mas não se limitam a: o tipo de infecção microbiana e o estágio da sua progressão; o sujeito e a sua idade, tamanho e condição geral; e a via de administração preferida da composição farmacêutica. A quantidade, em particular, da composição farmacêutica administrada para uma determinada doença, desordem ou condição indicada pode ser determinada por métodos bem conhecidos dos peritos na arte, por exemplo, por ensaios de variação da dose.

Proporciona-se aqui, ainda, um método para tratar um animal, por exemplo, um mamífero e de preferência um humano, que sofre de um cancro que reage a uma defensina, por exemplo, uma leucemia ou um linfoma. Este método compreende administrar ao animal uma quantidade anti-cancro eficaz da composição farmacêutica aqui proporcionada. Para os objectivos deste invento, uma "quantidade anti-cancro eficaz" de uma composição farmacêutica é qualquer quantidade da composição farmacêutica eficaz para inibir o estabelecimento, crescimento ou metástase de um tumor num animal. Tipicamente, a quantidade anti-cancro eficaz da composição farmacêutica é uma quantidade contendo entre 1 mg da defensina em lipossoma por kg de peso do corpo do animal a que se administra a composição e cerca de 1000 mg por kg de peso do corpo; desejavelmente, a quantidade anti-cancro eficaz da composição farmacêutica contém cerca de 10 mg de uma defensina em lipossoma por kg de peso de corpo a cerca de 200 mg por kg. Dentro desta gama, a quantidade ou dose da composição farmacêutica administrada a um determinado animal dependerá de vários factores bem conhecidos dos peritos na arte ou que é de sua competência determinar sem excessiva experimentação. Estes incluem, mas não se limitam a: tipo de infecção microbiana e a estágio da sua progressão; o sujeito e a sua idade, tamanho e condição geral; e a via de administração preferida. A quantidade, em particular, da composição farmacêutica administrada para a determinada doença, desordem ou condição indicada pode ser administrada por métodos bem conhecidos dos peritos na arte, por exemplo, ensaios de variação da dose.



O presente invento é ilustrado pelos exemplos que se seguem. No entanto, os peritos na arte facilmente compreenderão que estes exemplos são meramente descritivos do invento que se define nas reivindicações que seguem posteriormente.

Exemplos

Exemplo 1

Dispersão de luz pela indolicidina

Dissolveu-se indolicidina em várias concentrações em tampão HEPES 10 mM (pH 7,5), contendo NaCl 150 mM. Colocaram-se amostras em células de fluorescência e mediu-se a dispersão de luz a 500 nm (comprimento de onda de excitação) no fluorímetro, a um ângulo de 90 graus.

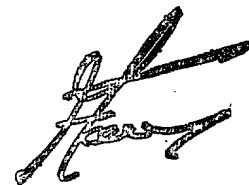
Os resultados (ver Figura 1) indicam que a indolicidina se auto-associa, em solução, a concentrações de cerca de 30 µg/ml e superiores. Essa auto-associação é favorável porque pode minimizar a exposição de regiões não polares de indolicidina às moléculas de água.

Exemplo 2

Fluorescência de indolicidina aquosa

Dissolveu-se indolicidina em tampão HEPES de pH 7,5 (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM); colocaram-se as soluções resultantes em células de fluorescência. Estabeleceu-se o comprimento de onda de excitação em 285 nm; fez-se um varrimento de comprimentos de onda de emissão de 325 nm a 450 nm. Representou-se a área sob da curva de emissão em função da concentração de indolicidina (ver Figura 2). Alteraram-se as larguras da fenda entre concentrações mais altas e mais baixas; avaliaram-se as concentrações intermédias com ambas as larguras de fenda para assegurar uma normalização adequada.

Os resultados mostram que a fluorescência de indolicidina em solução aquosa aumentou linearmente com a concentração de indolicidina até 0,5 µg/ml, mas depois desviou-se para um declive mais íngreme entre concentrações de 0,5 µg/ml e 50 µg/ml. Acima de 50 µg/ml, o declive diminuiu.



Estes desvios reflectem alterações na auto-associação intermolecular das moléculas de indolicidina, a diferentes concentrações de indolicidina.

Exemplo 3

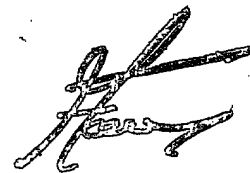
Preparação de lipossomas unilamelares de POPC/indolicidina

Secou-se, num evaporador rotativo, uma solução de indolicidina/POPC (1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina; 0,085:1 (p/p) de indolicidina/POPC) e depois hidratou-se de novo com tampão (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) de modo a formar uma suspensão de lipossomas multilamelares. Submeteram-se os lipossomas a extrusão através de um filtro com poros de 100 nm para produzir vesículas unilamelares grandes (LUV; ver Cullis *et al.*, Patente norte-americana N.º 5 008 050 e Loughrey *et al.*, Patente norte-americana N.º 5 059 421, cujo teor aqui se inclui como referência).

Exemplo 4

Preparação de lipossomas multilamelares de DSPC/Chol

Misturou-se indolicidina (66 mg em etanol), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC; 56 mg em clorofórmio) e colesterol (Chol; 19 mg em clorofórmio), e depois adicionaram-se 3 ml de tampão (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Levou-se a mistura resultante quase até à secura num balão de fundo redondo, e hidrataram-se de novo os lípidos secos com metanol e 1 ml de água de modo a formar uma suspensão de lipossomas multilamelares (MLV). Colocou-se a suspensão de MLV num evaporador de vácuo rotativo e secou-se a 45° Celsius, com vácuo total, até se obter uma pasta. Depois, arrefeceu-se a amostra, e adicionaram-se 10 ml de tampão HEPES. Transferiu-se a solução resultante para um tubo de 30 ml e agitou-se com vórtice. Centrifugou-se esta preparação com rotação de 12000 g durante 10 minutos. Os lipossomas formaram peletes; retiraram-se o sobrenadante acima da pelete, e substituiu-se por solução tampão fresca. Repetiu-se esta lavagem por centrifugação mais quatro vezes, num total de cinco lavagens, fazendo-se novamente a suspensão da pelete final, compreendendo lipossomas multilamelares possuindo distribuição interlamelar de soluto substancialmente igual, num volume total de 1,7 ml.



Exemplo 5

Retenção de indolicidina em lipossomas contendo fosfatidilcolina

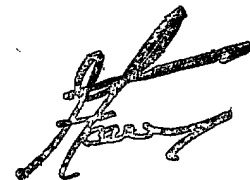
Prepararam-se lipossomas contendo indolicidina e, ou POPC, POPC/Chol, DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), ou DPPC/Chol, usando soluções de indolicidina/tampão possuindo 13-28 microgramas por mililitro de indolicidina, e soluções de lípido em concentrações de 1,5-2,5 mM. Secaram-se as soluções de lípido por evaporação rotativa; adicionou-se a solução de indolicidina aos lípidos secos de modo a formar uma dispersão de vesículas multilamelares (MLV). Depois, submetem-se essas MLV a sete ciclos de descongelação livre (ver Cullis *et al.*, Patente norte-americana N.º 4 975 282, cujo teor aqui se inclui como referência) de modo a produzir lipossomas multilamelares com distribuição interlamelar de soluto substancialmente igual. Retirou-se das preparações de lipossoma a indolicidina não aprisionada; mediram-se as concentrações inicial e final de indolicidina, dissolvendo amostras em etanol e lendo as absorvâncias a 280 nm num espectrofotómetro de UV.

Os dados (ver Figura 3) demonstram que os lipossomas contendo POPC retiveram a maior percentagem de indolicidina após 48 horas (cerca de 95% da quantidade inicialmente aprisionada), que os lipossomas contendo DPPC retiveram menos (cerca de 75%), que os lipossomas de POPC-Chol retiveram cerca de 55% e que os lipossomas de DPPC-Chol retiveram cerca de 20-30%.

Exemplo 6

Retenção de indolicidina em lipossomas contendo DOPE

Dissolveu-se indolicidina (6 mg) em 1 ml de etanol. Este combinou-se com solução de reserva de DOPE a 20 mg/ml para formar quatro amostras: **I**: 2 mg de DOPE/ 1 mg de indolicidina; **II**: 2 mg de DOPE/ 3 mg de indolicidina; **III**: 2 mg de DOPE/ 6 mg de indolicidina; e **IV**: 2 mg de DOPE/ 0 mg de indolicidina. Secaram-se as amostras por evaporação rotativa a 30°C, e depois hidrataram-se de novo com 1 ml de tampão HEPES de modo a formar lipossomas multilamelares. Combinaram-se quantidades alíquotas (25 µl) com 25 µl de tampão HEPES e 950 µl de etanol numa célula de quartzo. Mediu-se a concentração de indolicidina inicial, e a concentração que ficou nas vesículas após sucessivas lavagens, dissolvendo amostras de lipossomas em etanol e lendo as absorvâncias a 280 nm. Determinaram-se as concentrações de lípido



através de um ensaio padrão de fosfato (ver Chen *et al.*, *Anal. Chem.* 28:1956 (1956)).

Os dados (ver Figura 4) mostram que a percentagem em moles de indolicidina nos lipossomas contendo DOPE aumentou com a lavagem, e atingiu cerca de 50 por cento em moles na preparação final.

Exemplo 7

Efeito da indolicidina na perda pelos lipossomas de DSPC/Chol

Secou-se uma solução de DSPC (60 mg) e colesterol (20 mg) por evaporação rotativa; hidrataram-se de novo os lípidos secos com 2 ml de tampão (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM), contendo 0,5 mM da sonda CAT1 (4-trimetilamonio-2,2,6,6-tetrametilpiperidino-1-oxiliodeto) de modo a formar uma suspensão de lipossomas multilamelares contendo a sonda. Aqueceu-se depois uma suspensão destas vesículas durante 10 minutos a 65°C. Lavou-se a amostra quatro vezes com tampão HEPES e suspendeu-se de novo em tampão num volume final de 2 ml. Preparou-se também uma solução de reserva de indolicidina (20 mg/ ml) em tampão HEPES. Combinaram-se várias quantidades desta solução (ver Quadro 1, abaixo) com uma quantidade alíquota (100 µl) da preparação de lipossomas, sendo depois adicionado tampão para perfazer o volume final até 0,2 ml. Submeteram-se as amostras a microcentrifugação, e transferiram-se os sobrenadantes para tubos de ESR. Mediram-se os espectros à temperatura ambiente (23°C) para determinar a concentração da sonda nas amostras de sobrenadante (ver Perkins *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 943:103 (1988)).

Os dados (ver Quadro 1, abaixo) indicam a percentagem de sonda encontrada no sobrenadante, e portanto, a percentagem de perda pelos lipossomas de DSPC/Chol. Os resultados mostram que o aumento da concentração de indolicidina nos lipossomas de DSPC/Chol, não aumentou significativamente a perda de sonda.



QUADRO 1
EFEITO DA INDOLICIDINA NA PERDA DE SONDA PELOS
LIPOSSOMAS DE DSPC/CHOL

μl de indolicidina	μl de lípidos	μl de tampão	% em moles de indolicidina	% de sonda no sobrenadante	% de perda de sonda
0,00	100,00	100,00	0,00	4,39	0
3,20	100,00	96,80	0,42	6,14	1,75
6,30	100,00	93,70	0,82	6,14	1,75
12,50	100,00	87,50	1,61	5,26	0,87
25,00	100,00	75,00	3,16	6,14	1,75
50,00	100,00	50,00	6,16	7,02	2,63
75,00	100,00	25,00	8,93	6,14	1,75
100,00	100,00	0,00	11,59	N/D	N/D

N/D: dados não disponíveis.

Exemplo 8

Efeito da indolicidina na perda por lipossomas de DSPC/Chol/DDAB

Secou-se uma solução de DSPC (51,6 mg), colesterol (20,2 mg) e brometo de dimetildiocetadecilamónio (DDAB; 8,23 mg) num balão de fundo redondo. Hidrataram-se de novo os lípidos com tampão (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM) contendo 0,5 mM da sonda CAT1 de modo a formar uma suspensão de lipossomas multilamelares. Aqueceu-se a suspensão a 65°C durante 10 minutos e depois lavou-se duas vezes em 10 ml de tampão HEPES, compreendendo a pelete final lipossomas multilamelares de DSPC/Chol/DDAB contendo CAT1, efectuando-se de novo a sua suspensão em tampão HEPES até ao volume final de 2 ml. Efectuou-se um ensaio de padrão de fosfato (ver Chen *et al.*, *Anal. Chem.* 28:1956 (1956)) para determinar a quantidade de lípido que ficou (34,12 mg). Preparou-se também uma solução de reserva de indolicidina a 20 mg/ml em tampão HEPES.

Combinaram-se várias quantidades desta solução (ver Quadro 2, abaixo) com quantidades alíquota (100 μl) da suspensão de lipossomas, sendo o volume final das amostras perfeito até 0,2 ml com tampão HEPES. Centrifugaram-se estas amostras, e utilizaram-se quantidades alíquotas dos



sobrenadantes para determinação de espectros de RSE (23°C) para medir a perda de sonda. Adicionou-se uma pequena quantidade de agente "alargante" às duas amostras com as concentrações de indolicidina mais elevadas. Apresentam-se os resultados no Quadro 2.

QUADRO 2

EFEITO DA INDOLICIDINA NA PERDA DE SONDA CAT1 PELOS LIPOSSOMAS DE DSPC/CHOL/DDAB

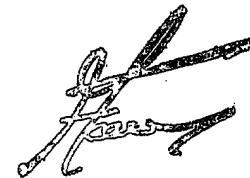
μl de indolicidina	μl de preparação de lipossomas	μl de tampão	% em moles de indolicidina	% de sonda no sobrenadante
0,00	100,00	100,00	0,00	6,22
3,20	100,00	96,80	0,48	8,00
6,30	100,00	93,70	0,93	8,00
12,50	100,00	87,50	1,84	9,78
25,00	100,00	75,00	3,61	10,67
50,00	100,00	50,00	6,99	9,78
75,00	100,00	25,00	10,09	0*
100,00	100,00	0,00	13,04	0*

*: Corrigidos para quaisquer lipossomas que possam estar no sobrenadante.

Exemplo 9

Aprisionamento da indolicidina em lipossomas contendo DSPC/Chol ou POPC/Chol.

Formaram-se lipossomas misturando ou DSPC e colesterol, ou POPC e colesterol, e indolicidina em razões (p/p) de indolicidina : lípido de 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6, dissolvendo a mistura em solvente orgânico, retirando o solvente por evaporação e depois hidratando a preparação seca com tampão HEPES 10 mM de modo a formar lipossomas multilamelares. Retirou-se a indolicidina não aprisionada passando as preparações de lipossomas através de uma coluna. Determinaram-se as concentrações de indolicidina dissolvendo as preparações de lipossoma em etanol e lendo as absorvâncias a 280 nm. Determinaram-se as concentrações de lípido através de um ensaio padrão de fosfato (ver Chen *et al.*, *Anal. Chem.* 28:1956 (1956)). Apresentam-se os dados no Quadro 3,



abaixo.

QUADRO 3

APRISIONAMENTO DE INDOLICIDINA EM LIPOSSOMAS DE DSPC/CHOL₂

Indolicidina : lípido (p/p)	% de indolicidina aprisionada após a diálise
0,1	90,0
0,2	18,8
0,4	9,9
0,6	15,6

Exemplo 10

Fluorescência de indolicidina livre e em lipossomas.

Prepararam-se lipossomas hidratando as preparações secas de POPC, POPC/Colesterol (3:2), DPPC e DPPC/Chol (3:2) (40 mg de lípido cada) com 8 ml de tampão HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) de modo a formar vesículas multilamelares. Submeteram-se essas MLV a extrusão através de 2 filtros de polycarbonato empilhados possuindo poros de 0,1 μ m, a 50°C. Diluíram-se quantidades alíquota de cada amostra até uma concentração de lípido de 0,1 mg/ml, e mediram-se os espectros de fluorescência. Também se mediram os perfis de fluorescência após a adição de indolicidina às amostras de lipossoma, até uma concentração final de indolicidina de 0,5 μ g/ml. Subtraíram-se os valores do espectro obtidos para lipossomas sem adição de indolicidina do espectro obtido após a adição de indolicidina, a fim de corrigir a dispersão. Obteve-se também o perfil de fluorescência de indolicidina livre no tampão. Estabeleceu-se o comprimento de onda de excitação a 285 nm; avaliaram-se os perfis de emissão de 325 nm a 450 nm.

Os resultados (ver Figura 6) indicam que a indolicidina tem uma maior afinidade pelas camadas duplas (E) de POPC (insaturado) do que pelas camadas duplas (C) de DPPC (saturado) (existe uma maior diferença entre a fluorescência relativa de indolicidina livre (A) e indolicidina associada a POPC do que existe entre a fluorescência relativa de indolicidina livre e indolicidina associada a DPPC). A adição de colesterol (que confere rigidez à membrana) tanto a POPC (D) como DPPC (B) diminuiu a afinidade da indolicidina por estes sistemas. O aumento da fluorescência e desvio no azul nos perfis de emissão indica que a



indolicidina se liga mais profundamente nas camadas duplas de POPC do que no caso de qualquer dos outros sistemas examinados.

Exemplo 11

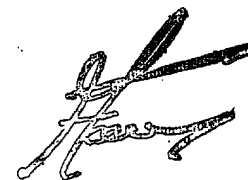
Parâmetros de ordem

Efectuaram-se estudos de parâmetro de ordem para examinar o efeito da indolicidina na ordem das camadas duplas de lípido. Prepararam-se lipossomas contendo DPPC, DSPC, DSPC/Chol (3:2), DHPC (di-hexadecilfosfatidilcolina), POPC, POPC/Chol/DOTAP (dioleoiltrimetilamoniopropano) (5:4:1), POPC/DOTAP e DSPC/Chol/DDAB (brometo de dimetildiocetadecilamónio) – indolicidina contendo várias percentagens em moles de indolicidina e um por cento em moles do marcador de *spin* 1-palmitoil-2-(12-doxilestearoil)fosfatidilcolina. Preparou-se uma solução de reserva de indolicidina (20 mg/ml) em tampão HEPES. Combinaram-se os lipossomas e a indolicidina a várias razões molares de lípido para indolicidina. Combinou-se DPPC (99 mg), DSPC (99 mg), DSPC/Chol (74 mg/24 mg), POPC, DOTAP (90 mg/10 mg), POPC (99 mg), POPC/DOTAP/Chol (62 mg/11 mg/25 mg) e DHPC (99 mg) com 1 mg do marcador de spin em solvente orgânico de modo a formar soluções. Secaram-se as soluções resultantes em balões de fundo redondo, e hidrataram-se de novo os lípidos secos com 2,5 ml de tampão HEPES de modo a formar lipossomas (MLV). Transferiram-se as amostras de lipossoma resultante para criotubos para cinco ciclos de congelação-descongelação (ver Cullis *et al.*, patente norte-americana N.º 4 975 282). Combinaram-se os lipossomas com quantidades alíquota da solução de reserva de indolicidina para originar lipossomas com várias percentagens em moles de indolicidina. Aqueceram-se, depois, as formulações resultantes de indolicidina em lipossomas acima da sua temperatura de transição de fase. Mediu-se o espectro de RSE a 23 graus Celsius (temperatura ambiente). Usaram-se os dados para determinar os parâmetros de ordem dos vários sistemas de indolicidina em lipossomas (ver Figura 7).

Exemplo 12

Introdução de lípidos com carga positiva nas monocamadas internas das camadas duplas de lipossomas

Preparou-se tampão HEPES (HEPES 500 mM, pH 7,4) e um tampão de



citrato 500 mM; utilizam-se esses tampões para preparar tampões de 290 mOsM de HEPES (pH 7,4) e 290 mOsM de citrato (pH 5,3).

Prepararam-se seis sistemas de lípidos com os seguintes lípidos: I: POPC – 90% em moles/estearilamina (SA) –10% em moles (pH 5,3): 96,23 mg de POPC e 3,79 mg de SA; II: POPC –90% em moles/ SA –10% em moles (pH 7,3); III: DSPC –50% em moles/Chol –40% em moles/ SA –10% em moles (pH 5,3): 68,55 mg de DSPC, 26,84 mg de colesterol, 4,68 mg de SA; IV: DSPC – 50% em moles/Chol –40% em moles/ SA –10% em moles (pH 7,3); V: DSPC –60% em moles/Colesterol –40% em moles (pH 7,3); e VI: POPC (pH 7,3). Secam-se as soluções contendo estes lípidos, e faz-se de novo a suspensão dos lípidos secos, como indicado, num dos tampões de 290 mOsM de modo a formar lipossomas multilamelares. Submetem-se então estes lipossomas a extrusão através de filtros (ver Cullis et al., Patente norte-americana N.º 5 008 050 e Loughrey et al., Patente norte-americana N.º 5 059 421, cujo conteúdo se inclui aqui como referência) como se segue: POPC: cinco vezes à temperatura ambiente, tamanho de poro do filtro = 200 nm; DSPC/Chol: três vezes através de filtros de 800 nm (65 graus Celsius) e depois cinco vezes através de filtros de 200 nm (65 graus Celsius).

Combinaram-se volumes iguais (250 µl) de preparações dos lipossomas de pH 5,3 (lipossomas formados por hidratação de lípidos secos no tampão de citrato de pH 5,3) e de um tampão HEPES de pH 11,92 de tal forma que o pH final era cerca de 7,3. Estes lipossomas, compreendendo compartimentos interiores aquosos ácidos relativamente ao meio aquoso exterior, têm um gradiente de pH através das suas camadas duplas. Misturaram-se as preparações de lipossomas formados no tampão de pH 7,3 com um volume igual (250 microlitros) do mesmo tampão de pH 7,3 e não possuíam um gradiente de pH que achesse a membrana.

Os lípidos com carga podem geralmente acumular-se numa das monocamadas de uma camada dupla de lípido em resposta a um gradiente de pH aplicado através da camada dupla. Os lípidos com carga podem, deste modo, distribuir-se irregularmente entre as monocamadas interna e externa, ou seja, podem ter uma distribuição assimétrica na camada dupla (ver Hope et al., Patentes norte-americanas N.ºs 5 204 112 e 5 252 263, cujo teor se inclui aqui como referência). Os lípidos tais como a estearilamina (SA) podem geralmente



acumular-se na monocamada interna de uma camada dupla de lípido em resposta a um gradiente de pH situado atravessando a camada dupla, onde o compartimento aquoso interior é ácido relativamente ao meio externo e tem um pH inferior ao pKa do lípido na camada dupla.

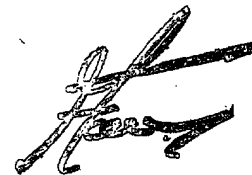
Agitaram-se com vórtice as amostras de lipossomas de pH 5,3 e pH 7,3 e depois incubaram-se à temperatura ambiente (lipossomas contendo POPC: 10 minutos; lipossomas contendo DSPC/Chol: 1 hora). Retirou-se uma pequena quantidade alíquota de cada amostra e reservou-se para utilizar num ensaio padrão de fosfato (ver Chen *et al.*, *Anal. Chem.* 28:1956 (1956)) para medir a concentração de lípido. A seguir, adicionaram-se a cada tubo 200 μ l de uma solução de poli(ácido aspártico) a 1%, que depois se deixou repousar durante 10 minutos antes de se registar a absorvância a 550 nm.

Apresentam-se os resultados no Quadro 4 (ver abaixo). Uma diminuição na absorvância em relação aos valores de controlo indica que o lípido com carga (estearilamina) se acumula na monocamada interna da camada dupla de lípido. Os resultados mostram que para os lipossomas de POPC, a estearilamina se acumula na monocamada interna em resposta a um gradiente de pH através da camada dupla, na qual o interior do lipossoma é ácido relativamente ao exterior. A deslocação da estearilamina através das camadas duplas de DSPC/Chol desde a monocamada externa até a monocamada interna requer mais tempo, devido à rigidez das camadas duplas de DSPC/Chol.

QUADRO 4

ABSORVÂNCIA DE FORMULAÇÕES DE ESTEARILAMINA EM LIPOSSOMA EM
RESPOSTA A GRADIENTES DE PH ATRAVÉS DA MEMBRANA.

Amostra	$\text{PH}_{\text{int}}/\text{PH}_{\text{ext}}$	Absorvância a 550 nm
DSPC/Chol	7,3/7,3	0,669
DSPC/Chol/SA	7,3/7,3	0,330
DSPC/Chol/SA	5,3/7,3	0,530
POPC	7,3/7,3	0,109
POPC/SA	7,3/7,3	0,645
POPC/SA	5,3/7,3	0,104



Exemplo 13

Aprisionamento de indolicidina em lipossomas com carga positiva

Preparam-se lipossomas de DSPC/Chol/DDAB (50 por cento em moles de DSPC, 40 por cento em moles de Colesterol, 10 por cento em moles de DDAB) dissolvendo 3,59 mg de DSPC, 1,54 mg de colesterol e 0,631 mg de DDAB em solvente orgânico num balão de fundo redondo de 100 ml. Adiciona-se tampão HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM) ao balão e submete-se a amostra a evaporação rotativa para retirar o solvente orgânico. Adicionam-se mais 5 ml de tampão HEPES ao balão, que depois se aquece até 65°C. Adicionam-se ainda 4 ml de tampão HEPES, e centrifuga-se a amostra a 20 000 rpm durante 20 minutos. Decanta-se o sobrenadante e reserva-se; lava-se de novo a pelete mais quatro vezes. Faz-se novamente a suspensão da pelete final em tampão HEPES num volume final de 1 ml. Determinam-se as concentrações de lípido por ensaio de padrão de fosfato. Determinam-se as concentrações de indolicidina por espectroscopia de absorção a 280 nm.

Exemplo 14

Actividade hemolítica de lipossomas contendo Fosfatidilcolina/indolicidina.

Prepararam-se lipossomas de POPC e DPPC contendo indolicidina em conformidade com os procedimentos descritos acima, mas sem os ciclos de congelação-descongelação, ou no caso de vesículas de interdigitação-fusão (IF), com o procedimento divulgado em (Janoff *et al.*, N.^{os} de série U.S. 07/961 277 e 08/066 539, apresentados em 14 de Outubro, 1992 e 24 de Maio, 1993, respectivamente, cujos teores se incluem aqui como referência). Combinaram-se amostras de glóbulos vermelhos (RBC) com estes lipossomas, e mediu-se o grau de hemólise induzida.

O ensaio de hemólise utilizado mede o nível de hemoglobina no sobrenadante das amostras de RBC, sendo a quantidade de hemoglobina libertada para o sobrenadante indicativa dos danos nas membranas dos glóbulos vermelhos induzidos pelas defensinas em lipossomas. O ensaio de hemólise utilizou solução salina tamponada com fosfato (PBS), glóbulos vermelhos humanos, tubos de poliestireno e células descartáveis concebidas para usar em espectrofotómetros de UV. Colocaram-se aproximadamente 3 ml de RBC compactadas num tubo de 15 ml, ao qual se adicionou 10 ml de PBS. Fez-se

uma suspensão de RBC, e centrifugou-se a suspensão durante 10 minutos a 4 000 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante acima da pelete, e adicionou-se mais PBS. Repetiu-se este processo de lavagem até que o sobrenadante ficou praticamente límpido. Fez-se a suspensão de dois ml da pelete de RBC final em 48 ml de PBS. Dividiu-se a suspensão de RBC resultante por um conjunto de tubos de ensaio (0,5 ml de suspensão de RBC por tubo), nos quais se adicionou mais tampão e lipossomas de POPC/indolicidina ou de DPPC/indolicidina. Taparam-se os tubos e agitaram-se com vórtice e depois incubaram-se durante 20 horas num agitador dentro de uma incubadora a 37°C. Após esta incubação, centrifugaram-se os tubos a baixa velocidade (<3000 rpm) durante 10 minutos. Colocou-se uma quantidade alíquota (0,2 ml) do sobrenadante de cada tubo numa célula na qual se adicionou 1,0 ml de água. Determinaram-se os níveis de hemoglobina nos sobrenadantes medindo a absorvância a 550 nm, e apresentam-se como percentagem de hemólise em relação aos controlos. O controlo de zero por cento de hemólise compreendeu RBC e tampão HEPES (a mesma composição de tampão em que se efectuou a suspensão dos lipossomas contendo indolicidina); o controlo de cem por cento de hemólise compreendia RBC e água destilada.

A Figura 8 representa a percentagem de hemólise induzida por indolicidina livre (quadrados a branco), assim como por lipossomas de POPC/indolicidina (triângulos a branco), lipossomas de DPPC/indolicidina (círculos a branco) e lipossomas de interdigitação-fusão (IF) de DPPC/indolicidina (círculos a cheio). Os dados mostram que o aprisionamento nos lipossomas atenuam a actividade hemolítica da indolicidina, ou seja, existe uma redução na percentagem de hemólise, quando comparada com a forma livre da defensina.

Exemplo 15

Actividade hemolítica de lipossomas de POPC/indolicidina com vários níveis de indolicidina.

Prepararam-se lipossomas de POPC/indolicidina, contendo várias concentrações de indolicidina (percentagens em moles) secando uma solução de POPC/solvente orgânico, e hidratando novamente a solução com um tampão contendo indolicidina de modo a formar lipossomas multilamelares. Depois, transferiram-se amostras de lipossomas para criotubos e congelaram-se e



descongelaram-se cinco vezes (ver Cullis *et al.*, patente norte-americana N.º 4 975 282, cujo teor se inclui aqui como referência) para produzir vesículas multilamelares possuindo distribuição interlamelar de soluto substancialmente igual.

Determinaram-se as concentrações inicial e final de lípido através de um ensaio padrão de fosfato (ver Chen *et al.*, *Anal. Chem.* 28:1956 (1956)). Determinaram-se as concentrações inicial e final de indolicidina medindo a absorvância a 280 nm. A figura 9 apresenta a percentagem de hemólise de RBC induzida por indolicidina livre (quadrados a cheio), assim como as várias formulações de lipossomas de indolicidina/POPC testadas (3,8% em moles de indolicidina: triângulos a cheio; 2,5% em moles: asteriscos; 1,8 por cento em moles: círculos a cheio; 1,0 por cento em moles: quadrados a cheio; e 0,4 por cento em moles: triângulos a cheio).

Exemplo 16

Actividade hemolítica de lipossomas de DPPC/indolicidina (8,27 por cento em moles de indolicidina).

Adicionou-se etanol (361 µl) a quinhentos µl de vesículas unilamelares de DPPC pequenas (SUV), a uma concentração de lípido de 60 mg/ml de modo a formar um gel. Depois, adicionaram-se mais 1,2 ml da preparação de SUV de DPPC, junto com indolicidina, agitando com vórtice. Aqueceu-se e arrefeceu-se a mistura, e depois lavou-se cinco vezes. Determinaram-se as concentrações de lípido nas amostras inicial e final através de um ensaio padrão de fosfato (ver acima). Determinaram-se as concentrações de indolicidina nas amostras inicial e final por absorvância a 280 nm.

Realizaram-se os ensaios de hemólise da forma descrita acima (ver Exemplo 14). Os resultados (ver Quadro 5, abaixo) indicam que o aumento dos níveis (mg/ml) de indolicidina (8,27% em moles em lipossomas contendo DPPC) nas amostras de RBC resultou num nível de hemólise aumentado.

QUADRO 5

Concentração de indolicidina na amostra de RBC (mg/ml)	% de hemólise média
2,73	163,44
1,365	144,34
0,6825	151,36
0,3413	149,115
0,1706	136,23
0,0853	58,3585
0,0427	10,9092
0,0213	6,71085
0,0107	2,68485
0,0053	1,13195

Exemplo 17

Actividade hemolítica de lipossomas de DSPC/Chol/indolicidina.

Prepararam-se lipossomas de DSPC/Chol/indolicidina (concentração final de indolicidina = 4,8 por cento em moles de indolicidina) dissolvendo 11,85 mg de DSPC, 3,87 mg de colesterol e 20 mg de indolicidina em solvente orgânico num balão de fundo redondo, e depois secando a solução por evaporação rotativa. Hidrataram-se de novo os lípidos com 4 ml de tampão HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), e transferiu-se a suspensão de lipossomas resultante para um tubo de centrifuga. Lavou-se o balão com tampão, e adicionou-se tampão ao tubo de centrifuga. Lavaram-se esses lipossomas com tampão HEPES cinco vezes, e fez-se novamente a suspensão da pelete final em 3 ml de tampão HEPES. Preparou-se o controlo de indolicidina livre (não aprisionada) dissolvendo 2 mg de indolicidina em 1 ml de HEPES.

Mediram-se as concentrações inicial e final de indolicidina por absorvância a 280 nm. Determinaram-se as concentrações inicial e final de lípido através de um ensaio padrão de fosfato (ver Chen *et al.*, *Anal. Chem.* 28:1956 (1956)). Usaram-se os lipossomas em ensaios de hemólise, efectuados de acordo com os procedimentos previamente descritos (ver Exemplo 14). Apresentam-se os dados (ver Figura 10 e Quadro 6) como percentagem de hemólise induzida por indolicidina livre (quadrados a cheio) bem



como percentagem de hemólise induzida pela formulação de lipossomas de DSPC/Chol/indolicidina (círculos a cheio), para várias concentrações de indolicidina nas amostras de RBC.

QUADRO 6

Ensaio de hemólise de DSPC/Chol/indolicidina.

LIPOSSOMAS* DE DSPC/CHOL/INDOLICIDINA		INDOLICIDINA LIVRE	
Concentração de indolicidina (mg/ml)	Percentagem de hemólise	Concentração de indolicidina (mg/ml)	Percentagem de hemólise
0,77	110,56	2,00	140,23
0,38	42,57	1,00	146,40
0,19	10,94	0,50	152,32
0,10	4,77	0,25	96,13
0,05	2,17	0,13	56,45
0,02	1,50	0,06	24,19
0,01	0,95	0,03	8,32
0,01	0,40	0,02	4,16
0,003	1,24	0,008	1,08
0,002	0,32	0,004	0,89

* 4,77 por cento em moles de indolicidina.

Exemplo 18

Actividade hemolítica de lipossomas de DSPC/Chol (sem indolicidina).

Prepararam-se lipossomas de DSPC/Chol e DSPC/Chol/DDAB dissolvendo os lípidos em clorofórmio e depois adicionando metanol, usando dois volumes de metanol por volume de clorofórmio, de modo a formar uma monofase (ver Fountain *et al.*, Patente norte-americana N.º 4 588 578). Adicionaram-se separadamente duas porções de 0,5 ml de tampão HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), com agitação após cada adição. Evaporaram-se por rotação as amostras à temperatura ambiente, e depois a 60°C, para retirar o solvente. Hidrataram-se de novo as amostras secas com tampão HEPES até um volume final de 4 ml de modo a formar lipossomas multilamelares possuindo distribuição interlamelar de soluto substancialmente igual. Combinaram-se estes

lipossomas com suspensões de RBC, e efectuaram-se ensaios de hemólise em conformidade com os procedimentos descritos acima (ver Exemplo 10) para medir as propriedades hemolíticas dos lípidos. Os dados (ver figura 11 e Quadro 7, abaixo) mostram a percentagem de hemólise induzida a várias concentrações de lípido, sem indolicidina nas preparações.

QUADRO 7

ACTIVIDADE HEMOLÍTICA DE LÍPIDO.

DSPC/Chol		DSPC/Chol/DDAB	
mM de lípido	% de hemólise	mM de lípido	% de hemólise
9,31	1,46	5,95	37,14
4,66	-0,21	2,98	15,11
2,33	0,90	1,49	3,03
1,16	-0,33	0,74	1,13
0,58	-0,27	0,37	0,35
0,29	-0,77	0,19	0,46
0,15	0,01	0,09	0,07
0,07	-0,94	0,05	0,35
0,04	0,85	0,02	-0,55
0,02	-1,05	0,01	-0,38

Exemplo 19

Actividade hemolítica de lipossomas de indolicidina/DOPE.

Prepararam-se lipossomas de DOPE/indolicidina secando uma solução de indolicidina/DOPE/solvente orgânico, num balão de fundo redondo, por evaporação rotativa. Fez-se novamente a suspensão dos lípidos secos em 2 ml de tampão HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM). Preparou-se um controlo de indolicidina livre (não aprisionada) dissolvendo 2 mg de indolicidina em 1 ml de tampão HEPES. Determinaram-se as concentrações de lípido por ensaio de fosfato (ver Chen *et al.*, *Anal. Chem.* 28:1956 (1956)); determinaram-se as concentrações de indolicidina medindo absorvâncias a 280 nm. Os dados (ver Figura 12 e Quadro 8, abaixo) mostram que a hemólise aumentou, na generalidade, com o aumento da concentração de indolicidina, tanto para as formas de indolicidina em lipossomas como para as formas de indolicidina livre, e que aproximadamente às mesmas concentrações nas amostras de RBC, a indolicidina aprisionada em lipossomas de DOPE induziu praticamente a mesma



percentagem de hemólise que a indolicidina não aprisionada.

QUADRO 8

ACTIVIDADE HEMOLÍTICA DE LIPOSSOMAS DE DOPE/INDOLICIDINA.

LIPOSSOMAS* DE DOPE/INDOLICIDINA		INDOLICIDINA LIVRE	
Concentração de indolicidina (mg/ml)	Percentagem de hemólise	Concentração de indolicidina (mg/ml)	Percentagem de hemólise
3,83	113,45	2,00	82,44
1,92	114,91	1,00	100,90
0,96	122,46	0,50	116,16
0,48	124,65	0,25	84,53
0,24	116,14	0,13	40,81
0,12	70,65	0,06	16,89
0,06	34,38	0,03	7,70
0,03	13,92	0,02	0,80
0,01	5,96	0,008	-1,01
0,007	1,88	0,004	-0,79

* 39,55 por cento em moles de indolicidina.

Exemplo 20

Toxicidade *in vitro* de indolicidina em lipossomas

Prepararam-se lipossomas dissolvendo 1 mg de indolicidina em metanol e misturando a solução resultante com uma solução de POPC (11,7 mg) em clorofórmio (razão (p/p) de indolicidina : lípido de 0,85:1). Removeram-se os solventes orgânicos em vácuo usando um evaporador rotativo. Hidratou-se a mistura seca de lípido/indolicidina com tampão HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Submeteu-se dez vezes a preparação resultante a extrusão através de filtros *Nucleopore* duplamente empilhados de 0,1 µm usando um dispositivo extrusor (Lipex, Vancouver, CA).

Mediu-se a inibição específica da proliferação *in vitro* de células CHO/K1 pela indolicidina livre, pelos lipossomas vazios (sem indolicidina) ou pela indolicidina em lipossomas usando um teste de incorporação de timidina.

Colocaram-se as células CHO/K1 (20 000 células por poço) em placas de microtitulação de 96 poços com fundo plano num meio RPMI-1640 suplementado com FBS a 10%, e mantiveram-se a 37°C numa atmosfera húmida a 5% de CO₂. Expuseram-se as células a várias concentrações de lipossomas vazios, solução salina tamponada com fosfato (PBS), indolicidina livre ou indolicidina em lipossomas e deixaram-se em cultura durante 4 horas a 37°C. As células tratadas com várias as formulações de indolicidina foram submetidas a pulsos, durante mais oito horas, com 0,5 µCi/poço de [³H]timidina (actividade específica 50 Ci/mmol) (ICN Biomedicals, USA). Colheram-se as células num papel de filtro 934AH com um aparelho de colheita Brandel M-96 (Brandel, MD, USA). Determinou-se a incorporação de [³H]timidina por contagem de cintilação líquida.

Os resultados (ver Figura 13) mostram que para todas as concentrações usadas, a indolicidina em lipossomas permitiu um maior grau de crescimento celular, isto é, foi menos tóxica do que a indolicidina livre.

Exemplo 21

Toxicidade *in vivo*.

Injectaram-se quatro grupos com cinco ratinhos macho Balb/c (20-22 g) cada com várias doses (0,75-12 mg/kg) de indolicidina livre e várias doses (20-120 mg/kg) de indolicidina em lipossomas, em 0,2 ml de solução salina isenta de pirogénios através veia da cauda. Injectaram-se também ratinhos com solução salina e com lipossomas vazios. Observaram-se estes ratinhos quanto a toxicidade aguda, e determinou-se a dose LD₅₀ de indolicidina, a dose letal para 50 por cento da população de teste.

Os resultados (ver Quadro 9, abaixo) indicam que a LD₅₀ da indolicidina livre foi de 3 mg/kg enquanto que a da indolicidina em lipossomas foi de 80 mg/kg.



QUADRO 9
TOXICIDADE EM RATINHOS DE INDOLICIDINA LIVRE *VERSUS* INDOLICIDINA
EM LIPOSSOMAS

Dose de indolicidina (mg/kg)	Número de animais mortos
INDOLICIDINA LIVRE	
0,4	0/5
1,2	1/5
4,0	3/5
12,0	0/5
INDOLICIDINA EM LIPOSSOMAS	
20	0/5
40	0/5
80	1/5
160	5/5

Exemplo 22

Tratamento de infecções provocadas por *Aspergillus fumigatus* em ratinhos.

Injectaram-se ratinhos Balb/c macho cada um com 2×10^7 esporos de *Aspergillus fumigatus* por injeção na veia da cauda. Após seis horas, dividiram-se aleatoriamente os ratinhos em cinco grupos de 10 ratinhos cada. Tratou-se um grupo com 2 mg/kg de indolicidina livre, tratou-se o segundo grupo com 2 mg/kg de indolicidina em lipossomas; administrou-se ao terceiro grupo 40 mg/kg de indolicidina em lipossomas; tratou-se o quarto grupo com lipossomas vazios; e tratou-se o quinto grupo com 0,2 ml de tampão HEPES 10 mM. Seguiu-se a sobrevivência dos animais durante um período de 15 dias.

Os resultados (ver Figura 14) mostram que os ratinhos infectados com esporos de *A. fumigatus* e tratados quer com tampão quer com lipossomas vazios apresentaram quase as mesmas taxas de sobrevivência. A administração de indolicidina livre (2 mg/kg) resultou num ligeiro aumento dos tempos de sobrevivência. A indolicidina em lipossomas, à mesma concentração de indolicidina, consegue um aumento ainda maior dos tempos de sobrevivência.

84 331
EP O 725 629/PT

42

Trinta por cento dos ratinhos tratados com 40 mg/ml de indolicidina estavam vivos no final do período de tratamento.

Lisboa, 23. ~~AGO~~ 2000

Por THE LIPOSOME COMPANY, INC.

- O AGENTE OFICIAL -

U ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. Lipossoma compreendendo uma camada dupla de lípido, um compartimento aquoso e uma defensina neutralizada, onde a defensina neutralizada é uma defensina que está associada a um lipossoma e que é inibida de destruir a organização da camada dupla do lipossoma, por um ou mais dos componentes da vesícula.
2. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1, onde o lipossoma é multilamelar.
3. Lipossoma multilamelar de acordo com a reivindicação 2 possuindo um soluto aprisionado nos seus compartimentos aquosos, onde a concentração do soluto em cada um dos compartimentos aquosos é substancialmente igual.
4. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 onde a defensina está contida numa camada dupla de lípido do lipossoma.
5. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 onde a defensina está contida num compartimento aquoso do lipossoma.
6. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 onde a defensina é uma defensina prototípica de mamífero, uma beta-defensina, uma indolicidina, uma magainina ou uma defensina de insecto.
7. Lipossoma de acordo com a reivindicação 6 onde a defensina é indolicidina.
8. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 onde o lipossoma compreende um lípido inibidor de libertação.
9. Lipossoma de acordo com a reivindicação 8 onde o lípido inibidor de libertação compreende 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) ou diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e colesterol.
10. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 onde a defensina é indolicidina e onde o lipossoma compreende um lípido inibidor de libertação que



compreende POPC.

11. Lipossoma de acordo com a reivindicação 10 compreendendo pelo menos cerca de 0,5 por cento em moles de indolicidina.

12. Lipossoma de acordo com a reivindicação 11 compreendendo cerca de 5 por cento em moles de indolicidina.

13. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 onde a defensina é indolicidina e onde o lipossoma compreende um lípido inibidor de libertação que compreende DSPC e colesterol.

14. Lipossoma de acordo com a reivindicação 13 compreendendo pelo menos cerca de 0,5 por cento em moles de indolicidina.

15. Lipossoma de acordo com a reivindicação 14 compreendendo cerca de 20 por cento em moles de indolicidina.

16. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 onde a defensina é indolicidina e onde o lipossoma compreende um lípido inibidor de libertação que compreende DOPC.

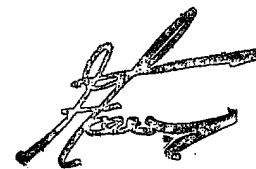
17. Lipossoma de acordo com a reivindicação 16 compreendendo pelo menos cerca de 0,5 por cento em moles de indolicidina.

18. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 onde o lipossoma compreende um tampão aquoso inibidor de libertação.

19. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 onde o lipossoma compreende um lípido com o grupo de cabeça modificado.

20. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 onde a camada dupla de lípido compreende um lípido ionizável.

21. Lipossoma de acordo com a reivindicação 20 onde mais de cerca de cinquenta por cento do lípido ionizável existente na camada dupla de lípido mais exterior do lipossoma existe na monocamada interna da camada dupla de



lípidos mais exterior.

22. Lipossoma de acordo com a reivindicação 20 onde a concentração do lípido ionizável na camada dupla de lípidos mais exterior é pelo menos de cerca de 5 por cento em moles.

23. Lipossoma de acordo com a reivindicação 20 onde o lípido ionizável é 1,2-dipalmitoil-3-(N,N-dimetilamino)propano.

24. Lipossoma de acordo com a reivindicação 1 compreendendo ainda um agente bioactivo adicional.

25. Lipossoma desidratado compreendendo uma defensina onde a defensina é uma defensina neutralizada que está associada a um lipossoma e que é inibida de destruir a organização da camada dupla do lipossoma por um ou mais dos componentes da vesícula.

26. Composição farmacêutica compreendendo um transportador farmacêuticamente aceitável e um lipossoma compreendendo uma camada dupla de lípidos, um compartimento aquoso e defensina onde a defensina é uma defensina neutralizada que está associada a um lipossoma e que é inibida de destruir a organização da camada dupla do lipossoma por um ou mais dos componentes da vesícula.

27. Método de preparação de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 26 para tratar ou prevenir uma infecção num animal, por formulação do lipossoma numa quantidade anti-infecção eficaz com um transportador farmacêuticamente aceitável.

28. Método de acordo com a reivindicação 27 onde a infecção é causada por um fungo sensível a uma defensina.

29. Método de acordo com a reivindicação 28 onde o fungo sensível a uma defensina é um *Cryptococcus* ou um *Aspergillus*.

30. Método de acordo com a reivindicação 27 onde o animal está imunocomprometido.

31. Método de acordo com a reivindicação 27 onde o animal é um humano.

32. Método de acordo com a reivindicação 27 onde a infecção compreende uma infecção provocada por fungos causada por um *Cryptococcus* e o animal é um humano imunocomprometido.

33. Método de acordo com a reivindicação 27 onde a infecção compreende uma infecção fúngica causada por um *Aspergillus* e o animal é um humano imunocomprometido.

34. Método de preparação de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 26 para tratar um animal que sofre de um cancro que reage a uma defensina, por formulação do lipossoma numa quantidade anti-cancro eficaz com um transportador farmaceuticamente aceitável.

35. Método de acordo com a reivindicação 34 onde o cancro que reage a uma defensina é uma leucemia ou um linfoma.

36. Método de preparação de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 26 para tratar um animal que sofre de uma desordem caracterizada por uma deficiência de actividade citotóxica mediada por proteínas em grânulos citoplasmáticos, por formulação do lipossoma numa quantidade citotóxica eficaz com um transportador farmaceuticamente eficaz.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, onde a desordem é o Síndrome de Deficiência de Grânulos Específicos.

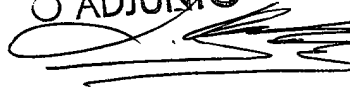
38. Método de acordo com a reivindicação 36, onde o animal sofre também de uma infecção microbiana.

Lisboa, 23. Azo 2000

Por THE LIPOSOME COMPANY, INC.

- O AGENTE OFICIAL -

○ ADJUNTO



ENG.º ANTÓNIO JOÃO DA CUNHA FERREIRA Ag. Of. Pr. Ind. Rua das Flores, 74 - 4.º 1200 LISBOA
--

Fig. 1

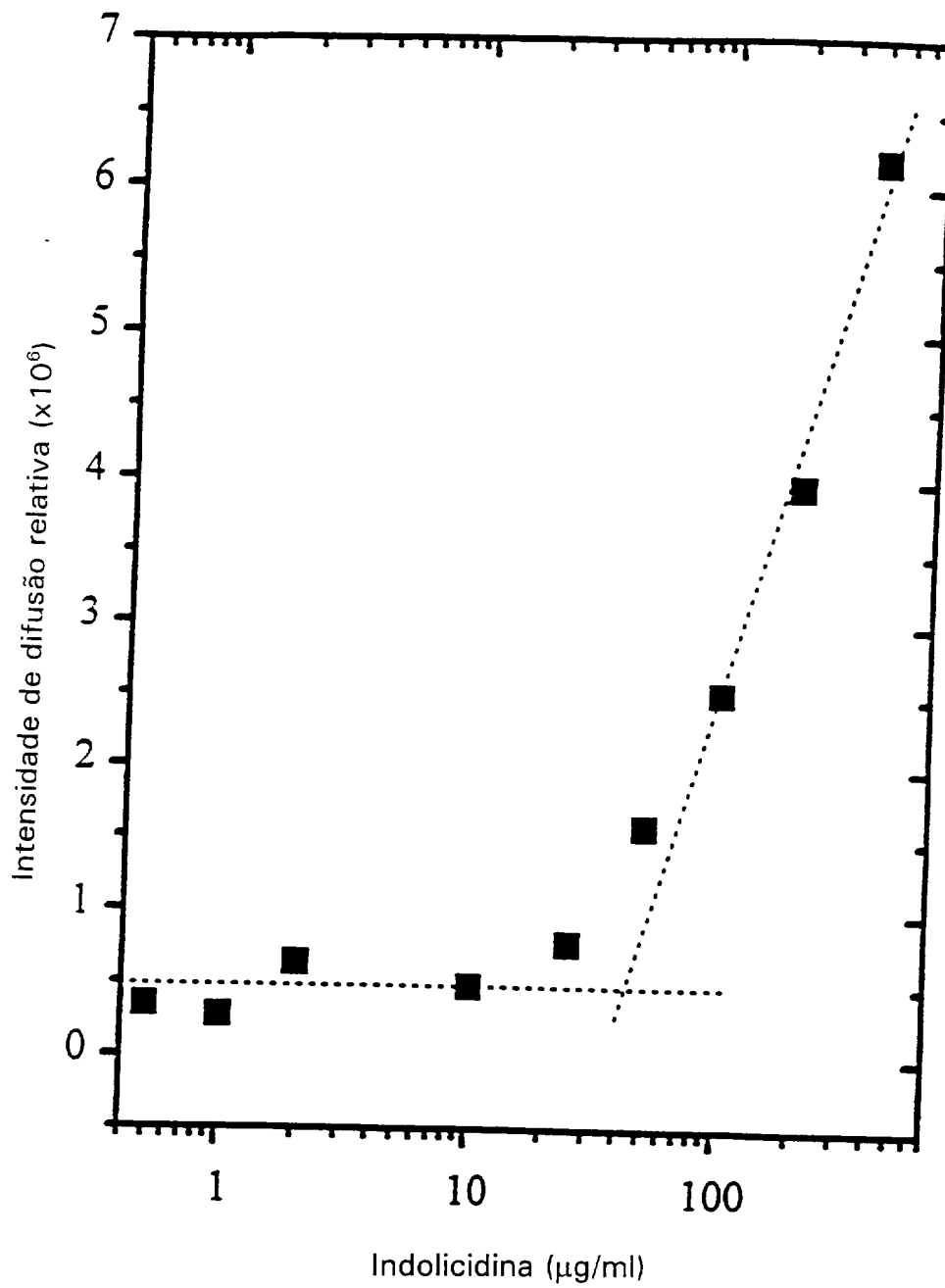
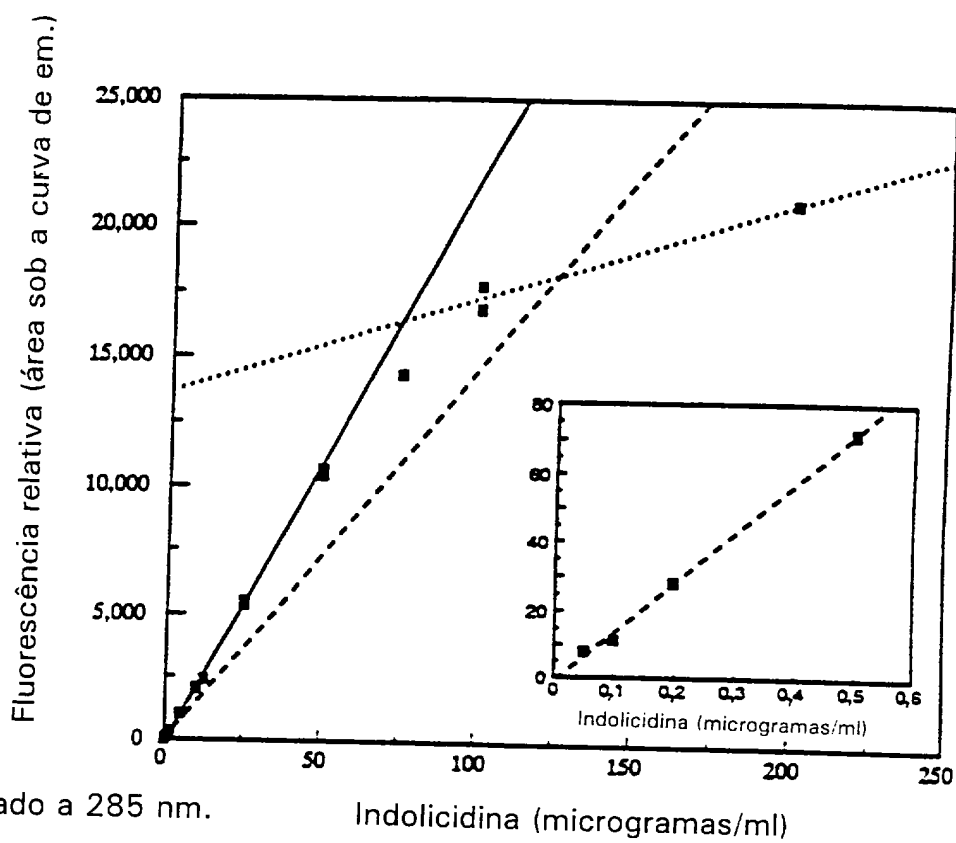


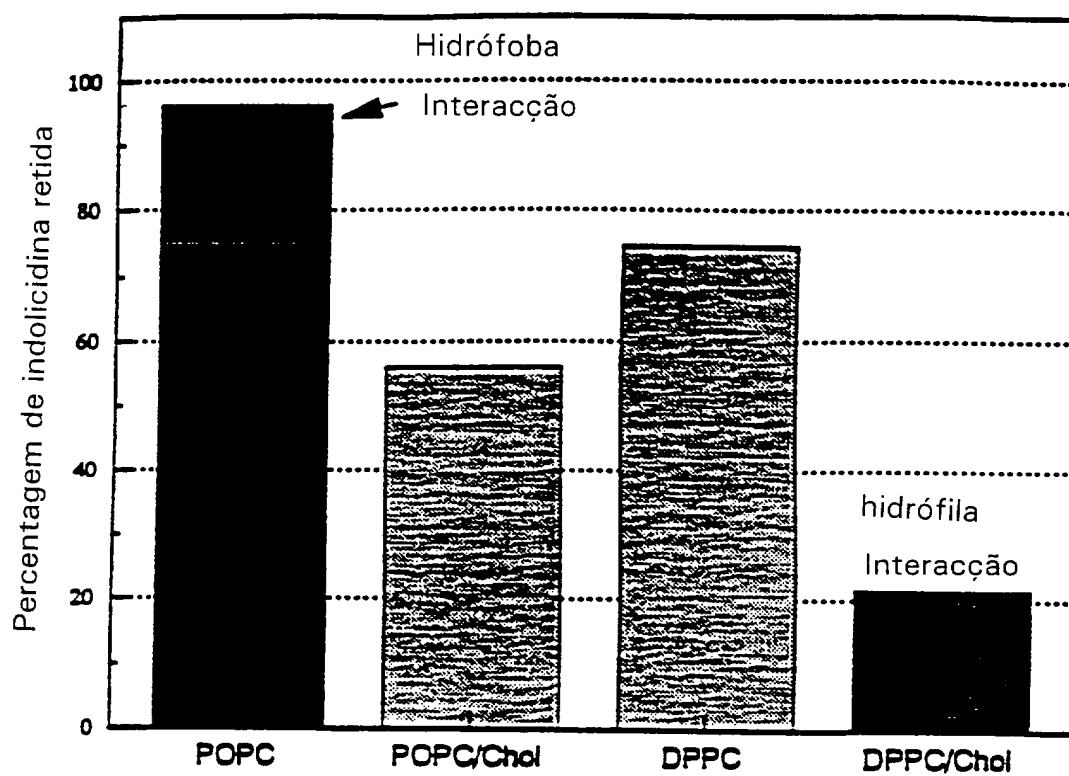
Fig. 2



Excitado a 285 nm.

Indolicidina (microgramas/ml)

Emissão varrida de 325 a 450 nm.

Fig. 3Concentração inicial de indolicidina: 13-28 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Concentração inicial de lípido: 1,5-2,5 mM



Fig. 4

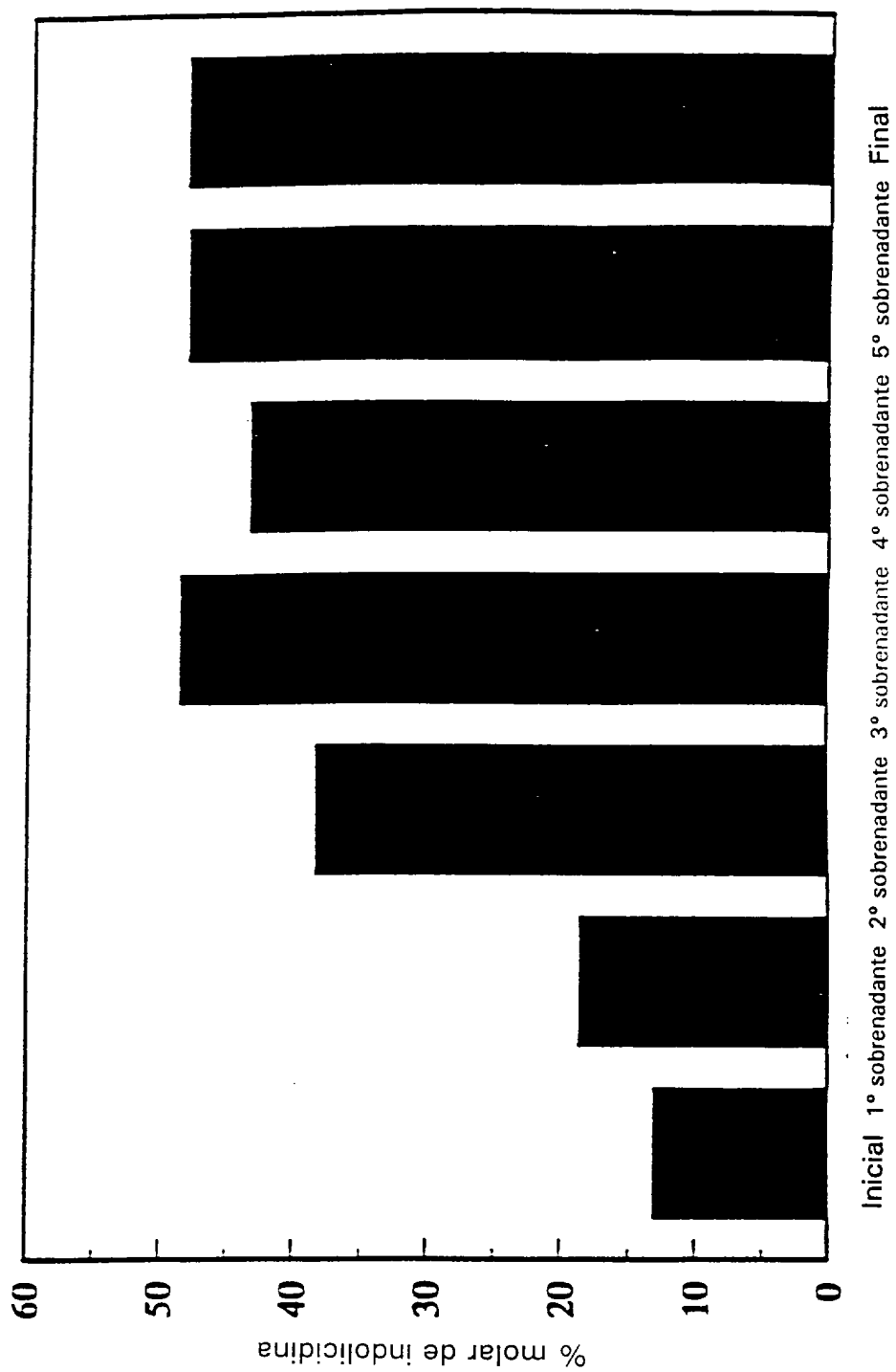


Fig. 5

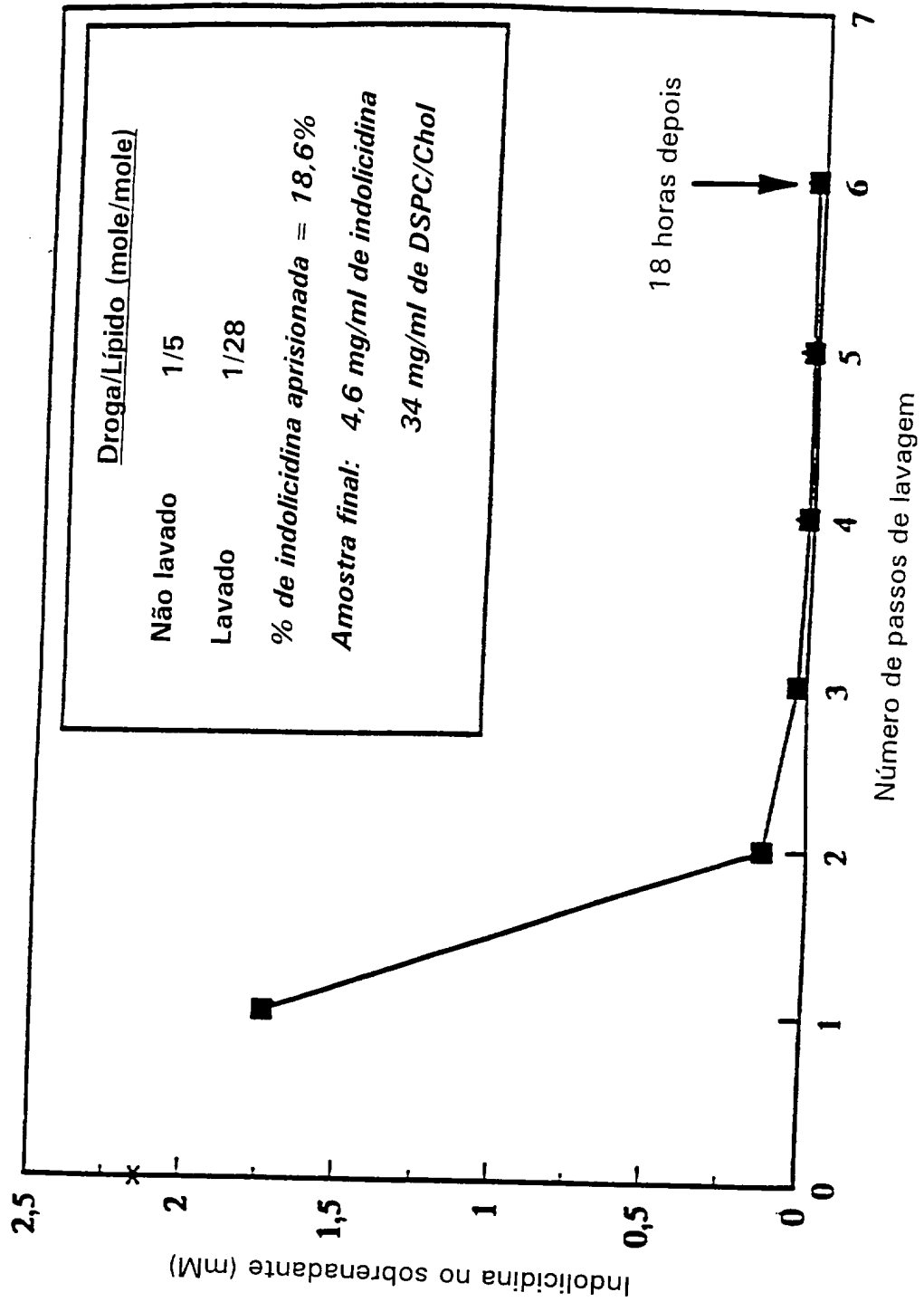


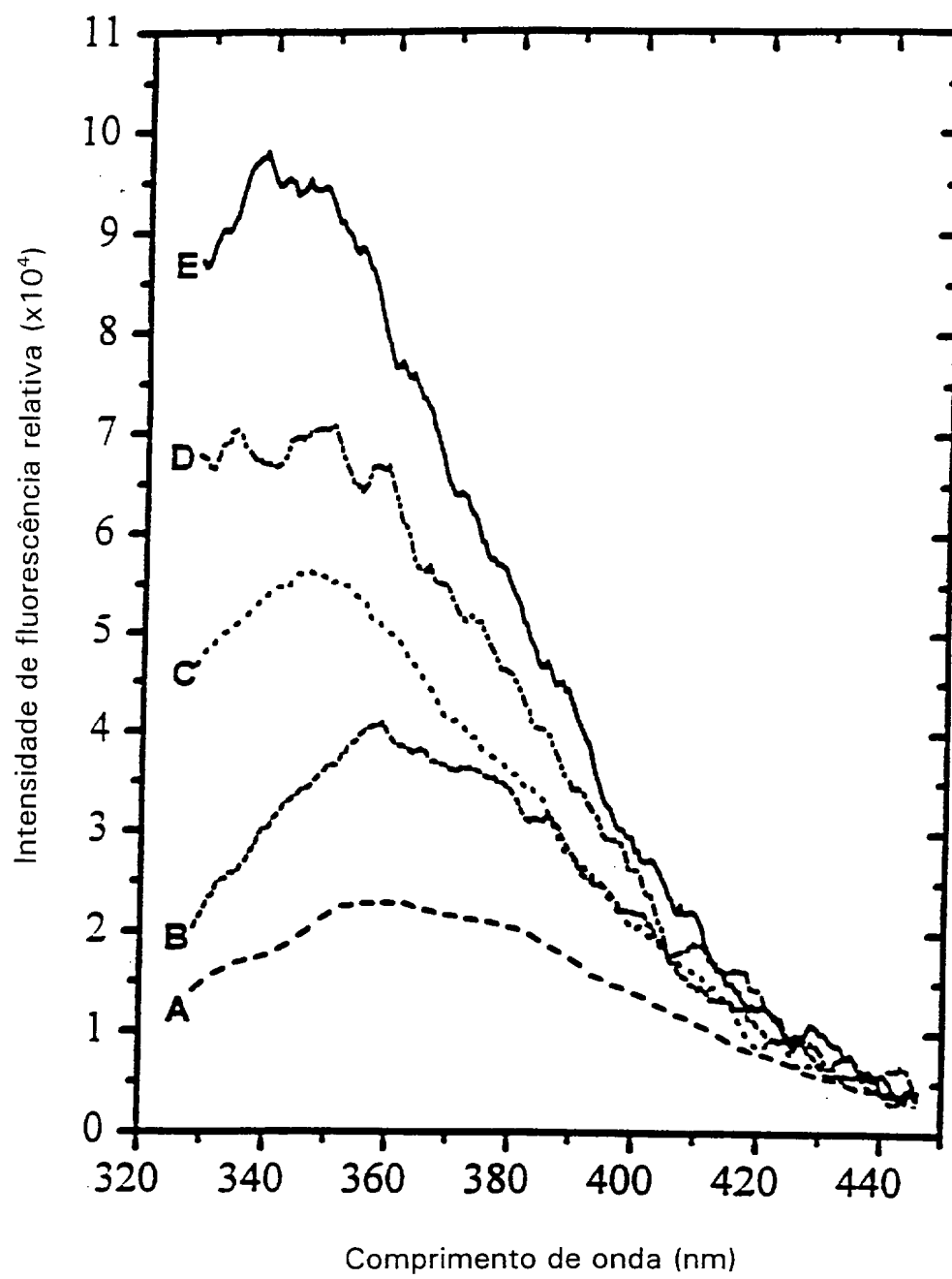
Fig. 6

Fig. 7

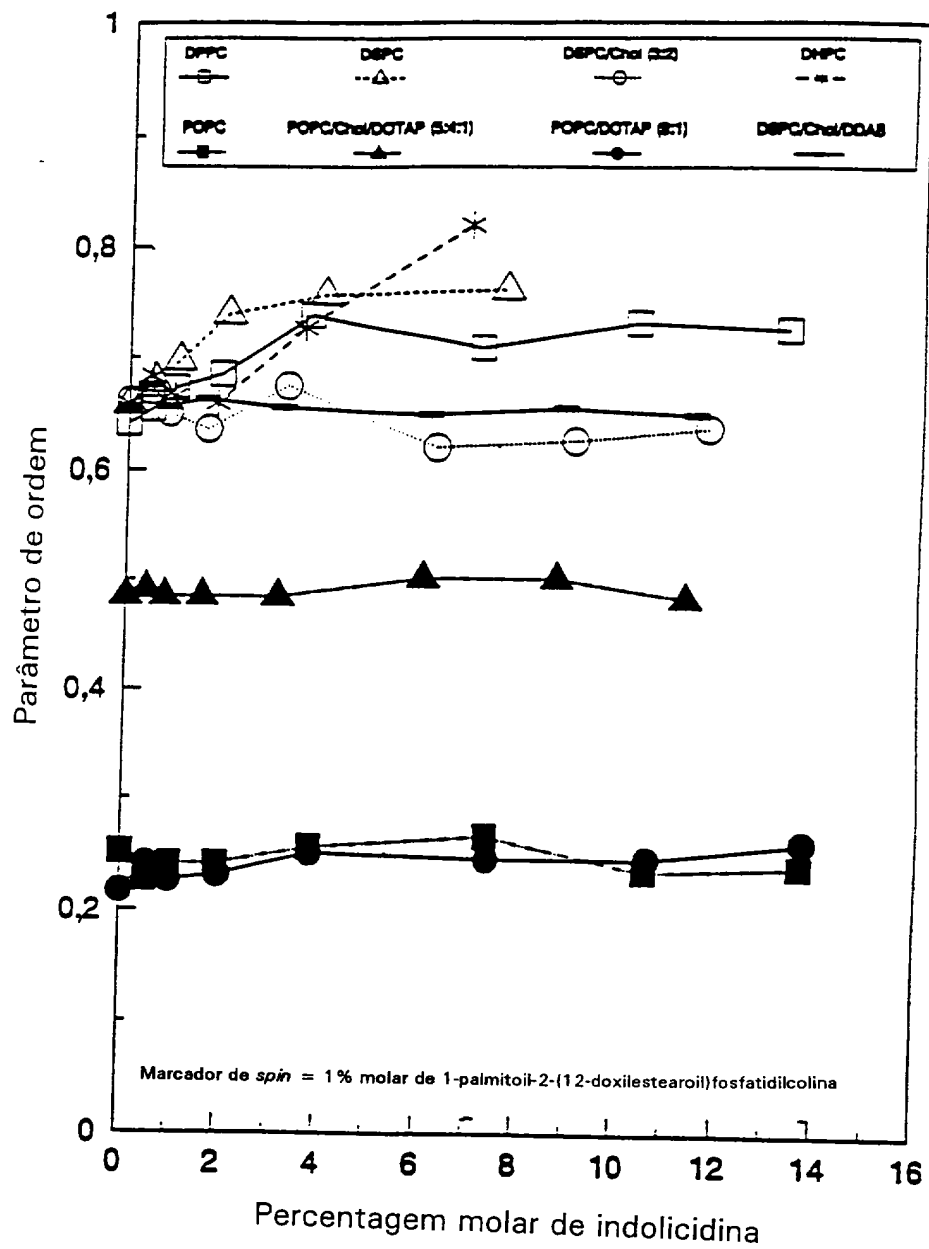


Fig. 8

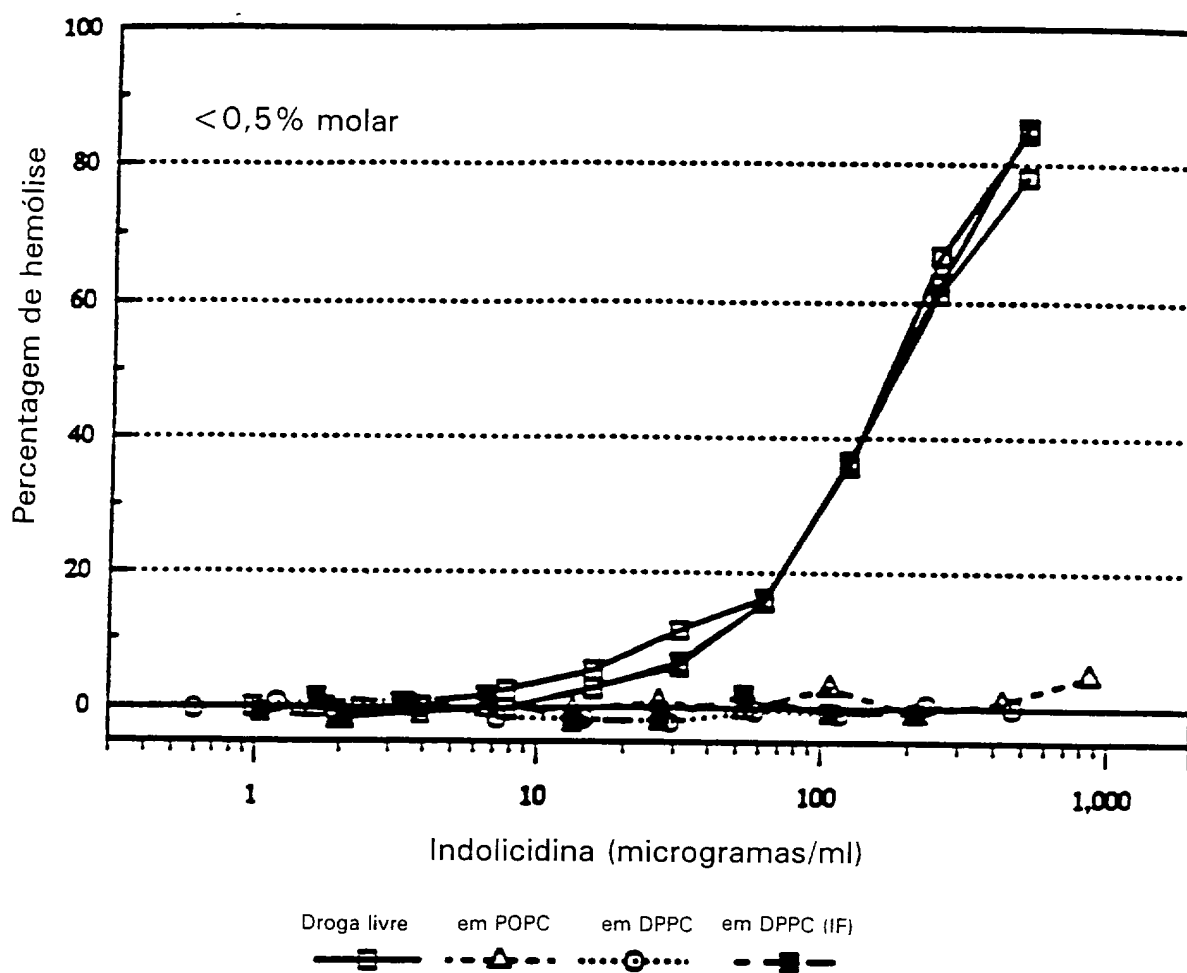


Fig. 9

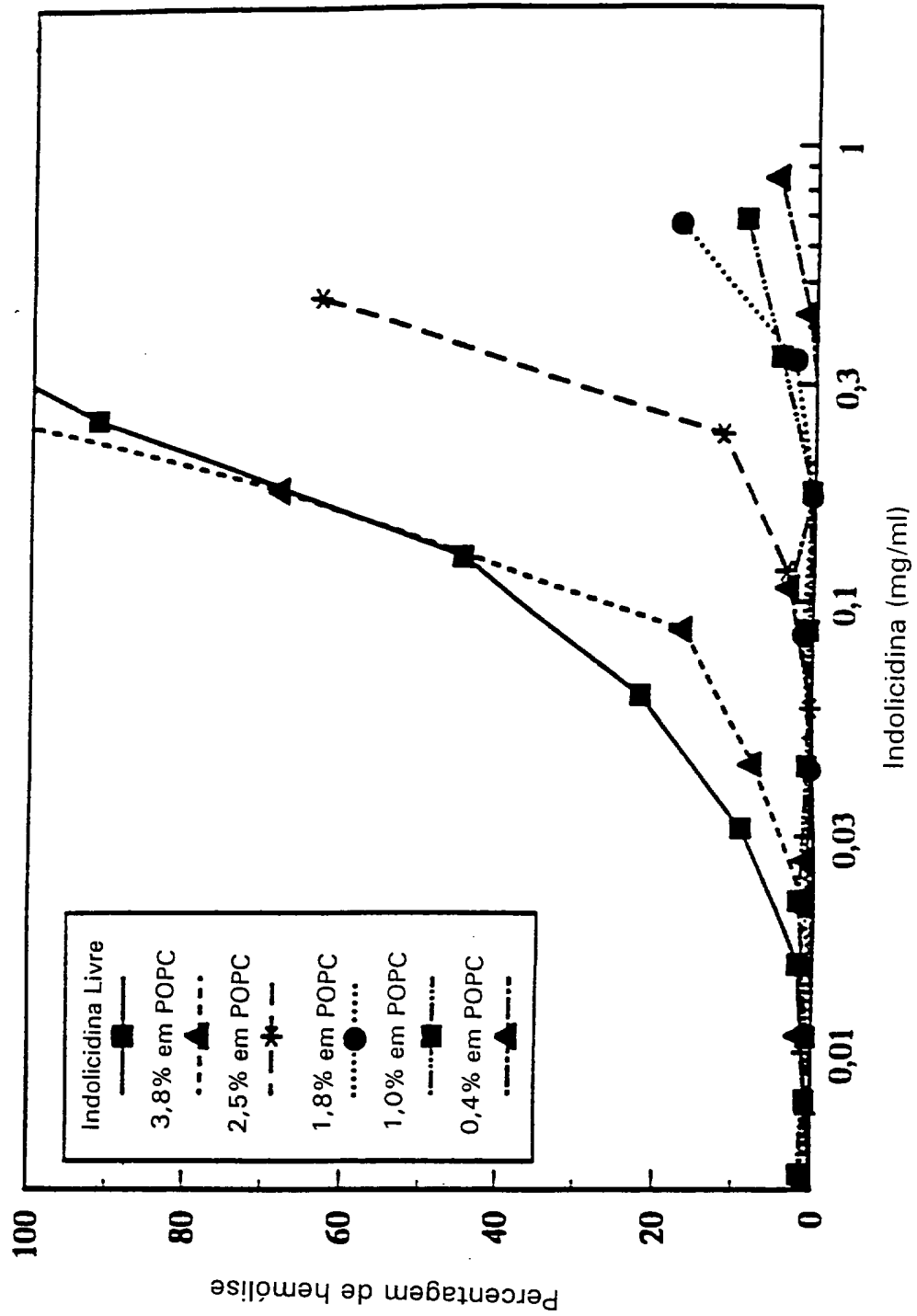


Fig. 10

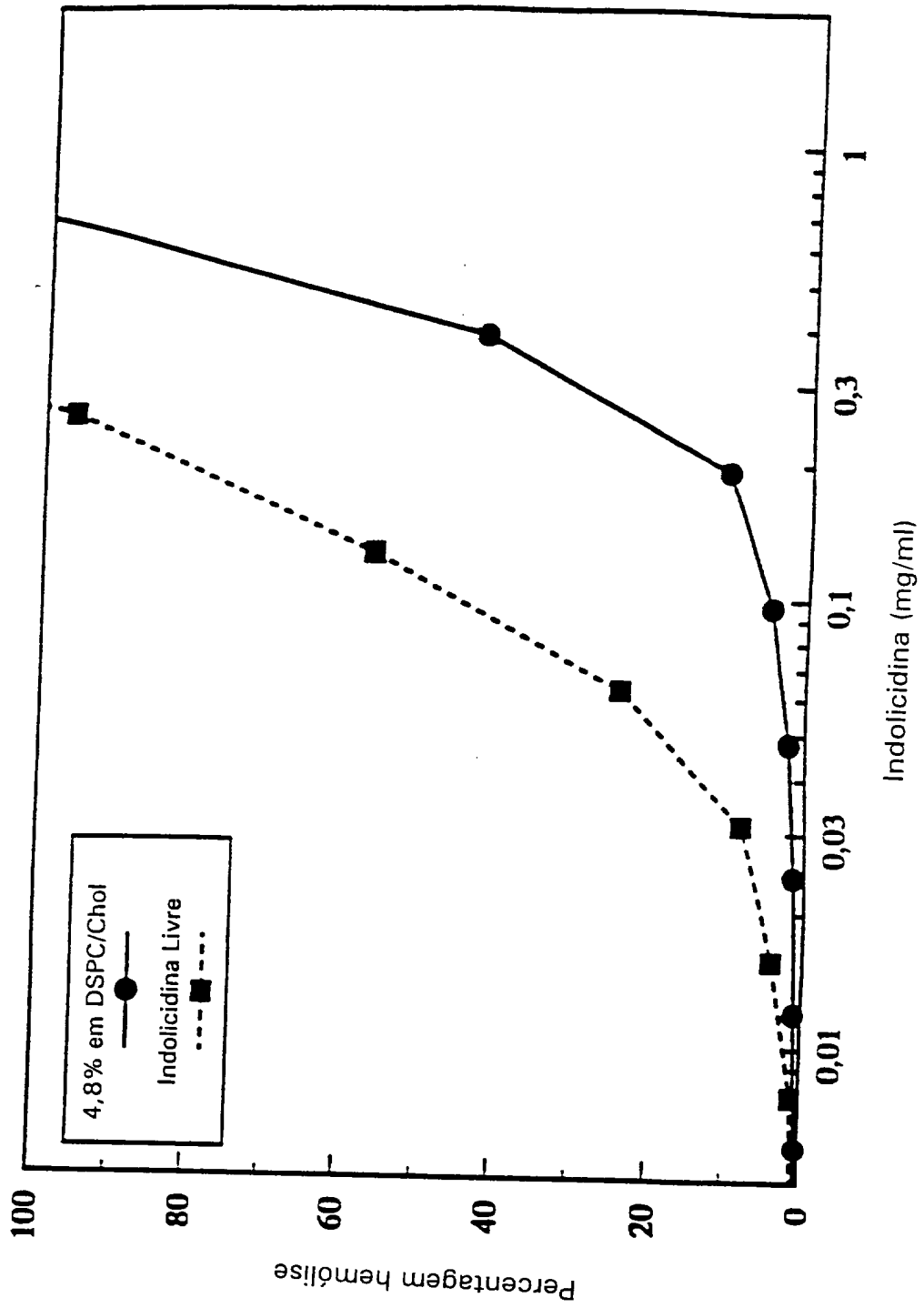
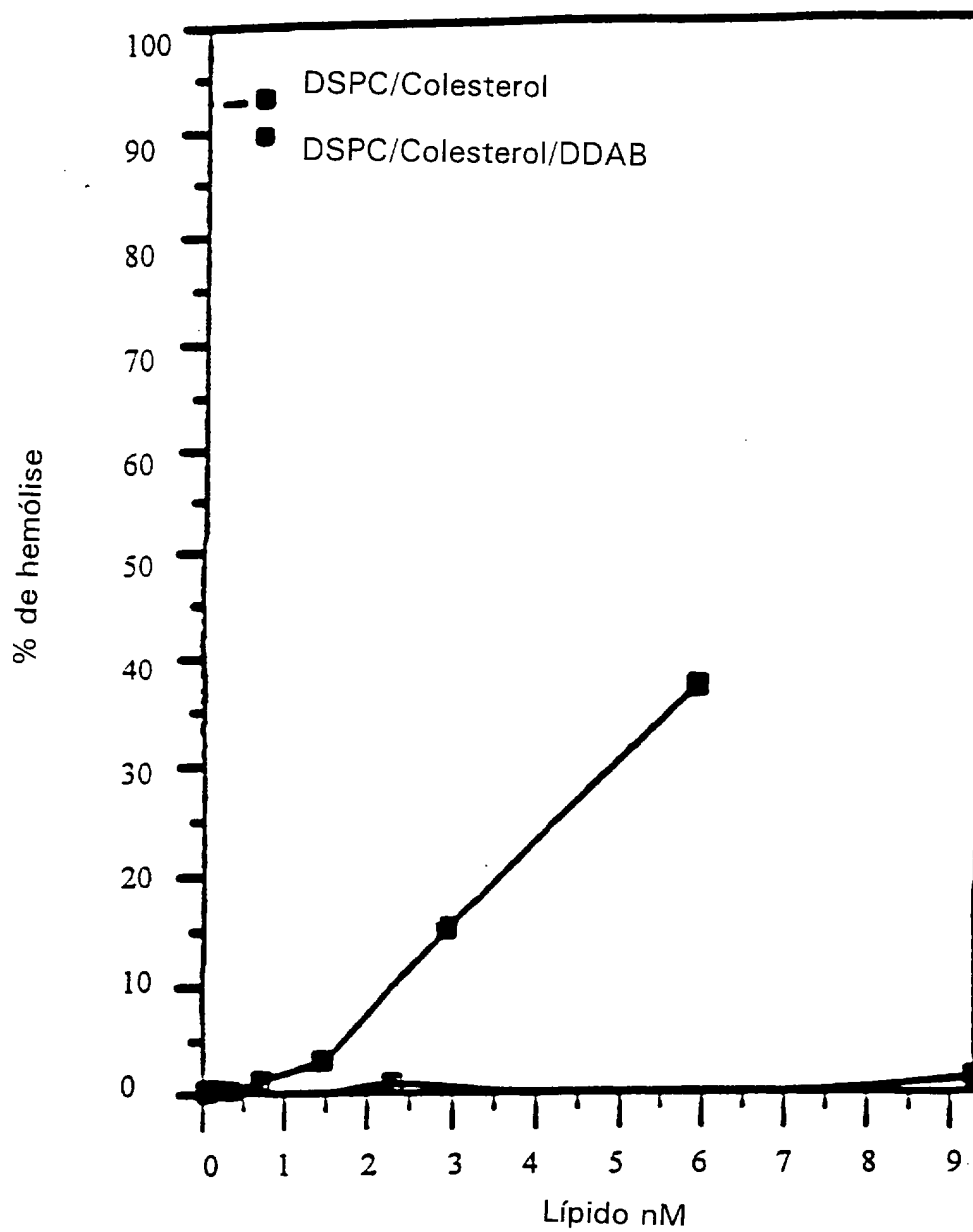


Fig. 11

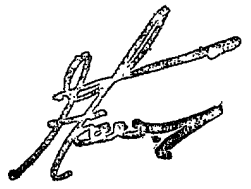


FIG. 12

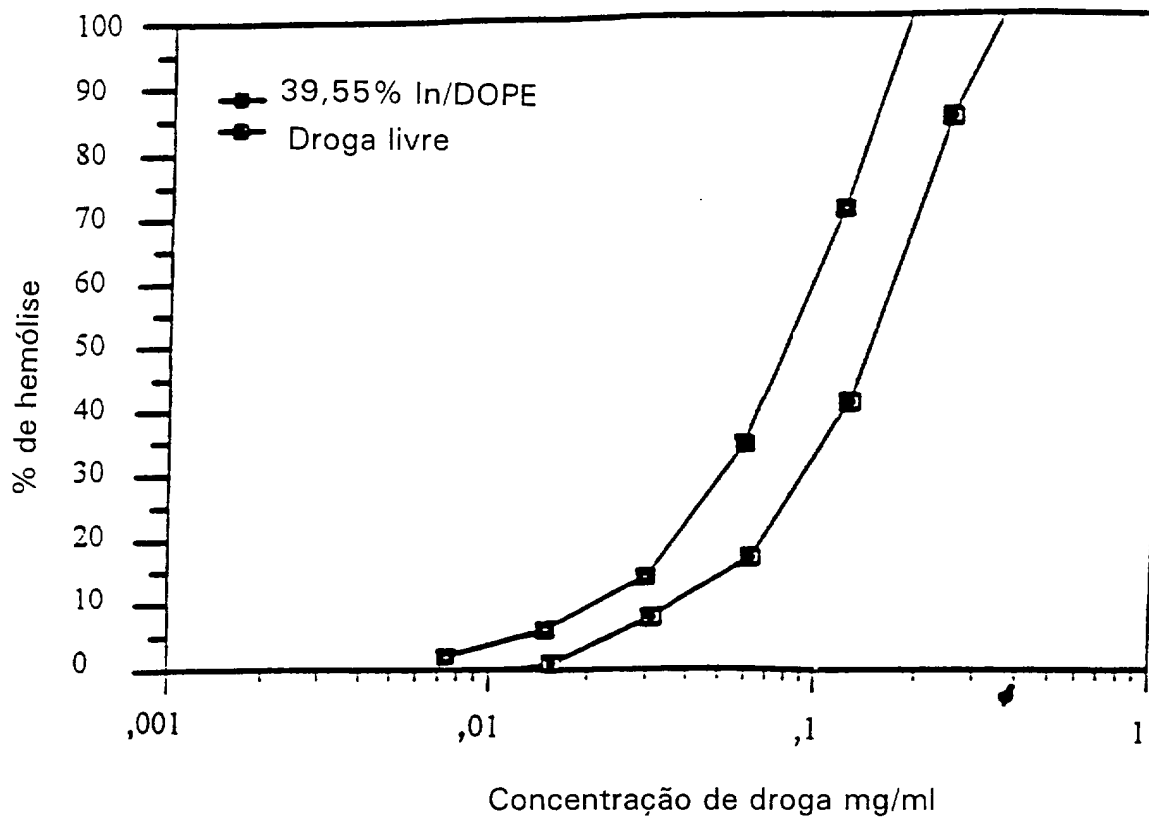
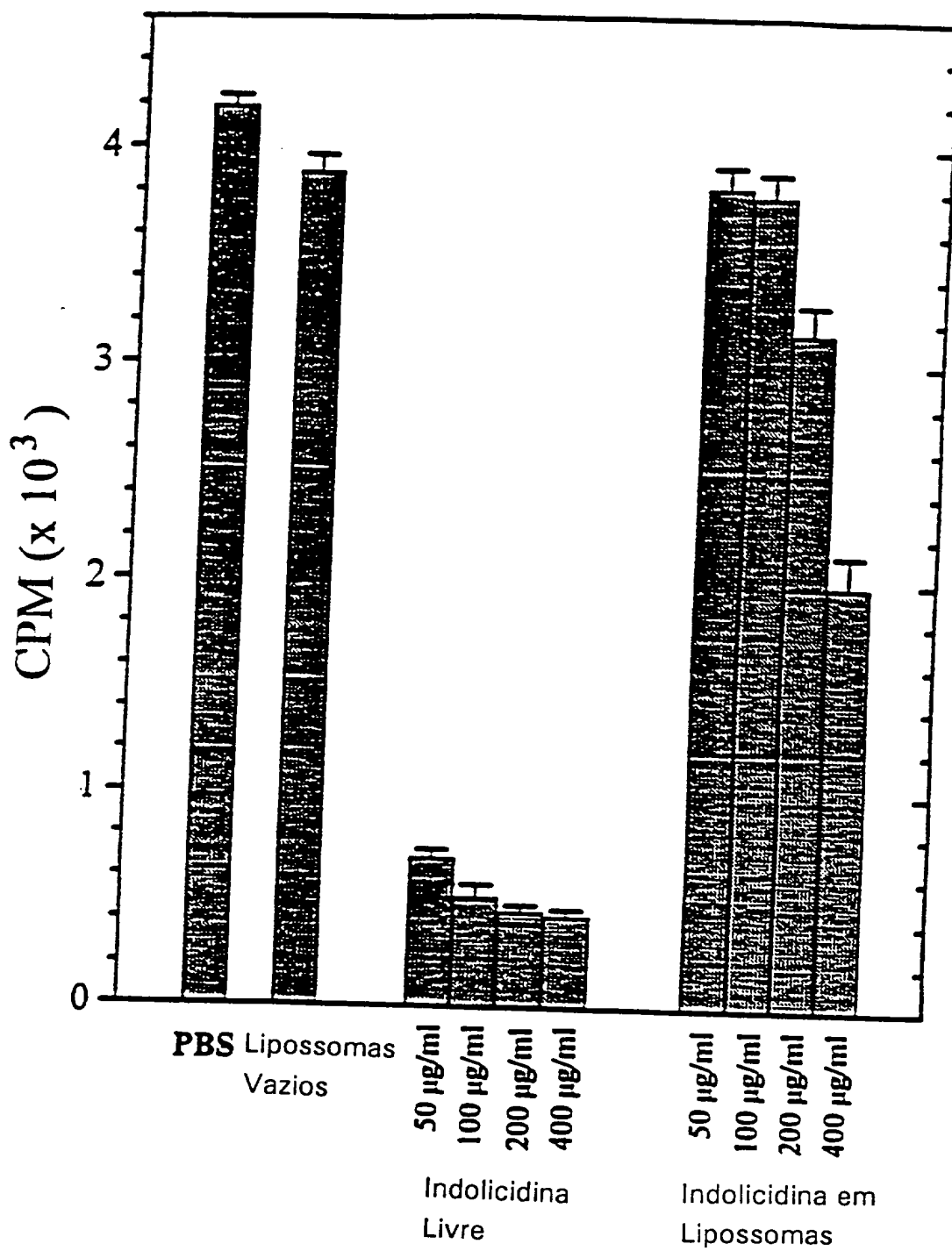




Fig. 13



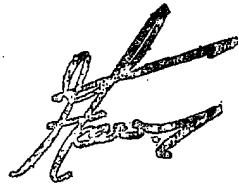


Fig. 14

