



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

(11) PI 0910464-0 B1



(22) Data do Depósito: 14/04/2009

(45) Data de Concessão: 10/08/2021

(54) Título: USO DE USO DE UM LIPÍDIO CATIÔNICO QUIRAL CONSISTINDO DE R-DOTAP A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 31/685.

(30) Prioridade Unionista: 17/04/2008 US 61/045,837.

(73) Titular(es): PDS BIOTECHNOLOGY CORPORATION.

(72) Inventor(es): ELIZABETH ANN VASIEVICH; WEIHSU CHEN; KENYA TONEY; GREGORY CONN; FRANK BEDU-ADDO; LEAF HUANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2009040500 de 14/04/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/129227 de 22/10/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 15/10/2010

(57) Resumo: ESTIMULAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNE POR ENANTIÔMEROS DE LIPÍDIOS CATIÔNICOS. A invenção refere-se a uma composição e método para ativar células imunes ex-vivo, ou induzir uma resposta imune em um sujeito incluindo uma composição compreendendo pelo menos um lipídio catiônico quiral. O lipídio catiônico quiral em uma modalidade compreende um lipídio catiônico não-esteroidal tendo uma estrutura representada pela fórmula (I); em que R1 é um grupo amônio quatemário, Y1 é um espaçador selecionado de uma cadeia de hidrocarboneto, um éster, uma cetona, e um peptídeo, C* é um carbono quiral, R2 e R3 são independentemente escolhidas de um ácido graxo saturado, um ácido graxo insaturado, um hidrocarboneto ligado a éster, fósforo-diésteres, e combinações dos mesmos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE USO DE UM LIPÍDIO CATIÔNICO QUIRAL CONSISTINDO DE R-DOTAP A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**".

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

5 Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido provisório US Número 61/045.837, depositado em 17 de abril de 2008, por Elizabeth Vasievich, Weihsu Chen, Kenya Toney, Gregory Conn, Frank Bedu-Addo, e Leaf Huang, e intitulado "Estimulação de uma Resposta Imune por Enantiômeros de Lipídios Catiônicos", a descrição do qual é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

10

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção, em geral, refere-se à estimulação de uma resposta imune, e mais particularmente ao uso dos enantiômeros R e S de lipídios na estimulação de respostas imunes.

15 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Esta seção é intencionada apresentar ao leitor os vários aspectos da técnica que podem estar relacionados aos vários aspectos da presente invenção, que são descritos e/ou reivindicados abaixo. Acredita-se que o debate seja útil em prover ao leitor informação dos antecedentes para facilitar 20 uma compreensão melhor dos vários aspectos da presente invenção. Consequentemente, deveria ser entendido que estas declarações serão lidas nesta consideração, e não como admissões da técnica anterior.

Desenvolvimento de imunoterapias seguras e efetivas para uso humano continua uma necessidade médica urgente para pacientes mundialmente. Para suscitar respostas imunes apropriadas, modificadores imunológicos ("imunomodificadores") que intensificam, direcionam, ou promovem uma resposta imune podem ser usados no projeto de vacina ou imunoterapia [Gregoriadis, G., *Immunological adjuvants: a role for liposomes*. Immunol Today 11:89 (1990)]. Por exemplo, vacinas podem incluir抗ígenos para estimular uma resposta imune. Porém, algumas vacinas potenciais que incluem抗ígenos são estimuladores fracos de uma resposta imune porque as vacinas não liberam eficientemente o抗ígeno às células apresentadoras de

antígeno ("APC") do sistema imune e/ou antígeno é fracamente imunogênico. Desse modo, imunoterapias que efetivamente liberam os抗ígenos às APC, e também estimulam o sistema imune para responder ao antígeno, são necessárias. Imunomodificadores têm o potencial para funcionar como uma 5 imunoterapia. Tais imunoterapias podem ter estes e outros benefícios. Por exemplo, quando incluso como parte de uma vacina terapêutica, um imunomodificador deve pelo menos (1) melhorar a liberação do antígeno e/ou processamento nas APC [Wang, R. F., e Wang, H. Y. *Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells*. Nat Biotechnol 20:149 (2002)], (2) induzir a produção de citocinas imunomoduladoras que favorecem o desenvolvimento de respostas imunes ao antígeno da vacina, desse modo promovendo imunidade mediada por célula, incluindo linfócitos T citotóxicos ("CTL"), (3) reduzir o número de imunizações ou a 10 quantidade de antígeno requerido para uma vacina efetiva [Vogel, F. R. *Improving vaccine performance with adjuvants*. Clin Infect Dis 30 Supl. 3:S266 (2000)], (4) aumentar a meia-vida biológica ou imunológica do antígeno da vacina, e (5) superar a tolerância imune ao antígeno inibindo fatores supressivos imunes [Baecher-Allan, C. e Anderson, D. E. *Immune regulation in tumor-bearing hosts*. Curr Opin Immunol 18:214 (2006)].

Presentemente, a classe primária de agentes usados para intensificar a eficácia dos抗ígenos, tais como抗ígenos de peptídeo ou de proteína, em suscitar uma resposta imune são adjuvantes tais como emulsões de água-em-óleo, alumínio, e outras químicas que intensificam as respostas do antígeno; porém, estes adjuvantes não são imunomodificadores, como descritos acima, porque eles não têm por si só nenhum efeito imunomodulador direto [Vogel, F. R., e Powell, M. F. *A compendium of vaccine adjuvants and excipients*, Pharm Biotechnol 6:141 (1995)]. Vários tais adjuvantes estão disponíveis para o uso em animais e alguns deles foram testados em experimentações clínicas. Além de adjuvantes tradicionais tais como os sais de alumínio, produtos tais como virossomas de influenza [Gluck, R. e Walti, E. 2000. *Biophysical validation of Epaxal Bema, a hepatitis A vaccine adjuvanted with immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIV)*.

Dev Biol (Basel) 103:189 (2000)] e MF59 de Chiron [Kahn, J. O., et al. *Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus (HIV) type ISF2 gp120 subunit vaccine combined with MF59 adjuvant with or without muramyl tripeptide dipalmitoyl phosphatidylethanolamine in non-HIV-infected human volunteers*. J Infect Dis 170:1288 (1994)], que têm efeitos imunes intrínsecos, estão sendo comercializados. Por exemplo, MF59, que é um adjuvante com base em emulsão de submícron, é interiorizado através de células dendríticas [Dupuis, M. et al., *Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection*. Cell Immunol 186:18 (1998)]. Porém, de acordo com relatórios de experimentação clínica sobre vacinas de HSV e de influenza [Jones, C. A., e Cunningham, A. L. *Vaccination strategies to prevent genital herpes and neonatal herpes simplex virus (HSV) disease*. Herpes 11:12 (2004); Minutello, M. et al., *Safety and immunogenicity of an inactivated subunit influenza virus vaccine combined with MF59 adjuvant emulsion in elderly subjects, immunized for three consecutive influenza seasons*. Vaccine 17:99 (1999)] evidência de modelos animais sugere que o adjuvante de MF59 intensifica a produção de anticorpos neutralizantes ao invés de intensificar as respostas das células T. Desse modo, métodos novos de estimular respostas imunes mediadas por célula são necessários.

Também, como mencionado acima, alguns抗ígenos são estimuladores fracos de uma resposta imune. Desse modo, além de coadministrar o抗ígeno com substâncias que estimulam respostas imunes, como descrito acima, um抗ígeno fracamente imunogênico pode ser modificado para aumentar sua imunogenicidade. Por exemplo, um抗ígeno fracamente imunogênico pode ser acoplado a peptídeos imunogênicos, polissacarídeos, ou lipídios para aumentar sua imunogenicidade. Porém, simplesmente acoplar抗ígenos fracamente imunogênicos a estes tipos de compostos pode não ser suficiente para suscitar uma resposta imune. Por exemplo, a resposta imune resultante pode ser direcionada aos epitopos imunogênicos no composto acoplado e não no抗ígeno fraco, ou o抗ígeno acoplado pode não ser liberado eficientemente às APC do sistema imune. Desse modo, métodos adicionais são necessários para estimular respostas imunes a抗ígenos.

nos que são fracamente imunogênicos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Certos aspectos exemplares da invenção são expostos abaixo. Deve ser entendido que estes aspectos são apresentados meramente para prover ao leitor um breve sumário de certas formas que a invenção poderia tomar e que estes aspectos não são intencionados a limitar o escopo da invenção. De fato, a invenção pode abranger uma variedade de aspectos que podem não ser explicitamente expostos abaixo.

Esta invenção é direcionada à quiralidade de lipídios catiônicos e ao uso dos enantiômeros R e S de lipídios catiônicos que, sob certa dose e condições de composição, atuam como uma classe nova de imunoestimulantes, para (1) efetivamente apresentar ou liberar um antígeno ao sistema imune e (2) estimular o sistema imune para responder ao antígeno.

Lipossomas têm sido extensivamente usados para liberar fármacos, DNA de plasmídeo, oligonucleotídeos, proteínas, e peptídeos de peso molecular pequeno. Vacinas usando veículos lipossomais, como veículos de antígeno não viral, são preferíveis comparadas às imunizações tradicionais usando vacinas atenuadas em vida ou vetores virais tais como vírus da varíola ou da influenza. Pedido de Patente US 12/049.957, atribuídos ao cessionário do presente pedido, revela imunoterapias com base sem lipídios simples, embora efetivas, incluindo um complexo de lipídio catiônico/antígeno, que tem duas moléculas, um lipídio catiônico e um antígeno, e os efeitos da dose de lipídio na resposta imune resultante. Os resultados relatados demonstram que o lipossoma catiônico complexado com um antígeno serve para estimular respostas imunes e iniciar a interação das células dendríticas (uma APC) com as células T.

Na presente invenção, estudos adicionais executados com os dois enantiômeros de um lipídio catiônico selecionado conduziram à descoberta que diferenças existem na habilidade dos enantiômeros R e S dos lipídios catiônicos para agirem como ativadores imunes potentes sob várias condições. Em combinação com um antígeno, o complexo de lipídio catiônico/antígeno contendo o enantiômero R, sob várias condições de dose (inclu-

indo condições de dose baixa), induz respostas imunes fortes específicas para o antígeno formulado no complexo e resulta na regressão do tumor. Complexos que consistem em S-DOTAP e o antígeno, porém, foram capazes de induzir apenas regressão limitada do tumor, e não em todas as doses 5 nas quais R-DOTAP foi efetivo. Ambos os enantiômeros de DOTAP são, porém, igualmente efetivos em induzir maturação e ativação das células dendríticas que são a primeira etapa na indução de uma resposta imune celular.

Desse modo, um aspecto da invenção fornece uma composição 10 de pelo menos um enantiômero de um lipídio catiônico em uma dose suficiente para induzir uma resposta imune em um sujeito.

Outro aspecto da invenção fornece um método de induzir uma resposta imune em um sujeito administrando um enantiômero específico ou uma mistura de enantiômeros de um lipídio catiônico ao sujeito.

15 Outro aspecto da invenção fornece uma composição de um enantiômero R ou S de um lipídio catiônico em uma dose suficiente para induzir uma resposta imune em um sujeito.

Aspectos adicionais da invenção envolvem a adição de pelo menos 20 um antígeno ao enantiômero R ou S para formar um complexo de lipídio catiônico/antígeno em cujo caso a resposta imune é antígeno-específica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Várias características, aspectos, e vantagens da presente invenção ficarão melhor entendidos quando a descrição detalhada seguinte for lida com referência às figuras em anexo, em que:

25 as figuras 1A e 1B descrevem a quiralidade de 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio propano ("DOTAP").

a figura 2 é um gráfico que descreve ativação das células dendríticas humanas resultando na expressão da molécula coestimuladora CD 80 por R-DOTAP, S-DOTAP e a mistura racêmica RS-DOTAP.

30 a figura 3 é um gráfico que descreve a ativação das células dendríticas humanas resultando na expressão da molécula coestimuladora CD 83 por R-DOTAP, S-DOTAP e a mistura racêmica RS-DOTAP.

a figura 4 é um gráfico que descreve a ativação das células dendríticas humanas resultando na expressão da molécula coestimuladora CD 86 por R-DOTAP, S-DOTAP e a mistura racêmica RS-DOTAP.

5 a figura 5 é um gráfico que descreve a estimulação das células dendríticas humanas resultando na produção da quimiocina CCL-3 por R-DOTAP, S-DOTAP e a mistura racêmica RS-DOTAP.

a figura 6 é um gráfico que descreve a estimulação das células dendríticas humanas resultando na produção da quimiocina CCL-4 por R-DOTAP, S-DOTAP e a mistura racêmica RS-DOTAP.

10 a figura 7 é um gráfico que descreve a estimulação das células dendríticas humanas resultando na produção da quimiocina CCL-5 por R-DOTAP, S-DOTAP e a mistura racêmica RS-DOTAP.

15 a figura 8 é um gráfico que descreve a estimulação das células dendríticas humanas resultando na produção da quimiocina CCL-19 por R-DOTAP, S-DOTAP e a mistura racêmica RS-DOTAP.

a figura 9 é um gráfico que descreve a estimulação das células dendríticas humanas resultando na produção da citocina IL-2 por R-DOTAP, S-DOTAP e a mistura racêmica RS-DOTAP.

20 a figura 10 é um gráfico que descreve a estimulação das células dendríticas humanas resultando na produção da citocina IL-8 por R-DOTAP, S-DOTAP e a mistura racêmica RS-DOTAP.

a figura 11 é um gráfico que descreve a estimulação das células dendríticas humanas resultando na produção da citocina IL-12 por R-DOTAP, S-DOTAP e a mistura racêmica RS-DOTAP.

25 a figura 12 é um gráfico que demonstra os efeitos antitumorais *in vivo* de várias doses de um complexo de lipídio catiônico/antígeno com base no tamanho do tumor e tempo pós-injeção.

30 a figura 13 é um gráfico que demonstra o efeito da dose de S-DOTAP na eficácia antitumoral *in vivo* do complexo de lipídio catiônico/antígeno.

a figura 14 é um gráfico que demonstra o efeito da dose de R-DOTAP na eficácia antitumoral *in vivo* do complexo de lipídio catiônico/antígeno.

co/antígeno.

a figura 15 é um gráfico que descreve os efeitos da resposta da dose de lipídio da mistura racêmica de DOTAP, R-DOTAP e S-DOTAP na resposta imune antitumoral *in vivo* do complexo de lipídio catiônico/antígeno 5 com dose de antígeno de 20 µg. O efeito da dose de antígeno é também demonstrado com a mistura racêmica de DOTAP. R-DOTAP comparado a S-DOTAP: *p < 0,05, **p < 0,01, n = 5-6.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Uma ou mais modalidades específicas da presente invenção se-
10 rão descritas abaixo. Em um esforço para fornecer uma descrição concisa destas modalidades, todas as características de uma implementação atual podem não ser descritas no relatório descritivo. Deveria ser apreciado que no desenvolvimento de qualquer tal implementação atual, numerosas deci-
15 sões específicas à implementação devem ser feitas para alcançar as metas específicas dos desenvolvedores, que pode variar de uma implementação para a outra. Além disso, deveria ser apreciado que um tal esforço de de-
senvolvimento poderia ser complexo e demorado, mas seria, não obstante, um empreendimento rotineiro para aqueles de habilidade usual tendo o be-
nefício desta descrição.

20 Ao introduzir elementos da presente invenção (por exemplo, a(s) modalidade(s) exemplar(es) da mesma, os artigos "um(a)", "o/a" e "dito(a)" são intencionados significar que há um ou mais dos elementos. Os termos "compreendendo", "incluindo" e "tendo" são intencionados ser inclusivos e significam que pode haver elementos adicionais diferentes dos elementos
25 listados.

Um aspecto da presente invenção fornece um enantiômero de um lipídio catiônico para estimular uma resposta imune em um mamífero para impedir ou tratar doença. Os lipídios quirais individuais podem funcionar independentemente como imunomoduladores, em uma dose maneira-
30 dependente, tal como para a produção de quimiocinas e/ou citocinas, ati-
vando vários componentes da via de sinalização de MAP cinase. A faixa de dose que efetivamente induz uma resposta imune é observada diferir entre

os enantiômeros R e S e também dentro de várias espécies mamíferas. Por exemplo, nas espécies roedoras, o enantiômero R de DOTAP atenua efetivamente o crescimento do tumor em uma faixa de cerca de 30 nmols a cerca de 400 nmols. Em contraste, o enantiômero S de DOTAP é efetivo nesta 5 mesma faixa de doses nas mesmas espécies de roedores, entretanto bem menos que o enantiômero R. Em outro aspecto, o lipídio catiônico quiral pode ser associado aos抗ígenos ou fármacos para apresentação às células do sistema imune ao mesmo tempo simultaneamente estimulando uma resposta imune抗ígeno-específica forte. Em alguns aspectos da invenção, o 10抗ígeno é um lipopeptídio.

Patente U. S. Número 7.303.881, incorporada por referência aqui em sua totalidade, descreve que múltiplos lipídios catiônicos complexados com抗ígenos associados à doença foram mostrados estimular uma resposta imune profilática que impediu a doença específica (por exemplo, 15câncer HPV-positivo) e também uma resposta imune terapêutica que matou as células que expressam o抗ígeno particular e resultou em um tratamento efetivo da doença. Presentemente, estudos foram executados para também entender os efeitos da quiralidade na capacidade imunoestimulante dos lipídios catiônicos usando os enantiômeros R e S de DOTAP (Os enantiômeros 20R e S de DOTAP são mostrados nas figuras 1A e 1B). Estes estudos conduziram à descoberta que enantiômeros individuais de lipídios catiônicos podem funcionar independentemente como imunomoduladores para estimular uma resposta imune com (ou sem)抗ígenos. Também, quando os enantiômeros de lipídios catiônicos são complexados com um抗ígeno, uma resposta imune抗ígeno-específica é gerada. A extensão da resposta imune específica à doença difere significativamente entre os enantiômeros R e S 25do lipídio catiônico.

Em outro aspecto, o lipídio catiônico quiral, em uma dose suficiente para estimular uma resposta imune, é administrado em combinação 30com um抗ígeno ou抗ígenos. Neste caso a combinação de lipídio catiônico/抗ígeno é capaz de gerar uma resposta imune que é específica para o(s)抗ígeno(s) liberado(o) em combinação com o lipídio catiônico. A resposta

gerada pode incluir produção de células T citotóxicas específicas, células T de memória, ou células B resultando na prevenção, ou resposta terapêutica, para a doença específica associada ao(s) antígeno(s).

Os lipídios catiônicos quirais da invenção podem ser na forma de complexos de lipídio catiônico. O complexo de lipídio catiônico pode levar à forma de várias vesículas tais como lipossomas, micelas, ou emulsões. Os complexos de lipídio catiônico podem ser unilaminares ou multilaminares. Quando um antígeno for incluído, o antígeno pode ser encapsulado no complexo de lipídio catiônico ou pode ser não encapsulado. Encapsulado é entendido significar que o antígeno pode ser contido dentro do espaço interno do complexo e/ou incorporado nas paredes lipídicas do complexo.

Outro aspecto da invenção diz respeito a um método para produzir estes complexos, em que o método pode opcionalmente incluir a etapa de purificar estas formulações dos componentes individuais em excesso.

Em certas modalidades, os complexos de lipídio catiônico têm uma carga positiva líquida e/ou uma superfície positivamente carregada em pH 6,0-8,0.

O "antígeno" opcional que pode ser incluído com os complexos de lipídio catiônico da invenção pode ser ácido nucleico, peptídeos, lipopeptídios, proteínas, lipoproteínas, polissacarídeos, e outras macromoléculas que podem ser diretamente complexadas com os lipídios catiônicos. Porém, fármacos catiônicos (por exemplo, proteína catiônica grande) podem ser diretamente complexados com um lipídio aniónico ou sequencialmente complexados primeiro com lipídio aniónico ou polímero seguido pelo lipídio catiônico quiral. O uso deste processo permite a liberação de fármacos carregados positivos ou neutros às células pelos complexos da presente invenção.

Um aspecto da presente invenção envolve o uso dos complexos de lipídio catiônico quirais para ativar células dendríticas e também estimular a produção de quimiocinas e citocinas. Quimiocinas e citocinas são reguladores importantes das respostas imunes. Quimiocinas foram originalmente identificadas como moléculas de quimioatração potentes para células inflamatórias incluindo neutrófilos, eosinófilos, e monócitos/macrófagos. Estudos

subsequentes revelaram que quimiocinas têm efeitos profundos em reações imunes regulando o tráfego das células dendríticas e outros linfócitos em órgãos linfoideos. Células dendríticas são células migratórias que testam os antígenos no tecido, migram para os linfonodos de drenagem e amadurecem

5 para estimular a resposta das células T. CCL2, um membro das quimiocinas CC, foi identificado originalmente como um fator quimiotático e ativador para monócitos/macrófagos. Estudos subsequentes mostraram que este pode também afetar a função das células T, células assassinas naturais, e neutrófilos. Outra exploração descobriu que CCL2 era o ativador mais potente da

10 atividade dos linfócitos T CD8+ citotóxicos ("CTL"), quando na presença das citocinas Th1, interleucina-12 ("IL-12") e interferona γ ("IFN- γ "). Isso pode ser explicado por uma interação bidirecional positiva entre os sistemas de CCL2 e IFN- γ . Uma ausência da citocina ou quimiocina pode interferir com a polarização de Th1 e geração da imunidade tumoral específica subsequente.

15 Outra quimiocina CC, CCL-4, tem também sido mostrado recrutar e expandir células dendríticas *in vivo* e potencializar a imunogenicidade das vacinas de DNA de plasmídeo. Recentemente, foi mostrado que as quimiocinas intensificam a imunidade guiando células T CD8+ puras para os sítios de interação de células T CD4+/dendríticas e promovem a geração de células T CDS+ de

20 memória. Alguns exemplos de quimiocinas que podem ser estimuladas pelos complexos de lipídio catiônico da presente invenção são CCL-2, CCL-3, e CCL-4. Exemplos de citocinas que podem ser estimuladas pelos complexos de lipídio catiônico da presente invenção são IL-2, IL-8, IL-12 e IFN- γ . Os inventores contemplam que os complexos de lipídio catiônico da presente

25 invenção podem estimular quimiocinas e citocinas além daquelas descritas neste relatório descriptivo.

LIPÍDIOS

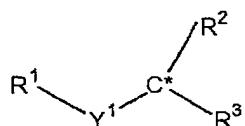
Os complexos de lipídio catiônico quirais da presente invenção podem formar lipossomas que são opcionalmente misturados com antígeno e podem conter os lipídios catiônicos quirais sozinhos ou lipídios catiônicos quirais em combinação com lipídios neutros. Espécies de lipídios catiônicos quirais adequados incluem, mas não são limitados aos enantiômeros R e S

de: 3- β [4N -(1N , 8 -diguanidino espermidina)-carbamoil]colesterol (BGSC); 3- β [N,N-diguanidinoetil-aminoetano-carbamoil]colesterol (BGTC); N, $N^1N^2N^3$ Tetra-metiltetrapalmitilespermina (celfectina); N-t-butil-N'-tetradecil-3-tetradecil-aminopropionamidina (CLONfectina); brometo de dimetildioctadecil amônio (DDAB); brometo de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidróxi etil amônio (DMRIE); trifluoroacetato de 2,3-dioleoilóxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-N,N-dimetil-1-propanamínio (DOSPA); 1,3-dioleoilóxi-2-(6-carboxiespermil)-propil amida (DOSPER); 4-(2,3-bis-palmitoilóxi-propil)-1-metil-1H-imidazol (DPIM), iodeto de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis(2-hidroxietil)-2,3-dioleoilóxi-1,4-butanodiamônio (Tfx-50); cloreto de N-1-(2,3-dioleoilóxi)propil-N,N,N-trimetil amônio (DOTMA) ou outros tensoativos de amônio N-(N,N-1-dialcóxi)-alquil-N,N,N-trissubstituídos; 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetilamônio)-butanol-sn-glicerol (DOBT) ou colesteril (4'-trimetilamônio)butanoato (ChOTB), onde o grupo trimetilamônio é conectado por meio de um braço espaçador de butanol ou à cadeia dupla (para DOBT) ou grupo colesterila (para ChOTB); DORI (DL-1,2-dioleoil-3-dimetilaminopropil- β -hidroxietilamônio) ou DORIE (DL-1,2-O-dioleoil-3-dimetilaminopropil- β -hidroxietilamônio-m) (DORIE) ou análogos dos mesmos como descritos em WO 93/03709; éster de colina de 1,2-dioleoil-3-succinil-sn-glicerol (DOSC); éster de hemissuccinato de colesterila (ChOSC); lipopoliaminas tais como dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS) e fosfatidiletanolamilespermina de dipalmitoíla (DPPES) ou os lipídios catiônicos descritos na patente US Número 5.283.185, iodeto de colesteril-3 β -carboxil-amido-etenotrimetilamônio, iodeto de carboxilato de 1-dimetilamino-3-trimetilamônio-DL-2-propil-colesterila, colesteril-3-O-carboxiamidoetileno-amina, iodeto de colesteril-3-O-oxissuccinamido-etenotrimetilamônio, iodeto de 1-dimetilamino-3-trimetilamônio-DL-2-propil-colesteril-3- β -oxissuccinato, iodeto de 2-(2-trimetilamônio)-etilmethylaminoetil-colesteril-3-P-oxissuccinato, 3- β -N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil colesterol (DC-col), e 3- β -N-(polietilenoimina)-carbamoilcolesterol; O,O'-dimiristil-N-lisil-aspartato (DMKE); O,O'-dimiristil-N-lisil-glutamato (DMKD); brometo de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidróxi etil amônio (DMRIE); 1,2-dilauroil-sn-

glicero-3-etilfosfocolina (DLEPC); 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DMEPC); 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DOEPC); 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DPEPC); 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DSEPC); 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio propano (DOTAP); dio-

5 leoil dimetilaminopropano (DODAP); 1,2-palmitoil-3-trimetilamônio propano (DPTAP); 1,2-diestearoil-3-trimetilamônio propano (DSTAP), 1,2-miristoil-3-trimetilamônio propano (DMTAP); e dodecil sulfato de sódio (SDS). A presente invenção contempla o uso de variantes estruturais e derivados dos lipídios catiônicos descritos neste pedido de patente.

10 Certos aspectos da presente invenção incluem lipídios catiônicos quirais não-esteroidais tendo uma estrutura representada pela fórmula seguinte:



15 em que R^1 é um grupo amônio quaternário, Y^1 é escolhido de uma cadeia de hidrocarboneto, um éster, uma cetona, e um peptídeo, C^* é um carbono quiral, R^2 e R^3 são independentemente escolhidos de um ácido graxo saturado, um ácido graxo insaturado, um hidrocarboneto ligado a éster, fósforodiésteres, e combinações dos mesmos. DOTAP, DMTAP, DSTAP, DPTAP, DPEPC, DSEPC, DMEPC, DLEPC, DOEPC, DMKE, DMKD, DOSPA, DOT-MA, são exemplos de lipídios que têm esta estrutura geral.

20 Em uma modalidade, lipídios catiônicos quirais da invenção são lipídios em que as ligações entre o grupo lipofílico e o grupo amino são estáveis na solução aquosa. Desse modo, um atributo dos complexos da invenção é sua estabilidade durante o armazenamento (isto é, sua habilidade para manter um diâmetro pequeno e reter a atividade biológica o passar do tempo seguindo sua formação). Tais ligações usadas nos lipídios catiônicos incluem ligações de amida, ligações de éster, ligações de éter e ligações de carbamoíla. Aqueles de habilidade na técnica entenderiam facilmente que os lipossomas contendo mais que uma espécie de lipídio catiônico podem ser usados para produzir os complexos da presente invenção. Por exemplo, li-

possomas compreendendo duas espécies de lipídios catiônicos, lisil-fosfatidiletanolamina e éster de colesterol de β -alanila foram descritos para certas aplicações de liberação de fármaco [Brunette, E. et al., Nucl. Acids Res., 20:1151 (1992)].

5 É para ser também entendido que considerando lipossomas catiônicos quirais adequados para o uso na invenção e mistura opcionalmente com antígeno, os métodos da invenção não são restringidos apenas ao uso dos lipídios catiônicos recitados acima mas do contrário, qualquer composição de lipídio pode ser usada desde que um lipossoma catiônico seja produzido e a densidade de carga catiônica resultante seja suficiente para ativar e induzir uma resposta imune.

10 Desse modo, os complexos da invenção podem conter outros lipídios além dos lipídios catiônicos quirais. Estes lipídios incluem, mas não são limitados a, liso lipídios dos quais lisofosfatidilcolina (1-oleoil lisofosfatidcolina) é um exemplo, colesterol, ou fosfolipídeos neutros incluindo dioleoil fosfatidil etanolamina (DOPE) ou dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) como também vários tensoativos lipofílicos, contendo porções de polietileno glicol, das quais Tween-80 e PEG-PE são exemplos.

15 Os complexos de lipídio catiônico quirais da invenção podem também conter lipídios negativamente carregados como também lipídios catiônicos contanto que a carga líquida dos complexos formados seja positiva e/ou a superfície do complexo seja positivamente carregada. Lipídios negativamente carregados da invenção são aqueles compreendendo pelo menos uma espécie de lipídio tendo uma carga negativa líquida em ou próximo do pH fisiológico ou combinações destes. Espécies de lipídios negativamente carregados adequados incluem, mas não são limitadas a, CHEMS (hemisuccinato de colesterila), NGPE (N-glutaril fosfatidiletanolamina), fosfatidil glicerol e ácido fosfatídico ou um análogo de fosfolipídeo similar.

20 Métodos para produzir os lipossomas a serem usados na produção do lipídio compreendendo complexos de liberação de fármaco da presente invenção são conhecidos àqueles de habilidade usual na técnica. Uma revisão das metodologias da preparação de lipossoma pode ser encontrada

em Liposome Technology (CFC Press, Nova Iorque 1984); Liposomes by Ostro (Marcel Dekker, 1987); Methods Biochem Anal. 33:337-462 (1988) e patente U. S. Número 5.283.185. Tais métodos incluem extrusão de congelamento-descongelamento e sonicação. Ambos os lipossomas unilamelares 5 (menos que cerca de 200 nm em diâmetro médio) e lipossomas multilamelares (maiores que cerca de 300 nm em diâmetro médio) podem ser usados como componentes de partida para produzir os complexos desta invenção.

Nos lipossomas catiônicos utilizados para produzir os complexos de lipídio catiônico desta invenção, o lipídio catiônico quiral está presente no 10 lipossoma em cerca de 10 % em mol a cerca de 100 % em mol de lipídio lipossomal total, ou de cerca de 20 % em mol a cerca de 80 % em mol. O lipídio neutro, quando incluso no lipossoma, pode estar presente a uma concentração de cerca de 0 % em mol a cerca de 90 % em mol do lipídio lipossomal total, ou de cerca de 20 % em mol a cerca de 80 % em mol, ou de 40 15 % em mol a 80 % em mol. O lipídio negativamente carregado, quando incluso no lipossoma, pode estar presente em uma concentração que varia de cerca de 0 % em mol a cerca de 49 % em mol do lipídio lipossomal total, ou de cerca de 0 % em mol a cerca de 40 % em mol. Em uma modalidade, os lipossomas contêm um quiral catiônico e um lipídio neutro, em razões entre 20 cerca de 2:8 a cerca de 6:4.

É também entendido que os complexos da presente invenção podem conter lipídios modificados, proteína, policátons ou ligantes de receptor que funcionam como um fator de visamento direcionando o complexo para um tecido particular ou tipo de célula. Exemplos de fatores de visamento incluem, mas não são limitados a, asialoglicoproteína, insulina, lipoproteína de densidade baixa (LDL), folato e anticorpos monoclonais e policlonais direcionados contra moléculas de superfície celular. Além disso, para modificar a meia-vida circulatória dos complexos, a carga de superfície positiva pode ser estericamente protegida incorporando tensoativos lipofílicos que 25 contêm porções de polietileno glicol.

Os complexos de lipídio catiônico podem ser armazenados em solução isotônica de sacarose ou dextrose sob coletânea do gradiente de

sacarose ou eles podem ser liofilizados e depois reconstituídos em uma solução isotônica antes do uso. Em uma modalidade, os complexos de lipídio catiônico são armazenados na solução. A estabilidade dos complexos de lipídio catiônico da presente invenção é medida através de ensaios específicos para determinar a estabilidade física e atividade biológica dos complexos de lipídio catiônico com o passar do tempo sob armazenamento. A estabilidade física dos complexos de lipídio catiônico é medida determinando o diâmetro e a carga dos complexos de lipídio catiônico através de métodos conhecidos àqueles de habilidade usual na técnica, incluindo por exemplo, microscopia de elétron, cromatografia de filtração em gel ou por meio de espllhamento de luz quase elástico usando, por exemplo, um analisador de tamanho de partícula Coulter N4SD como descrito no Exemplo. A estabilidade física do complexo de lipídio catiônico é "substancialmente inalterada" sob armazenamento quando o diâmetro dos complexos de lipídio catiônico armazenados não for aumentado em mais que 100%, ou em não mais que 50%, ou em não mais que 30%, no diâmetro dos complexos de lipídio catiônico como determinado na ocasião que os complexos de lipídio catiônico forem purificados.

Embora seja possível para o lipídio catiônico quiral ser administrado em uma forma pura ou substancialmente pura, é preferível apresentar o mesmo como uma composição, formulação ou preparação farmacêutica. Formulações farmacêuticas usando os complexos de lipídio catiônico quirais da invenção podem compreender os complexos de lipídio catiônico em um tampão fisiologicamente estéril compatível tal como, por exemplo, solução salina isotônica, tamponada de fosfato, ou tampão de resistência iônica baixa, tal como acetato ou Hepes (um pH exemplar sendo na faixa de cerca de 3,0 a cerca de 8,0). Os complexos de lipídio catiônico quirais podem ser administrados como aerossóis ou como soluções líquidas para administração intratumoral, intra-arterial, intravenosa, intratraqueal, intraperitoneal, subcutânea, e intramuscular.

As formulações da presente invenção podem incorporar qualquer estabilizante conhecido na técnica. Estabilizantes ilustrativos são coles-

terol e outros esteróis que podem ajudar na rigidez da bicamada de lipossoma e podem impedir desintegração ou desestabilização da bicamada. Também agentes tais como polietileno glicol, poli e monossacarídeos podem ser incorporados no lipossoma para modificar a superfície do lipossoma e impedir o mesmo de ser desestabilizado devido à interação com o sangue-componentes. Outros estabilizantes ilustrativos são proteínas, sacarídeos, ácidos inorgânicos, ou ácidos orgânicos que podem ser usados sozinhos ou como misturas.

Vários métodos farmacêuticos podem ser empregados para controlar, modificar, ou prolongar a duração da estimulação imune. Preparações de liberação controlada podem ser alcançadas através do uso de complexos poliméricos tais como poliésteres, poliaminoácidos, metilcelulose, polivinila, poli(ácido láctico), e hidrogéis para encapsular ou atrair os lipídios catiônicos e lentamente os liberar. Polímeros similares podem também ser usados para adsorver os lipossomas. Os lipossomas podem ser contidos nas formulações de emulsão para alterar o perfil de liberação do estimulante. Alternativamente, a duração da presença do estimulante na circulação sanguínea pode ser intensificada revestindo a superfície do lipossoma com compostos tais como polietileno glicol ou outros polímeros e outras substâncias tais como sacarídeos que são capazes de intensificar o tempo de circulação ou meia-vida dos lipossomas e emulsões.

Quando preparações orais forem requeridas, os lipídios catiônicos quirais podem ser combinados com veículos farmacêuticos típicos conhecidos na técnica tais como, por exemplo, sacarose, lactose, metilcelulose, carboximetil celulose, ou goma arábica, entre outros. Os lipídios catiônicos podem também ser encapsulados em cápsulas ou comprimidos para liberação sistêmica.

Administração do lipídio catiônico quiral da presente invenção pode ser para um propósito profiláctico ou terapêutico. Quando dado profilaticamente, o lipídio catiônico é fornecido com antecedência de qualquer evidência ou sintomas de enfermidade. Quando dado terapeuticamente, o lipídio catiônico é fornecido ao princípio da doença ou após. A administração

terapêutica do imune-estimulante serve para atenuar ou curar a doença. Para ambos os propósitos, o lipídio catiônico pode ser administrado com um/uns agente(s) terapêutico(s) adicional(is) ou antígeno(s). Quando os lipídios catiônicos forem administrados com um agente terapêutico ou antígeno 5 adicional, o efeito profiláctico ou terapêutico pode ser gerado contra uma doença específica.

As formulações da presente invenção, tanto para uso veterinário quanto humano, compreendem um lipídio catiônico quiral sozinho como descrito acima, como uma mistura de enantiômeros R e S, ou também opcionalmente, com um ou mais ingredientes terapêuticos tais como um/uns antígeno(s) ou molécula(s) de fármaco. As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer método conhecido na técnica farmacêutica.

ANTÍGENOS

15 Em uma modalidade, o lipídio catiônico quiral é administrado sem qualquer agente adicional a fim de reforçar ou diminuir várias respostas imunes, incluindo produção de outros moduladores imunes, e reforçar a resposta imune à doença combatida. Em outra modalidade, o lipídio catiônico quiral é administrado em combinação com um antígeno ou antígenos. Neste 20 caso, o objetivo é gerar uma resposta imune que seja específica para o(s) antígeno(s) liberado(s) em combinação com o lipídio catiônico. A resposta gerada pode incluir produção de células T citotóxicas específicas, células T de memória, ou células B resultando na prevenção ou resposta terapêutica à doença específica associada àquele(s) antígeno(s). O antígeno pode ser 25 qualquer antígeno associado ao tumor ou antígeno microbiano ou qualquer outro antígeno conhecido a alguém versado na técnica.

Um "antígeno associado ao tumor", como aqui usado é uma molécula ou composto (por exemplo, uma proteína, peptídeo, polipeptídeo, lipoproteína, lipopeptídio, glicoproteína, glicopeptídeos, glicolipídeos, carboidrato, RNA, e/ou DNA) associado a um tumor ou célula cancerosa e que é capaz de provocar uma resposta imune (humoral e/ou celular) quando expressado na superfície de umas células de apresentação de antígeno no

contexto de uma molécula do complexo de histocompatibilidade principal ("MHC"). Antígenos associados ao tumor incluem autoantígenos, como também outros antígenos que especificamente podem não estar associados a um câncer, mas no entanto intensificam uma resposta imune e/ou reduzem o crescimento de um tumor ou célula cancerosa quando administrado a um animal. Modalidades mais específicas são fornecidas aqui.

Um "antígeno microbiano", como aqui usado, é um antígeno de um micro-organismo e inclui, mas não é limitado a, vírus infecciosos, bactérias infecciosas, parasitas infecciosos e fungos infecciosos. Antígenos microbianos podem ser micro-organismos intactos, e isolados naturais, fragmentos, ou derivados dos mesmos, compostos sintéticos que são idênticos ou similares aos antígenos microbianos de ocorrência natural e, preferivelmente, induzem uma resposta imune específica para o micro-organismo correspondente (do qual o antígeno microbiano de ocorrência natural originou-se). Em uma modalidade preferida, um composto é similar a um antígeno de micro-organismo de ocorrência natural se induzir uma resposta imune (humoral e/ou celular) similar a um antígeno de micro-organismo de ocorrência natural. Compostos ou antígenos que são similares a um antígeno de micro-organismo de ocorrência natural são bem-conhecidos àqueles de habilidade usual na técnica, tais como, por exemplo, uma proteína, peptídeo, polipeptídeo, lipoproteína, lipopeptídio, glicoproteína, glicopeptídeos, lipídio, glicolipídio, carboidrato, RNA, e/ou DNA. Outro exemplo não limitativo de um composto que é similar a um antígeno de micro-organismo de ocorrência natural é um mimético de peptídeo de um antígeno de polissacárido. Modalidades mais específicas são fornecidas aqui.

O termo "antígeno" é também intencionado abranger análogos de peptídeo ou de proteína de antígenos conhecidos ou do tipo selvagem tais como aqueles descritos neste relatório descritivo. Os análogos podem ser mais solúveis ou mais estáveis que o antígeno do tipo selvagem, e podem também conter mutações ou modificações que tornam o antígeno mais imunologicamente ativo. Antígeno pode ser modificado de qualquer maneira, tal como adicionando porções de lipídio ou de açúcar, mutando as sequên-

cias de aminoácido do peptídeo ou da proteína, mutando a sequência de DNA ou de RNA, ou qualquer outra modificação conhecida a alguém versado na técnica. Os抗ígenos podem ser modificados usando métodos padrões conhecidos por alguém versado na técnica.

- 5 Também úteis nas composições e métodos da presente invenção são peptídeos ou proteínas que têm sequências de aminoácido homólogas com a sequência de aminoácido de um抗ígeno desejado, onde o抗ígeno homólogo induz uma resposta imune para o respectivo tumor, micro-organismo ou célula infectada.
- 10 Em uma modalidade, o抗ígeno no complexo de lipídio catiônico compreende um抗ígeno associado a um tumor ou câncer, isto é, um抗ígeno associado ao tumor, para fazer uma vacina para impedir ou tratar um tumor. Como tal, em uma modalidade, as vacinas de tumor ou de câncer da presente invenção também compreendem pelo menos um epitopo de pelo 15 menos um抗ígeno associado ao tumor. Em outra modalidade preferida, as vacinas de tumor ou câncer da presente invenção também compreendem uma pluralidade de epitopos de um ou mais抗ígenos associados ao tumor. Os抗ígenos associados ao tumor que encontram uso nos complexos de lipídio catiônico e métodos da presente invenção podem ser inherentemente 20 imunogênicos, ou não-imunogênicos, ou ligeiramente imunogênicos. Como demonstrado aqui, até mesmo autoantígenos associados ao tumor podem ser vantajosamente empregados nas vacinas em questão para efeito terapêutico, uma vez que as composições em questão são capazes de quebrar a tolerância imune contra tais抗ígenos. Antígenos exemplares incluem, 25 mas não são limitados a,抗ígenos sintéticos, recombinantes, estranhos, ou homólogos, e materiais antigênicos podem incluir, mas não limitam a, proteínas, peptídeos, polipeptídeos, lipoproteínas, lipopeptídios, lipídios, glicolipídios, carboidratos, RNA e DNA. Exemplos de tais vacinas incluem, mas não são limitadas a, aquelas para o tratamento ou prevenção de câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer cervical, câncer pulmonar, câncer de próstata, carcinoma de intestino, ou qualquer outro câncer conhecido na técnica usando um lipídio catiônico em um complexo com 30

um/uns antígeno(s) associado(s) ao tumor. É também possível formular o antígeno com o lipídio catiônico sem encapsulá-lo no lipossoma. Desse modo, complexos de lipídio catiônico quirais da presente invenção podem ser usados nos métodos para tratar ou impedir câncer. Em um tal caso, o mamífero a ser imunizado pode ser injetado com a formulação farmacêutica contendo o lipossoma com o(s) antígeno(s) encapsulado(s).

Antígenos associados ao tumor adequados para o uso na presente invenção incluem tanto moléculas de ocorrência natural quanto modificadas, que pode ser indicativo de tipo de tumor simples, compartilhadas entre vários tipos de tumores, e/ou exclusivamente expressas ou sobre-expressas em células tumorais comparadas com células normais. Além das proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, peptídeos, e lipopeptídios, padrões tumor-específicos de expressão de carboidratos, gangliosídeos, glicolipídios, e mucinas foram também documentados. Antígenos associados ao tumor exemplares para o uso em vacinas de câncer incluem produtos de proteína de oncogenes, genes supressores de tumor, e outros genes com mutações ou rearranjos únicos para as células tumorais, produtos de gene embrionários reativados, antígenos oncofetais, antígenos de diferenciação tecido-específicos (mas não tumor-específicos), receptores de fator de crescimento, resíduos de carboidrato de superfície celular, proteínas vírais estranhas, e vários outras autoproteínas.

Modalidades específicas de antígenos associados ao tumor incluem, por exemplo, antígenos mutados ou modificados tais como os produtos de proteína dos proto-oncogenes de Ras p21, supressor de tumor p53 e oncogenes HER-2/neu e BCR-abl, como também CDK4, MUM1, Caspase 8, e beta catenina; antígenos sobre-expressados tais como galectina 4, galectina 9, anidrase carbônica, Aldolase A, PRAME, Her2/neu, ErbB-2 e KSA, antígenos oncofetais tais como fetoproteína alfa (AFP), gonadotropina coriônica humana (hCG); autoantígenos tais como antígeno carcinoembrônico (CEA) e antígenos de diferenciação de melanócitos tais como Mart 1/Melan A, gp100, gp75, Tirosinase, TRP1 e TRP2; antígenos associados à próstata tais como PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 e PSM-P2; produtos de gene embrio-

nário reativados tais como MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE, e outros抗ígenos de testiculares cancerígenos como NY-ESO1, SSX2 e SCPI; mucinas tais como Muc-1 e Muc-2; gangliosídeos tais como GM2, GD2 e GD3, glicolipídeos e glicoproteínas neutros tais como Lewis (y) e globo-H; e glicoproteínas tais como Tn, antígeno de Thompson-Freidenreich (TF) e sTn. Também inclusos aqui como抗ígenos associados ao tumor são lisados de célula inteira e de célula tumoral como também porções imunogênicas dos mesmos, como também idiotipos de imunoglobulina expressos em proliferações monoclonais de linfócitos B para o uso contra linfomas de célula B.

Antígenos associados ao tumor e seus respectivos alvos de célula tumoral incluem, por exemplo, citoqueratinas, particularmente citoqueratina 8, 18 e 19, como抗ígenos para carcinoma. Antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno embrionário humano (HEA-125), glóbulos de gordura de leite humano, MBr1, MBr8, Ber-EP4, 17-1A, C26 e T16 são também抗ígenos de carcinoma conhecidos. Desmina e actina músculo-específica são抗ígenos de sarcomas miogênicos. Fosfatase alcalina placentária, gonadotropina coriônica beta-humana, e fetoproteína alfa são抗ígenos de tumores trofoblásticos e de célula germinal. Antígeno específico para próstata é um抗ígeno de carcinomas prostáticos, antígeno carcinoembriônico de adenocarcinomas de cólon. HMB-45 é um抗ígeno de melanomas. Em câncer cervical,抗ígenos úteis poderiam ser codificados por vírus do papiloma humano. Cromagranina-A e sinaptofisina são抗ígenos de tumores neuroendócrinos e neuroectodérmicos. De interesse particular são tumores agressivos que formam massas de tumor sólido tendo áreas necróticas. A lise de tais células necróticas é uma fonte rica de抗ígenos para células de apresentação de抗ígeno, e desse modo, a terapia em questão pode encontrar uso vantajoso junto com quimioterapia convencional e/ou terapia de radiação.

Em uma modalidade, os抗ígenos do vírus do papiloma humano, HPV, são usados. Um抗ígeno de HPV específico que usou como um抗ígeno associado ao tumor é HPV subtipo 16 E7. Complexos de抗ígeno-

lipídios catiônicos de HPV E7 são efetivos para impedir e tratar câncer cervical. Além disso, uma proteína de E7 geneticamente engenheirada, isto é, Proteína de E7m, tendo atividade antigênica, mas sem atividade tumorigênica, é um antígeno associado ao tumor efetivo. Complexos de E7m-lipídios 5 catiônicos induzem imunidade celular para causar regressão completa dos tumores estabelecidos e, desse modo, são úteis como vacinas potentes de câncer anticervical.

Antígenos associados ao tumor podem ser preparados por métodos bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, estes antígenos podem ser 10 preparados de células cancerosas preparando extratos brutos de células cancerosas (por exemplo, como descrito em Cohen et al., Cancer Res., 54:1055 (1994)), parcialmente purificando os antígenos, através de tecnologia recombinante, ou por síntese de novo dos antígenos conhecidos. O antígeno pode também ser na forma de um ácido nucleico que codifica um 15 peptídeo antigênico em uma forma adequada para expressão em um sujeito e apresentação ao sistema imune do sujeito imunizado. Também, o antígeno pode ser um antígeno completo, ou pode ser um fragmento de um antígeno completo compreendendo pelo menos um epitopo.

Antígenos derivados de patógenos conhecidos predispostos a 20 certos cânceres podem também ser vantajosamente incluídos nas vacinas de câncer da presente invenção. É estimado que perto de 16% da incidência mundial de câncer possa ser atribuído a patógenos infecciosos; e várias malignidades comuns são caracterizadas pela expressão de produtos gênicos virais específicos. Desse modo, a inclusão de um ou mais antígenos de 25 patógenos implicados em causar câncer pode ajudar a ampliar a resposta imune do hospedeiro e intensificar o efeito profiláctico ou terapêutico da vacina de câncer. Patógenos de interesse particular para uso nas vacinas de câncer fornecidas aqui incluem vírus da hepatite B (carcinoma hepatocelular), vírus da hepatite C (hepatomas), vírus de Epstein Barr (EBV) (linfoma de Burkitt, 30 câncer de nasofaringe, PTLD em indivíduos imunossuprimidos), HTLV (leucemia de célula T adulta), vírus do papiloma humano oncogênicos tipos 16, 18, 33, 45 (câncer cervical adulto), e a bactéria Helicobacter pylori (linfoma

gástrico de célula B). Outros micro-organismos medicalmente relevantes que podem servir como抗ígenos em mamíferos e mais particularmente humanos são descritos extensivamente na literatura, por exemplo, C. G. A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Grã Bretanha 1983, os conteúdos inteiros deste são por este meio incorporados por referência.

Em outra modalidade, o抗ígeno no complexo de lipídio catiônico compreende um抗ígeno derivado ou associado a um patógeno, isto é, um抗ígeno microbiano. Como tal, em uma modalidade, as vacinas de patógeno da presente invenção também compreendem pelo menos um epitopo de pelo menos um抗ígeno microbiano. Patógenos que podem ser visados pelas vacinas em questão incluem, mas não são limitados a, vírus, bactérias, parasitas e fungos. Em outra modalidade, as vacinas de patógeno da presente invenção também compreendem uma pluralidade de epitopos de um ou mais抗ígenos microbianos.

Os抗ígenos microbianos que encontram uso nos complexos de lipídio catiônico e métodos podem ser inherentemente imunogênicos, ou não-imunogênicos, ou ligeiramente imunogênicos. Antígenos exemplares incluem, mas não são limitados a,抗ígenos sintéticos, recombinantes, estranhos, ou homólogos, e materiais抗ígenicos podem incluir, mas não limitados a, as proteínas, peptídeos, polipeptídeos, lipoproteínas, lipopeptídios, lipídios, glicolipídios, carboidratos, RNA, e DNA.

Patógenos virais exemplares incluem, mas não são limitados a, vírus que infectam mamíferos, e mais particularmente seres humanos. Exemplos de vírus incluem, mas não são limitados a: Retroviridae (por exemplo, vírus da imunodeficiência humana), tal como HIV-1 (também referido como HTLV-III, LAV ou HTLV-III/LAV, ou HIV-III; e outros isolados, tais como HIV-LP; Picornaviridae (por exemplo vírus do pólio, vírus da hepatite A; entrovírus, vírus da Coxsackie humano, rinovírus, ecovírus); Calciviridae (por exemplo cepas que causam gastroenterite); Togaviridae (por exemplo vírus da encefalite equina, vírus da rubéola); Flaviridae (por exemplo vírus da dengue, vírus da encefalite, vírus da febre amarela); Coronoviridae (por exemplo coronavírus); Rhabdoviridae (por exemplo vírus da estomatite vesicular).

cular, vírus da raiva); Coronaviridae (por exemplo coronavírus); Rhabdoviridae (por exemplo vírus da estomatite vesicular, vírus da raiva); Filoviridae (por exemplo vírus ebola); Paramyxoviridae (por exemplo vírus da parainfluenza, vírus da caxumba, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório); Orthomyxoviridae (por exemplo vírus da influenza); Bungaviridae (por exemplo Vírus de Hantaan, vírus de bunga, flebovírus e vírus de Nairo); Arena viridae (vírus da febre hemorrágica); Reoviridae (por exemplo reovírus, orbivírus e rotavírus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (vírus da hepatite B); Parvoviridae (parvovírus); Papovaviridae (vírus do papiloma, vírus do polioma); Adenoviridae (maioria adenovírus); Herpesviridae vírus do herpes simples (HSV) 1 e 2, zostervírus da varicela, citomegalovírus (CMV), vírus do herpes; Poxviridae (vírus da varíola, vírus da vacínia, poxvírus); e Iridoviridae (por exemplo vírus da febre suína africana); e vírus não classificados (por exemplo, os agentes etiológicos das encefalopatias espongiformes, o agente da hepatite delta (acreditado ser um satélite defeituoso do vírus da hepatite B), os agentes da hepatite não-A, não-B (classe 1 = internamente transmitida; classe 2 = parenteralmente transmitida (isto é, Hepatite C); vírus de Norwalk e relacionados, e astrovírus).

Também, bactérias gram-negativas e gram-positivas podem ser visadas pelas composições e métodos em questão em animais vertebrados. Tais bactérias gram-positivas incluem, mas não são limitadas a, as espécies de *Pasteurella*, espécies de *Staphylococci*, e espécies de *Streptococcus*. Bactérias gram-negativas incluem, mas não são limitadas a, *Escherichia coli*, espécies de *Pseudomonas*, e espécies de *Salmonella*. Exemplos específicos de bactérias infecciosas incluem, mas não são limitados a: *Helicobacter pyloris*, *Borella burgdorferi*, *Legionella pneumophilia*, *Mycobacteria sps* (por exemplo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordoneae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* do Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* do Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (anaerobic sps.), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.* patogênico,

- Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus antracis*, *corynebacterium diphtheriae*, *corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*,
- 5 *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, e *Actinomyces israelii*.

Polipeptídeos de patógenos bacterianos que podem encontrar uso como fontes de抗ígenos microbianos nas composições em questão incluem, mas não são limitados a, uma proteína de membrana externa regulada por ferro, ("TROMP"), uma proteína de membrana externa ("OMP"), e uma proteína A de *Aeromonis salmonicida* que causa furunculose, proteína p57 de *Renibacterium salmoninarum* que causa doença renal bacteriana ("BKD"), antígeno associado à superfície principal ("msa"), uma citotoxina expressa na superfície ("mpr"), uma hemolisina expressa na superfície ("ish"), e um antígeno flagelar de *Yersiniosis*; uma proteína extracelular ("ECP"), uma proteína de membrana externa regulada por ferro ("TROMP"), e uma proteína estrutural de *Pasteurellosis*; uma OMP e uma proteína flagelar de *Vibrosis anguillarum* e *V. ordalii*; uma proteína flagelar, uma proteína de OMP, aroA, e purA de *Edwardsiellosis ictaluri* e *E. tarda*; e antígeno de superfície de *Ichthyophthirius*; e uma proteína estrutural e reguladora de *Cytophaga colummari* de; e uma proteína estrutural e reguladora de *Rickettsia*. Tais抗ígenos podem ser isolados ou preparados recombinantemente ou por quaisquer outros meios conhecidos na técnica.

Exemplos de patógenos também incluem, mas não são limitados a, fungos que infetam mamíferos, e mais particularmente humanos. Exemplos de fungos incluem, mas não são limitados a: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, e *Candida albicans*. Exemplos de parasitas infectiosos incluem *Plasmodium* tais como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, e *Plasmodium vivax*. Outros organismos infectiosos (isto é, protistas) incluem *Toxoplasma gondii*. Polipeptídeos de um patógeno parasitário incluem, mas não são limitados a, os抗ígenos de su-

perfície de *Ichthyophthirius*.

Outros micro-organismos medicalmente relevantes, que servem como antígenos em mamíferos e mais particularmente seres humanos, são descritos extensivamente na literatura (por exemplo, vide C. G. A Thomas, 5 Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Grã Bretanha 1983). Além do tratamento de doenças humanas infecciosas e patógenos humanos, as composições e métodos da presente invenção são úteis para tratar infecções de mamíferos não-humanos. Muitas vacinas são reveladas para o tratamento de mamíferos não-humanos em Bennett, K. Compendium of Veterinary Products, 10 3^a ed. North American Compendiums, Inc., 1995; vide também WO 02/069369, a revelação destes é expressamente incorporada por referência aqui em sua totalidade.

Patógenos não-humanos exemplares incluem, mas não são limitados a, vírus tumoral mamário de camundongo ("MMTV"), vírus do sarcoma de Rous ("RSV"), vírus da leucemia aviária ("ALV"), vírus da mieloblastose aviária ("AMV"), vírus da leucemia murina ("MLV"), vírus da leucemia felina ("FeLV"), vírus do sarcoma murino ("MSV"), vírus da leucemia de macaco gibão ("GALV"), vírus da necrose do baço ("SNV"), vírus da reticuloendoteliase ("RV"), vírus do sarcoma símio ("SSV"), vírus do macaco de Mason-Pfizer ("MPMV"), retrovírus símio tipo 1 ("SRV-1"), lentivírus tais como HIV-1, 15 HIV-2, SIV, vírus de Visna, vírus da imunodeficiência felina ("FIV"), e vírus da anemia infeccioso equina ("EIAV"), vírus da leucemia de células T tais como HTLV-1, HTLV-II, vírus da leucemia de células T símia ("STLV"), e vírus da leucemia bovina ("BLV"), e vírus espumosos tais como vírus espumoso humano ("HFV"), vírus espumoso símio ("SFV") e vírus espumoso bovino ("BFV").

Em algumas modalidades, "tratamento", "tratar" e "tratando", como aqui usados com referência aos patógenos infecciosos, referem-se a um tratamento profiláctico que aumenta a resistência de um sujeito à infecção com um patógeno ou diminui a probabilidade que o sujeito será infectado com o patógeno; e/ou tratamento após o sujeito ter sido infectado para combater a infecção, por exemplo, reduzir ou eliminar a infecção ou impedir

de ficar pior.

Antígenos microbianos podem ser preparados por métodos bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, estes antígenos podem ser preparados diretamente de células virais e bacterianas preparando extratos brutos, parcialmente purificando os antígenos, ou alternativamente através de tecnologia recombinante ou através de síntese de novo de antígenos conhecidos. O antígeno pode também estar na forma de um ácido nucleico que codifica um peptídeo antigênico em uma forma adequada para expressão em um sujeito e apresentação ao sistema imune do sujeito imunizado. Também, o antígeno pode ser um antígeno completo, ou pode ser um fragmento de um antígeno completo compreendendo pelo menos um epitopo.

Para melhorar a incorporação do antígeno nas vesículas de lipídios catiônicos quirais e também melhorar a liberação às células do sistema imune, o antígeno pode ser conjugado com uma cadeia de lipídio para melhorar sua solubilidade nas cadeias de acila hidrofóbica do lipídio catiônico, enquanto mantendo as propriedades antigênicas da molécula. O antígeno lipidado pode ser uma lipoproteína, ou um lipopeptídio, e combinações dos mesmos. O antígeno lipidado pode ter um ligador conjugado entre o lipídio e o antígeno tal como, por exemplo, uma lisina de α ou ϵ -palmitoíla N-terminal pode ser conectada ao antígeno por meio de um ligador de Ser-Ser de dipéptideo. Pedido de Patente U. S. Número 12/049.957 descreve que o complexo de DOTAP/E7-lipopeptídio exibiu umas respostas de linfócito T CD8+ antígeno-específica funcional intensificada *in vivo* comparada à formulação de DOTAP/E7, e portanto forneceu eficácia antitumor superior.

A presente invenção será também apreciada levando em conta o exemplo seguinte.

EXEMPLO

ESTIMULAÇÃO EFETIVA DO SISTEMA IMUNE POR ENANTIÔMEROS DE LIPÍDIOS CATIÔNICOS

1. LINHAGENS CELULARES E PEPTÍDEOS

Células TC-1 são células endoteliais pulmonares de camundongo C57BL/6 que foram transformadas com os oncogenes HPV16 E6 e E7 e

ativaram H-ras. Células foram crescidas em meio RPMI (comercialmente disponível de Invitrogen de Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 100 U/ml de penicilina, e 100 mg/ml de estreptomicina. O peptídeo restrito da classe I de MHC da proteína de 16 E7 de HPV (aminoácido 5 11 a 20, YMLDLQPETT [SEQ. ID. NO. 1]) foi sintetizado pela University of Pittsburgh Peptide Synthesis Facility por síntese de estado sólido usando um sintetizador de peptídeo de Advanced ChemTech modelo 200 e purificado por HPLC.

2. PREPARAÇÃO DE COMPLEXOS DE LIPÍDIO/ANTÍGENO E DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS

Os enantiômeros de DOTAP foram providos por Merck AG (E-PROVA), Suíça. Todos os outros lipídios foram comprados de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Lipossomas de DOTAP unilamelares pequenos foram preparados por hidratação de filme fino seguido por extrusão. O lipídio, em 15 clorofórmio, foi secado como uma camada fina sob um fluxo de nitrogênio em um tubo de vidro. O filme fino foi dessecado a vácuo por 2-3 h e depois reidratado em água do tipo de cultura celular (comercialmente disponível de Cambrex de Walkersville, MD) ou tampão (tais tampões são bem-conhecidos àqueles versados na técnica) contendo peptídeo E7 a uma concentração final de 0,7 mg de lipídios e 0,1 mg de E7 por ml (razão molar = 20 11:1). A dispersão de lipídio foi extrudada sequencialmente através de membranas policarbonato com tamanho de poro de 0,4, 0,2, e 0,1 µm. O peptídeo não capturado não foi removido. Os lipossomas foram armazenados a 4 °C até o uso. Associação do peptídeo E7 com o lipossoma foi determinada medindo a porcentagem de peptídeo ligado ao lipossoma. Em resumo, o peptídeo E7 não-ligado dos complexos de R-DOTAP/E7, S-DOTAP/E7 ou RS-DOTAP/E7 foi separado por um dispositivo de filtrado centrífugo Microcon® (Millipore, Bedford, MA) e a concentração de peptídeo não-ligado foi medida pelo kit de Ensaio de Proteína Micro BCA™ (Pierce, 25 Rockford, IL). A eficiência da associação do peptídeo foi determinada como porcentagem de peptídeo não-ligado. Outros métodos usados na preparação de lipossoma geral que são bem-conhecidos àqueles versados na técnica

podem também ser usados.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados são apresentados como \pm SD médio de pelo menos 3 experimentos independentes. Testes t de Student de bicaudal foram usados para avaliar a significação estatística pelas diferenças nas médias. Significação foi fixada em $p < 0,05$.

4. ENANTIÔMEROS R E S INDIVIDUAIS DOS COMPLEXOS DE LIPÍDIO CATIONICO/E7 ATIVAM CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS SIMILARMENTE À MISTURA RACÊMICA DE DOATP.

Lipossomas catiônicos foram preparados como descrito acima. O antígeno E7 usado na formulação é o peptídeo E7 humano identificado restrinido por HLA-A*0201 [HPV-16 E7, aminoácidos 11-20, YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO. 1)]. O peptídeo foi sintetizado pela University of Pittsburgh, Molecular Medicine Institute, Pittsburgh, PA. Células dendríticas humanas de HLA-A2 humano foram obtidas de Lonza (de Walkersville, MD). Criofrascos congelados foram descongelados e as células dendríticas foram cultivadas em meio LGM-3 (comercialmente disponível de Lonza de Walkersville, MD) suplementado com 50 microgramas/ml de IL-4 e GM-CSF a 37°C e 5% de CO₂ a uma densidade de colocação em placa inicial de 125.000 células/cm² em 2 ml de meio em pratos de cultura de tecido de 12 poços. As células foram crescidas durante 3 dias em cultura e pareceram como uma mistura de células aderentes e arredondadas através de exame microscópico.

As células foram tratadas no dia 3 com uma dose fresca de 50 microgramas/ml de IL-4 e GM-CSF (todos os poços) e poços de teste foram tratados com uma mistura de interleucina 1-beta ("IL-β"), interleucina 6 ("IL-6") e TNF-α a 10 ng/ml, e prostaglandina E2 ("PGE-2") a 10 µg/ml (controle positivo para ativação), nenhum tratamento (controle de ativação negativo), e S-DOTAP/E7 em concentrações finais de 2,5, 10 e 40 micromolares, e R-DOTAP/E7 em concentrações finais de 2,5, 10 e 40 micromolares. As células dendríticas tratadas foram mantidas na cultura por 24 horas e colhidas para tingimento de marcador de superfície celular e análise de citometria de fluxo. As células colhidas foram contadas por hemacitômetro e 10 µl dos

conjugados de anticorpo seguintes foram acrescentados sequencialmente a cada amostra para marcação dos marcadores de superfície: CD80-FITC, CD83-APC, e CD86-PE (BD Biosciences). As células marcadas na superfície foram subsequentemente analisadas através de citometria de fluxo usando um citômetro de fluxo BD FACxcaliber, e as moléculas de marcadores coestimuladores de células dendríticas CD80, CD83, e CD86 que são produzidas sob ativação, foram monitoradas. Como visto nas figuras 2, 3 e 4, células dendríticas humanas primárias tratadas com ambos os enantiômeros do complexo de lipídio catiônico/E7 suprarregulam a expressão de todos os três marcadores coestimuladores de ativação de células dendríticas avaliada e requerida para apresentação de antígeno com sucesso às células T, similarmente ao que foi observado com a mistura racêmica (RS-DOTAP) do lipídio catiônico e relatado no Pedido de Patente U. S. Número 12/049.957, atribuído ao cessionário do presente pedido.

15 5. COMPLEXOS DE LIPÍDIO CATIÔNICO / E7 QUE CONSISTEM EM ENANTIÔMEROS R E S INDIVIDUAIS EXIBEM POTÊNCIAS DIFERENTES NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS PARA INDUZIR QUIMIOCINA E PRODUÇÃO DE CITOCINA

Células dendríticas DE HLA-A2 humano (Lonza, Walkersville, MD), foram tratadas e crescidas em cultura como descrito acima. No dia 3, as células foram tratadas com 40 micromolares de complexo de DOTAP/E7 ou o lipopolissacarídeo imunoestimulador potente (LP) em concentrações de 50 micromolares (controle positivo). Meio dos poços de ensaio foi removido e centrifugado a 1300 rpm em uma microcentrifuga durante 5 minutos para empelotar as células dendríticas soltas. Os sobrenadantes foram removidos e tratados com 10 microlitros por ml de conjunto de coquetel de inibidor de protease I de Calbiochem (La Jolla, CA) (Cat. No. 539131) e armazenados gelados antes da análise. As amostras foram analisadas para expressão de quimiocina e citocina através de ensaio de ELISA Searchlight Protein Array Multiplex [Pierce Biotechnology (Woburn, MA)].

Produção das quimiocinas selecionadas conhecidas ser essenciais na resposta imune celular, CCL3, CCL4, CCL5, e CCL19, foi avaliada, e

a produção de IL-2, IL-8 e IL-12 foi avaliada (figuras 5-11, que ilustram a habilidade de R-DOTAP/E7 e S-DOTAP/E7 para induzir produção de CCL3, CCL4, CCL5, CCL-19, IL-2, IL-8 e IL-12). As figuras ilustram que o complexo de DOTAP/E7 contendo os enantiômeros individuais de DOTAP induz produção de citocina e quimiocina através das células dendríticas humanas. Ambos os enantiômeros ativam o sistema imune, porém em extensões diferentes com o enantiômero R exibindo potência mais alta.

5 6. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE TUMORES HPV-POSITIVOS DE TC-
10 1 EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM COMPOSIÇÕES DE DOTAP/E7
10 EM DOSES VARIADAS DE MISTURAS RACÊMICAS DE DOTAP.

Na figura 12, os camundongos foram subcutaneamente injetados com células TC-1 no dia 0 para induzir o crescimento de tumores HPV-positivos. As composições de DOTAP/E7 eram compreendidas de misturas racêmicas de DOTAP. Os camundongos receberam as composições de 15 DOTAP/E7 contendo 10 Kg de peptídeo E7 subcutaneamente no lado oposto do abdômen no dia 6. Concentração de lipídio de DOTAP no complexo variou de 3 a 600 mols (3, 15, 30, 75, 150, 300, e 600 mols). Dose baixa de DOTAP (15 nmols) mostrou efeito de inibição parcial do tumor ($P < 0,05$) comparado ao controle sem tratar no dia 23, enquanto DOTAP em 30, 150 20 ou 300 nmols exibiu uma eficácia intensificada ($P < 0,01$). DOTAP em 75 nmols mostrou o efeito de regressão do tumor mais significativo ($P < 0,001$). Novamente, camundongos dados com uma dose alta de DOTAP (600 nmols) não mostraram atividade antitumor, confirmando que os lipossomas de DOTAP em uma dose alta poderiam ter induzido uma regulação negativa 25 à resposta imune. Além disso, os lipossomas de DOTAP na dose de 100 nmols, mas sem peptídeo E7, não mostraram inibição significativa de crescimento do tumor, indicando que o efeito antitumoral foi específico ao antígeno. Também, os lipossomas de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (DOPG), um lipídio aniônico, administrados na dose de 150 nmols com antígeno não significativamente inibiram o crescimento do tumor.

30 7. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE TUMORES HPV-POSITIVOS DE TC-
1 EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM COMPOSIÇÕES DE R-

DOTAP/E7 E S-DOTAP EM DOSES VARIADAS DE R E S DOTAP.

Nas figuras 13 e 14, os camundongos foram subcutaneamente injetados com células TC-1 no dia 0 para induzir o crescimento de tumores HPV-positivos. Os camundongos receberam composições de R e S-DOTAP/E7 contendo 20 µg de peptídeo E7 subcutaneamente no lado oposto do abdômen no dia 6. Concentrações de lipídio de R ou S-DOTAP no complexo variaram de 3 a 600 nmols (3, 15, 30, 75, 100, 125, 150, 300, e 600 nmols). Ao contrário da mistura racêmica de DOTAP (figura 12), os complexos de S-DOTAP não apresentaram a habilidade para inibir crescimento do tumor e nenhuma regressão do tumor foi observada (figura 13). Um efeito da resposta de dose foi observado porém, e doses de S-DOTAP de 600 nmols induziram o crescimento de tumor mais lento ($P < 0,05$) comparado ao controle sem tratar no dia 23. Referindo à figura 14, o efeito antitumor dos complexos contendo R-DOTAP e antígeno é similar ao efeito observado na mistura racêmica (figura 12). Doses de 75-150 nmols de R-DOTAP mostraram efeito de inibição de tumor parcial ($P < 0,001$) comparado ao controle sem tratar no dia 23, enquanto R-DOTAP a 300 nmols exibiu a eficácia de regressão de tumor mais significativa ($P < 0,0001$). Novamente, camundongos dados com uma dose alta de R-DOTAP (600 nmols) não mostraram atividades antitumor significativas, confirmando que os lipossomas de R-DOTAP em uma dose alta poderiam ter induzido uma regulação negativa à resposta imune. Peptídeo E7 sozinho, não mostra qualquer inibição de crescimento de tumor (não mostrado). A figura 15 mostra as curvas de dose-resposta dos lipídios para a eficácia de regressão de tumor dos vários complexos de lipídio catiônico/antígeno E7 DOTAP, S-DOTAP, e R-DOTAP em 20 µg do antígeno e DOTAP a 10 µg do antígeno.

8. INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T POR COMPOSIÇÕES DE S-DOTAP E R-DOTAP

Foi previamente demonstrado que no Pedido provisório US Número 60/983.799, atribuído ao cessionário do presente pedido, que DOTAP/E7 interage diretamente com os linfócitos T humanos, conduzindo à expansão clonal e ativação das células T. Aqueles estudos examinaram a

habilidade de misturas racêmicas de DOTAP para estimular a expansão clonal das células T. Naqueles estudos, linfócitos humanos enriquecidos obtidos de um doador saudável de HLA-A2+ foram estimulados diretamente através do meio, DOTAP sozinho, peptídeo sozinho ou DOTAP/hE7. A estimulação foi repetida três vezes com um intervalo de 7 dias. Três dias após a terceira estimulação, os linfócitos tratados com DOTAP ou DOTAP/E7 mostraram expansão extensiva das colônias de células T na cultura em contraste com nenhuma expansão clonal no controle de meio. As células T expandidas também demonstraram atividade de CTL significativa.

Naqueles estudos, a ativação de células T mediada por DOTAP foi também confirmada por fosforilação de ERK nas células T. Expressão induzida por DOTAP da molécula coestimuladora, CD86 em linfócitos T humanos, foi também observada. Aqueles resultados sugeriram que DOTAP tem um impacto direto na ativação de células T por meio de uma proliferação de célula mediada por MAP cinase.

Nos estudos presentes, a indução da proliferação de células T humanas foi investigada pelos enantiômeros R e S de DOTAP e foi confirmada usando células T purificadas obtidas de Lonza, MA. R-DOTAP induziu mais proliferação de célula T que S-DOTAP e foi similar em atividade à mistura racêmica de DOTAP.

DEBATE

Como descrito na patente U. S. Número 7.303.881, uma classe vasta de lipídios catiônicos pode atuar como imunoestimuladores potentes junto com um antígeno para gerar respostas imunes antígeno-específicas no tratamento de doença. Por exemplo, patente U. S. Número 7.303.881 descreve que lipossomas compreendidos de lipídios catiônicos ativam células dendríticas como demonstrado pela estimulação por lipídios catiônicos da expressão das moléculas coestimuladoras CD80/CD86 em células dendríticas DC2.4 (figuras 14A e 14B). Como mostrado na figura 14A da patente U. S. Número 7.303.881, a habilidade para estimular a expressão de CD80/CD86 em células DC2.4 através de lipossomas catiônicos diferentes varia grandemente. Lipofectamina.RTM., uma formulação 3:1 (p/p) de lipos-

soma do lipídio poliacetônico trifluoroacetato de 2,3-dioleilóxi-N-[2(esperminacboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamínio (DOSPA) e o lipídio neutro dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), e lipossomas preparados de aspartato de O,O'-dimiristil-N-lisila (DMKE) e O,O'-dimiristil-N-lisilglutamato (DMKD), fortemente estimulou a expressão de CD80/CD86 através de células CD2.4.

Como também descrito na patente U. S. Número 7.303.881, a habilidade de lipídios catiônicos diferentes para estimular a expressão de CD80 nas células DC2.4 varia. Tanto cabeça hidrófila quanto cauda lipofílica dos lipídios tem efeito significativo nesta habilidade. Por exemplo, os lipídios de DXEPC com os grupos de cabeça etil fosfocolina (EPC) parecem, em geral, ser mais potentes que os lipídios DXTAP com o grupo de cabeça trimetilamônio propano (TAP). Dentro dos lipídios que carregam uma estrutura de grupo de cabeça particular, os lipídios com cadeias acila mais curtas (1,2-dilauroil-sn-glicero-3-etylfosfocolina (DLEPC-12:0), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-etylfosfocolina (DMEPC-14:0)) ou insaturadas (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etylfosfocolina (DOEPC-18:1)) parecem ser mais potentes que aqueles com cadeias de acila mais longas (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etylfosfocolina (DPEPC-16:0)) ou saturadas (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etylfosfocolina (DSEPC-16:0)). Estes dados porém, demonstraram que lipídios catiônicos múltiplos foram capazes de estimular a ativação de células dendríticas. Estudos relatados no Pedido de Patente U. S. Número 12/049.957 destacam o mecanismo pelo qual os lipídios catiônicos atuam como imunoestimuladores.

Dados dos estudos acima mencionados conduziram à observação que os lipídios catiônicos não só são veículos de visamento e liberação eficientes para抗ígenos às APC do sistema imune, mas também funcionam como adjuvantes potentes sob faixas de composição de dose baixas para influenciar a função do sistema imune diretamente através da ativação das vias de sinalização dependentes da MAP cinase com produção resultante das moléculas reguladoras do sistema imune incluindo citocinas e quimiocinas. Um efeito de dose-resposta claro do lipídio catiônico nas capacidades imunoestimulantes das formulações foi demonstrado. Foi demonstrado que

ao receber o complexo de lipídio/antígeno, as partículas foram principalmente absorvidas pelas células dendríticas, as células de apresentação de antígeno profissionais principais. A iniciação de ativação das células dendríticas e migração para o linfonodo de drenagem facilitam as respostas imunes contra tumores de TC-1 antígeno-específicos como demonstrado. Linfócitos T CD8+ funcionais foram gerados em camundongos ao receber uma injeção de DOTAP/E7 e os tamanhos do tumor diminuíram e exibiram apoptose intensificada, devido ao número crescente de células T infiltrantes no microambiente do tumor. A curva de dose-resposta do lipídio catiônico campaniforme resultante (atividade diminui acima e abaixo da ótima dose) demonstrou atividade em doses muito baixas, indicando que a atividade dos lipídios catiônicos como adjuvantes ou imunoestimuladores é tão potente que o EC₅₀ é tão baixo quanto cerca de 15 nmols por injeção. Doses altas de lipídios catiônicos eliminam a atividade imunoestimulante. Foi também demonstrado que quando um antígeno tal como, por exemplo, ovalbumina, for incorporado nos lipossomos catiônicos e administrado em uma injeção subcutânea simples, anticorpos efetivos contra o antígeno são produzidos. Lipossomos catiônicos podem também induzir expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD83 e ativar células dendríticas humanas. Está claro que em composições de dose ótima, os lipídios catiônicos e complexos de lipídio catiônico/antígeno além da liberação efetiva às células dendríticas são ativadores potentes do sistema imune e fornecem imunoterapias simples, seguras, e muito eficientes úteis em impedir e tratar doenças.

Com base em uma compreensão do mecanismo de imunoestimulação, outros estudos foram executados para avaliar o efeito da quiralidade em lipídios catiônicos e a capacidade imunoestimulante dos lipídios catiônicos. Para este efeito, enantiômeros R e S sintetizados puros de DOTAP foram utilizados e comparados com a mistura racêmica comumente utilizada. Enantiômeros R e S de DOTAP foram demonstrados possuir habilidade similar ao DOTAP racêmico com relação à ativação e maturação das células dendríticas. Todos os três lipídios induziram células dendríticas para expressar as moléculas coestimuladoras CD 80, CD 83 e CD 86.

Uma característica importante de um imunoestimulador capaz de induzir respostas imunes celulares para doença é sua habilidade para induzir a produção de quimiocinas e citocinas críticas. Como relatado no Exemplo, diferenças significativas foram observadas entre os enantiômeros R e S de 5 DOTAP em sua habilidade para induzir produção de quimiocina e citocina. R-DOTAP foi observado ser um ativador imune mais potente que S-DOTAP. Em todos os casos, a potência de R-DOTAP foi equivalente ou mais alta que a da mistura racêmica de DOATP.

Para determinar se a potência *in vitro* na indução de citocina 10 trazeria a eficácia terapêutica *in vivo*, três formulações, R-DOTAP/E7, S-DOTAP/E7 e DOTAP/E7 (mistura racêmica) foram avaliadas para sua habilidade para erradicar tumores positivos em HPV-E7 em camundongos portando tumor. Cada formulação foi avaliada em múltiplas doses de lipídio. Como demonstrado nas figuras 12-15, ambas as formulações contendo R-DOTAP 15 e DOTAP apresentaram uma resposta de lipídio campaniforme-dose com atividade específica de E7 forte levando à regressão do tumor dentro de faixas específicas de dose ótima. Formulações contendo S-DOTAP não induziram regressão do tumor sob qualquer condição observada, embora as formulações de lipídio alto reduziram o crescimento do tumor.

É portanto evidente que o enantiômero R de DOTAP é responsável 20 pela maior parte do efeito adjuvante observado de DOTAP. Porém, ambos os enantiômeros são ativadores potentes de células dendríticas que conduzem à maturação.

Os estudos relatados acima identificam composições específicas 25 e aplicações de lipídios catiônicos exclusivas que consistem em lipídio quiral ou misturas de lipídios quirais, que podem ser exploradas para desenvolver imunoterapias simples, de custo eficaz, e muito necessárias para várias doenças debilitantes.

Como várias alterações poderiam ser feitas nos aspectos acima 30 descritos e nas modalidades exemplares sem abandono do escopo da invenção, é intencionado que todo o assunto contido na descrição acima seja interpretado como ilustrativo e não em um sentido limitativo. Para esse fim,

embora os exemplos primariamente debatam enantiômeros do lipídio catiônico DOTAP, aqueles versados na técnica reconhecerão que estes lipídios catiônicos são meramente exemplares e que os métodos e mecanismos são aplicáveis a outros lipídios catiônicos.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um lipídio catiônico quiral consistindo de R-DOTAP, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para melhorar um efeito imunoestimulador induzido por DOTAP em um sistema imunológico de um mamífero.
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o efeito imunoestimulador inclui a produção de moléculas reguladoras do sistema imunológico.
3. Uso de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as moléculas reguladoras do sistema imunológico incluem pelo menos uma citocina ou quimiocina.
4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma citocina ou quimiocina é selecionada de CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-19, IL-2, IL-8, IL-12, ou combinações das mesmas.

R-DOTAP

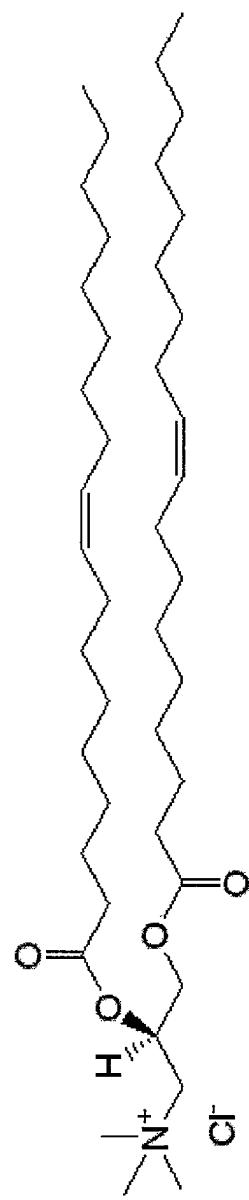


Fig. 1A

S-DOTAP

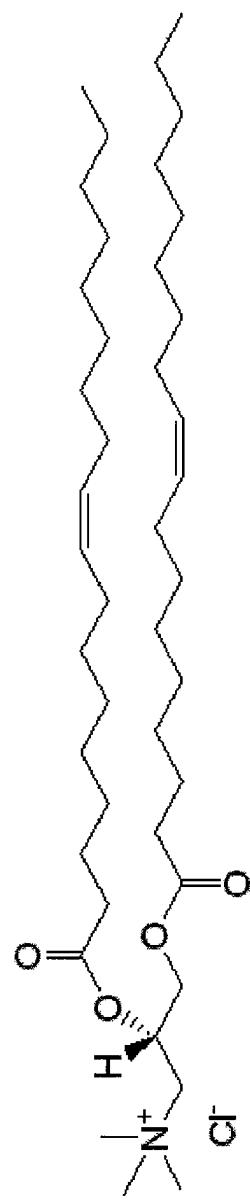


Fig. 1B

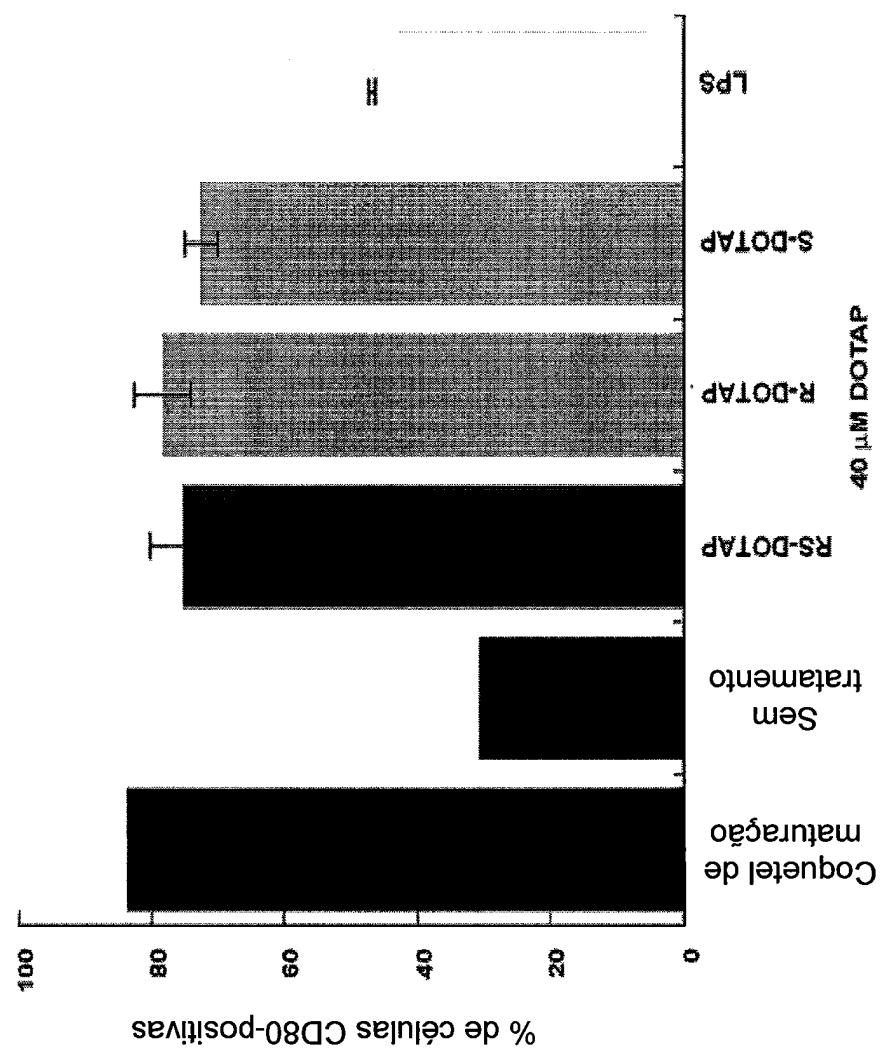
Fig. 2

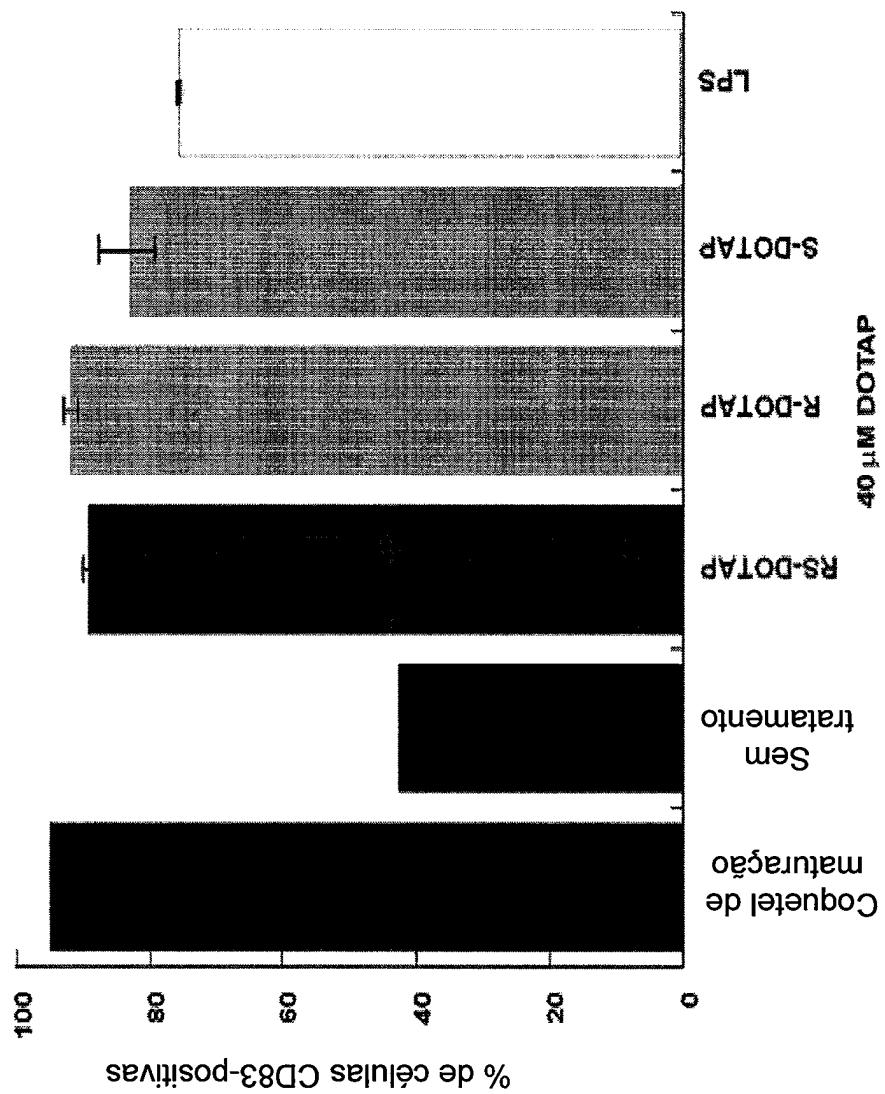
Fig. 3

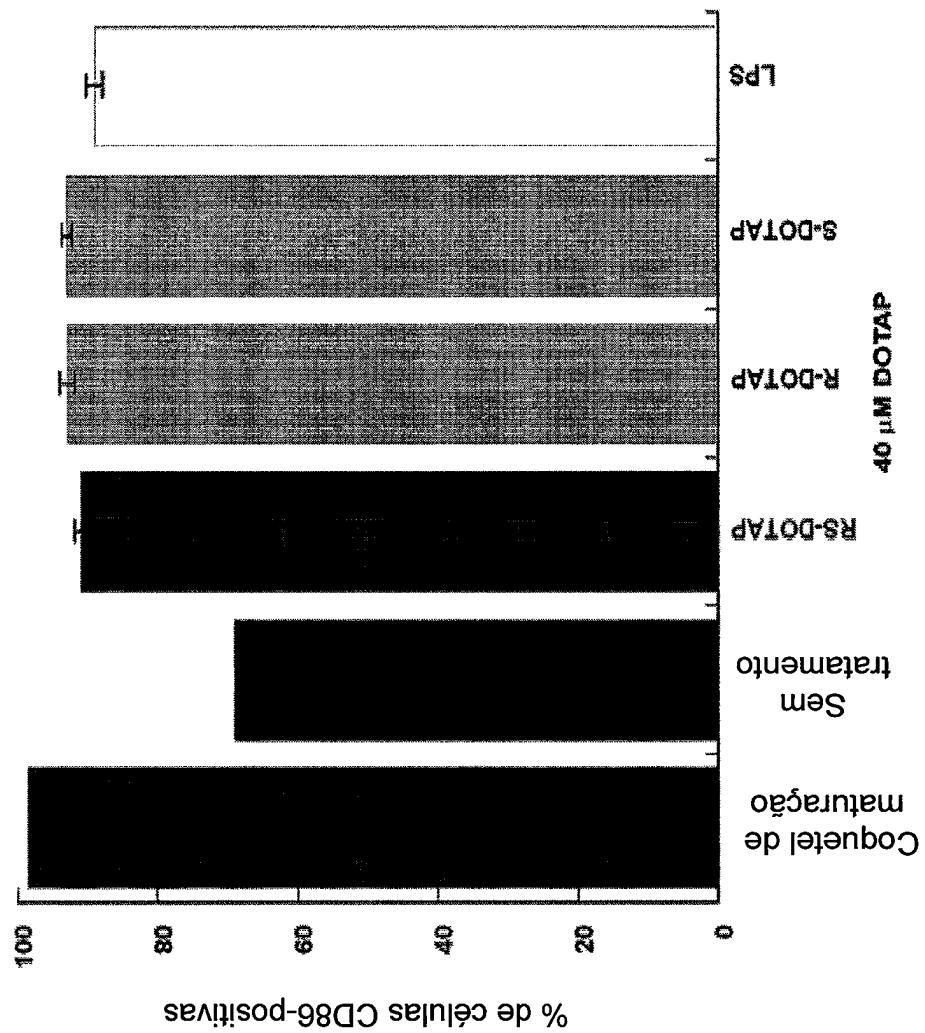
Fig. 4

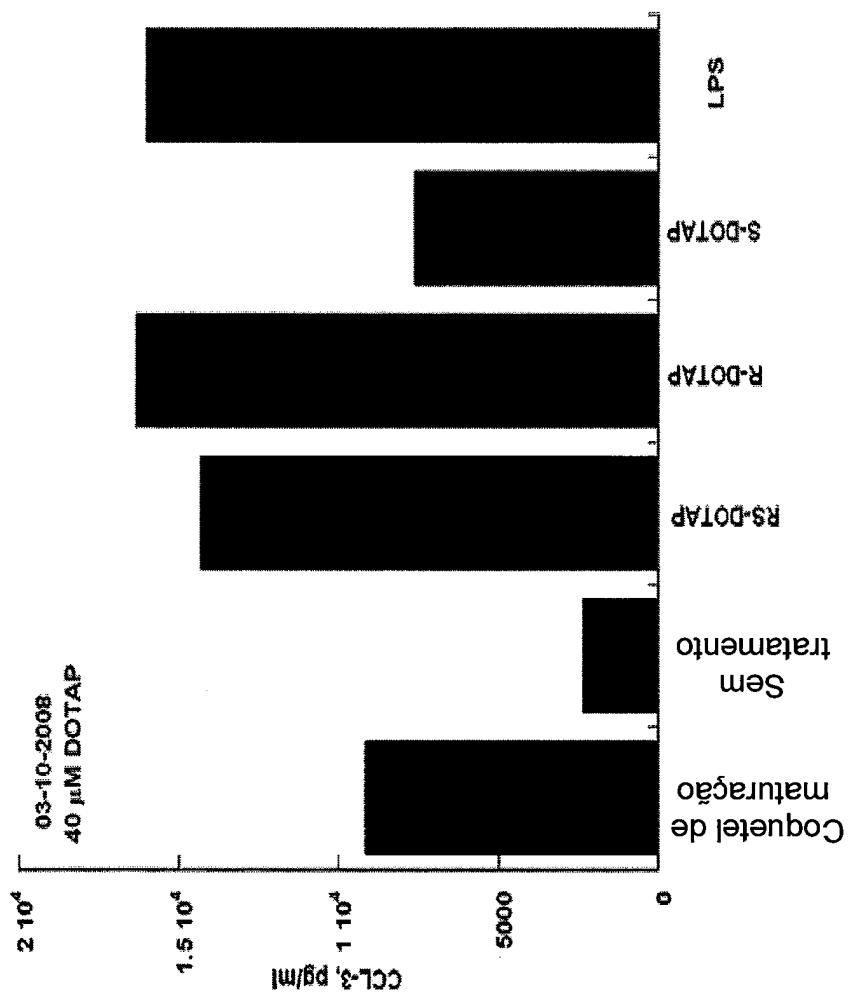
Fig. 5

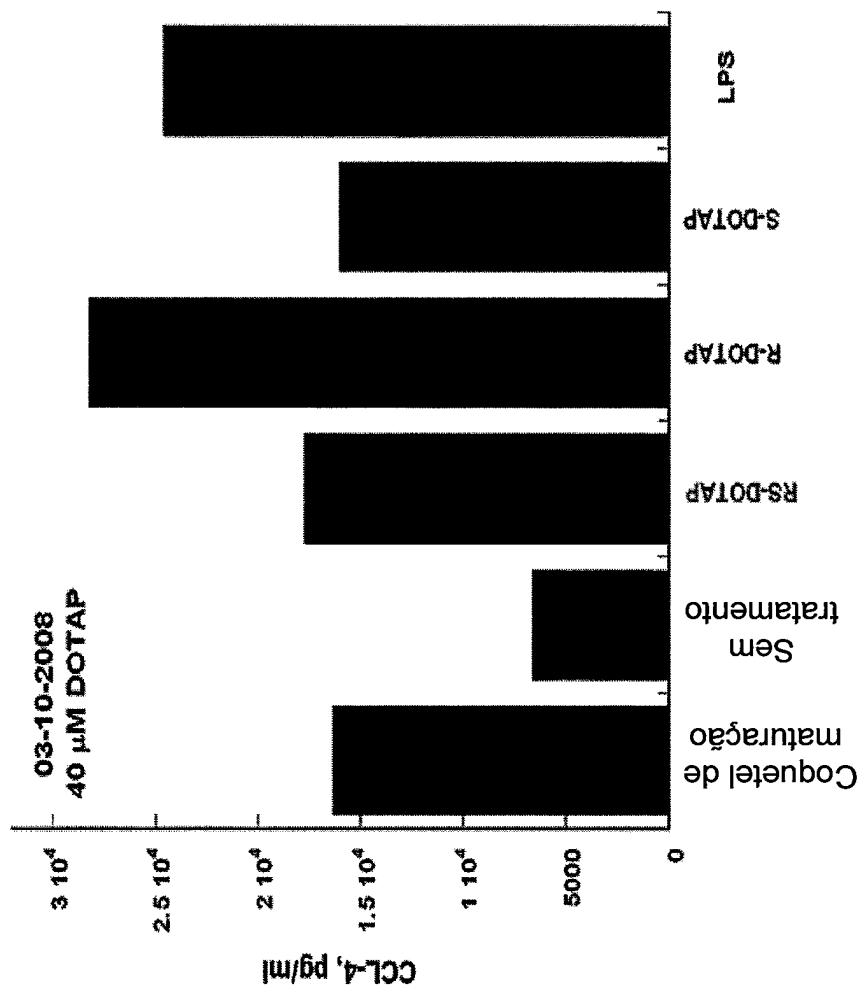
Fig. 6

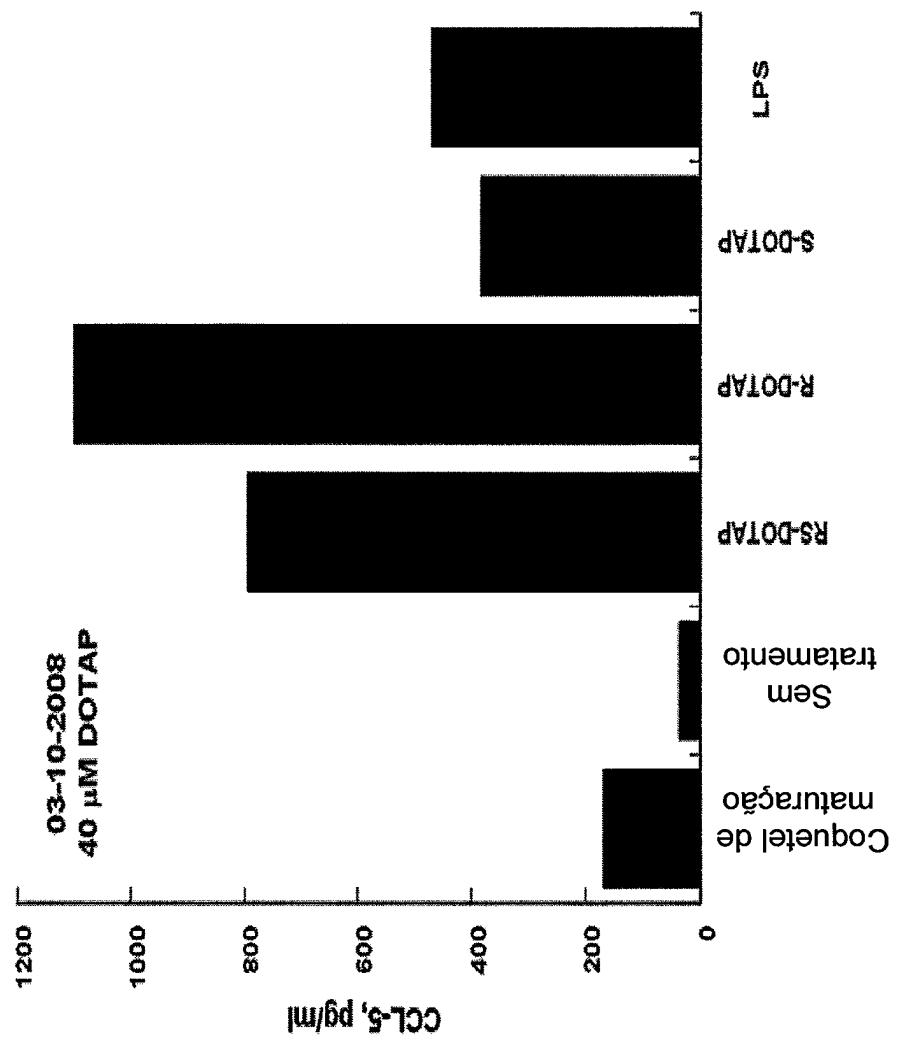
Fig. 7

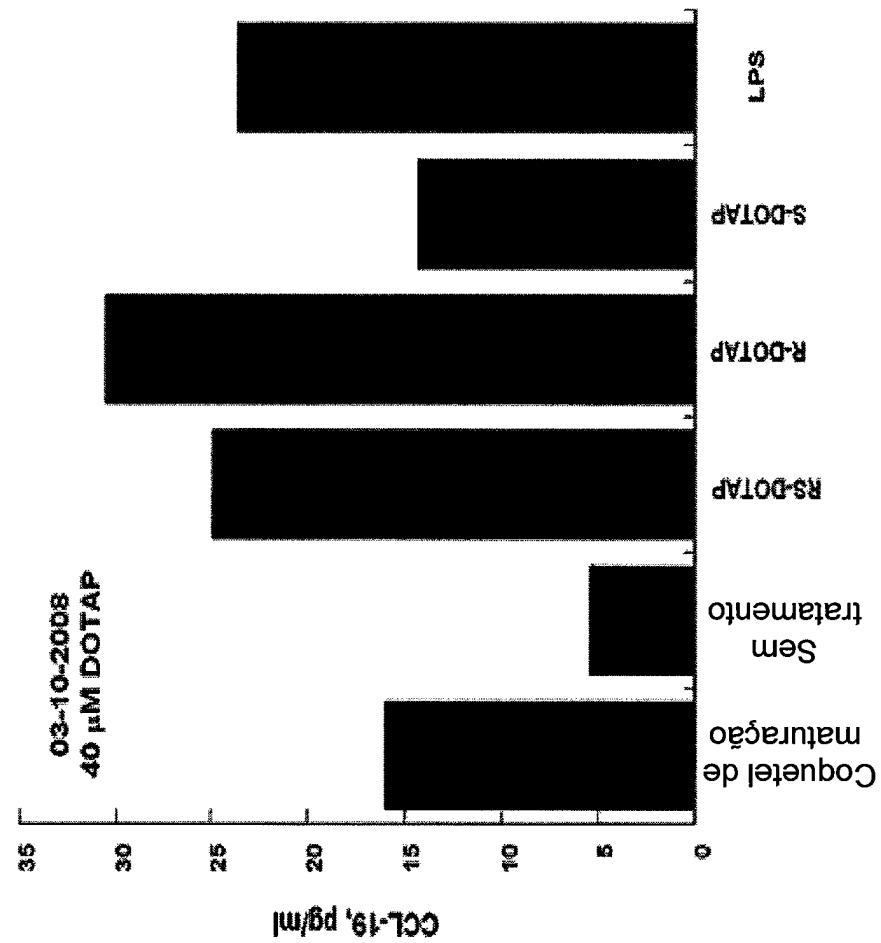
Fig. 8

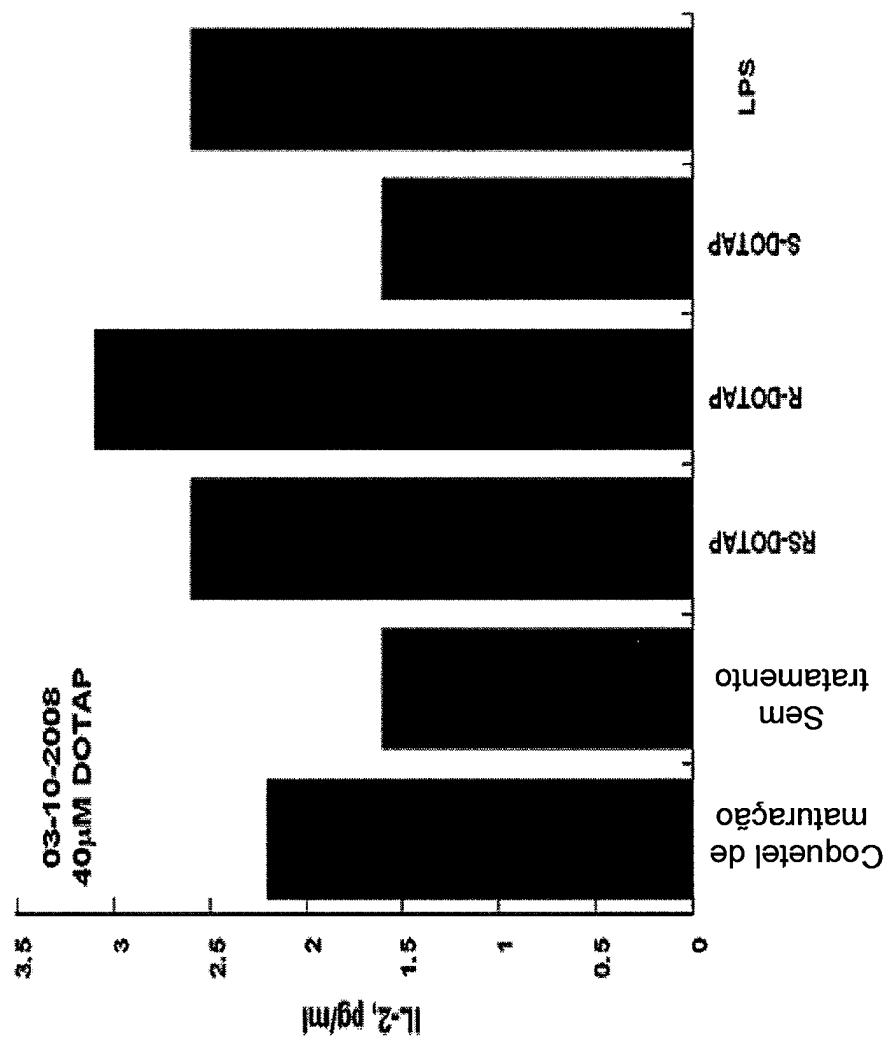
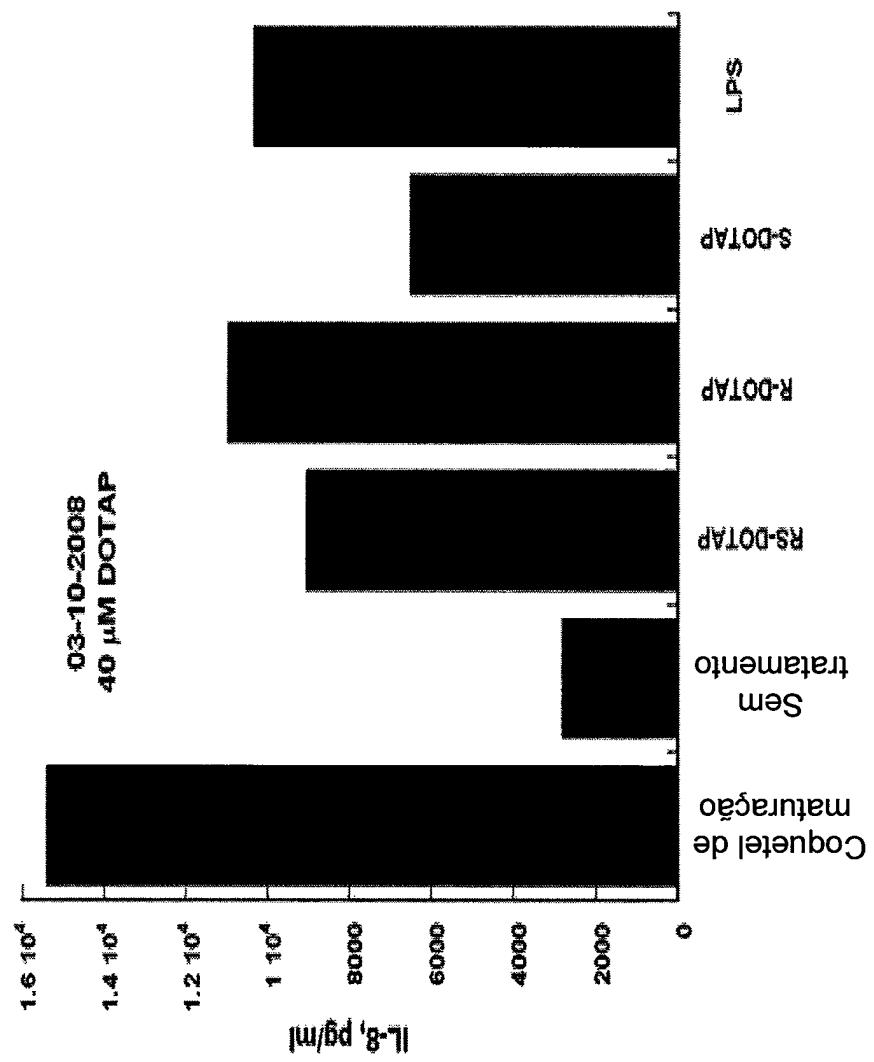
Fig. 9

Fig. 10

11/15

Fig. 11

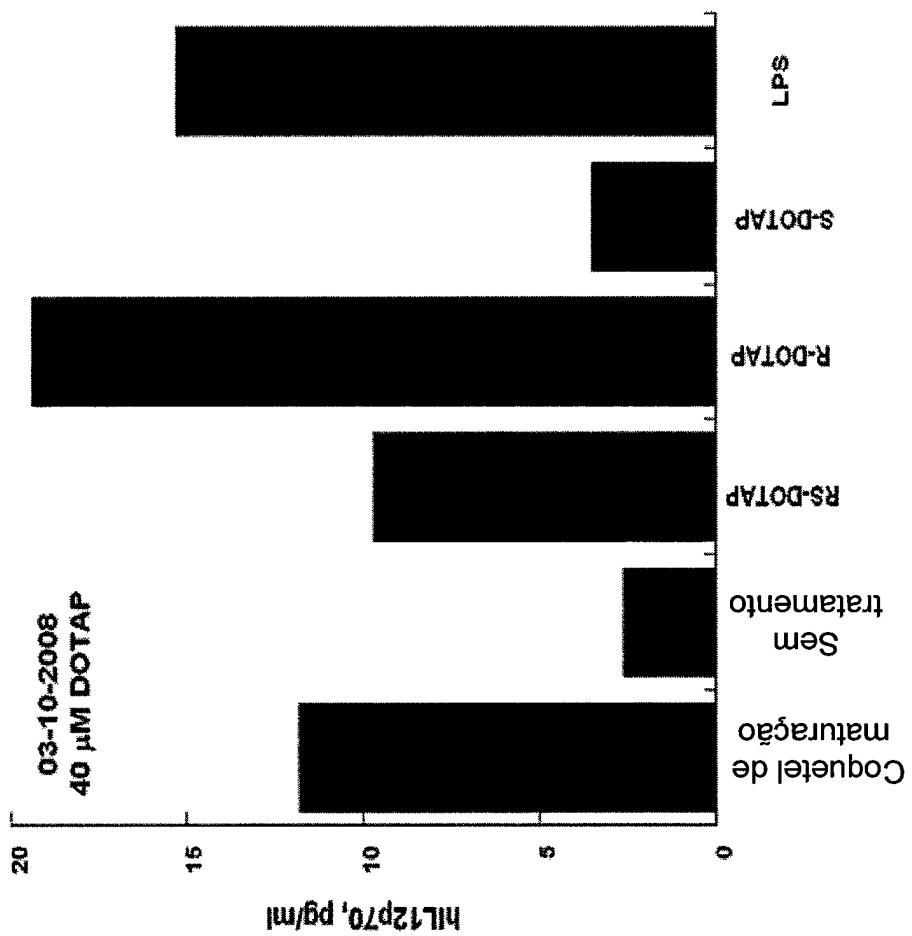


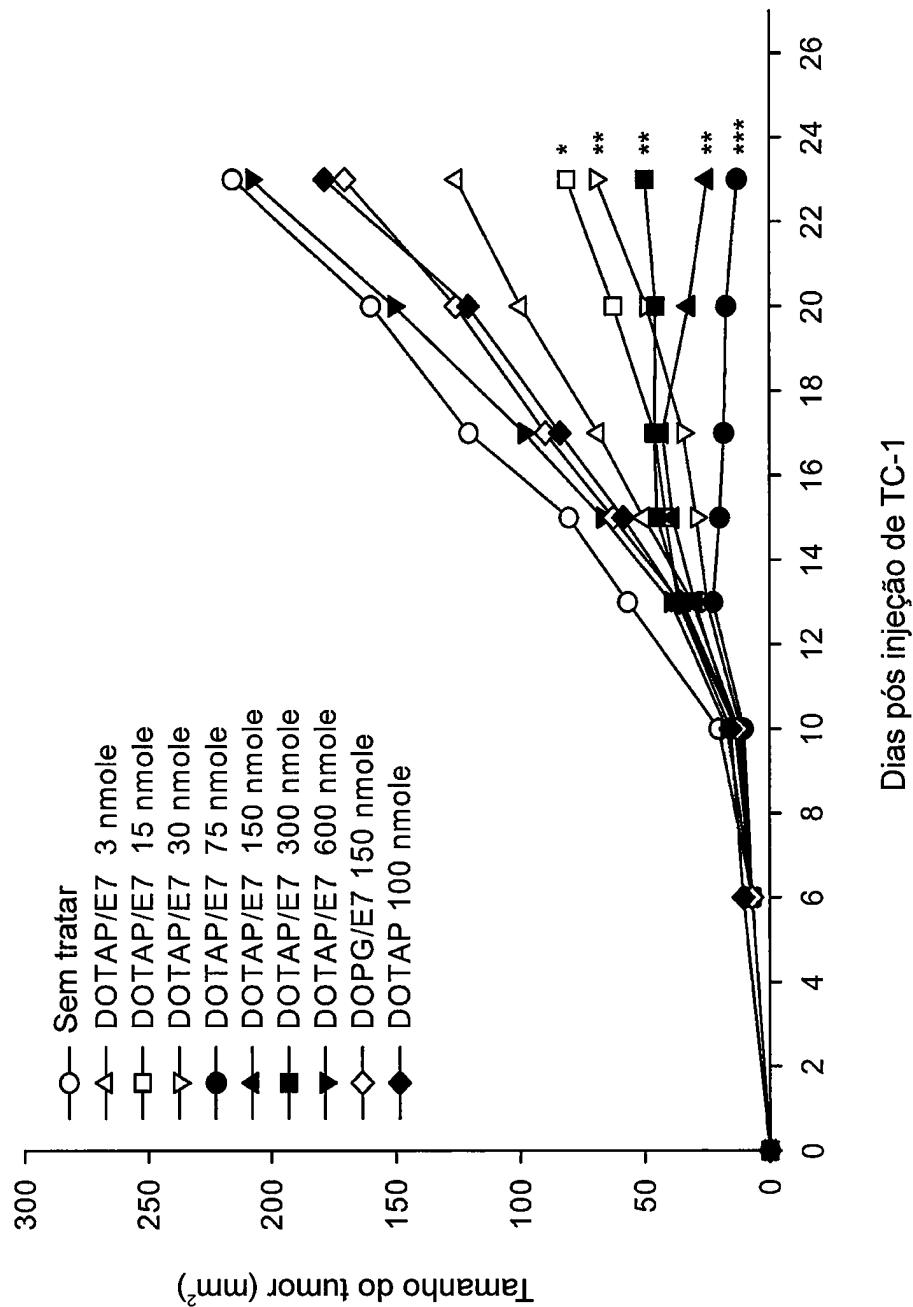
Fig. 12

Fig. 13

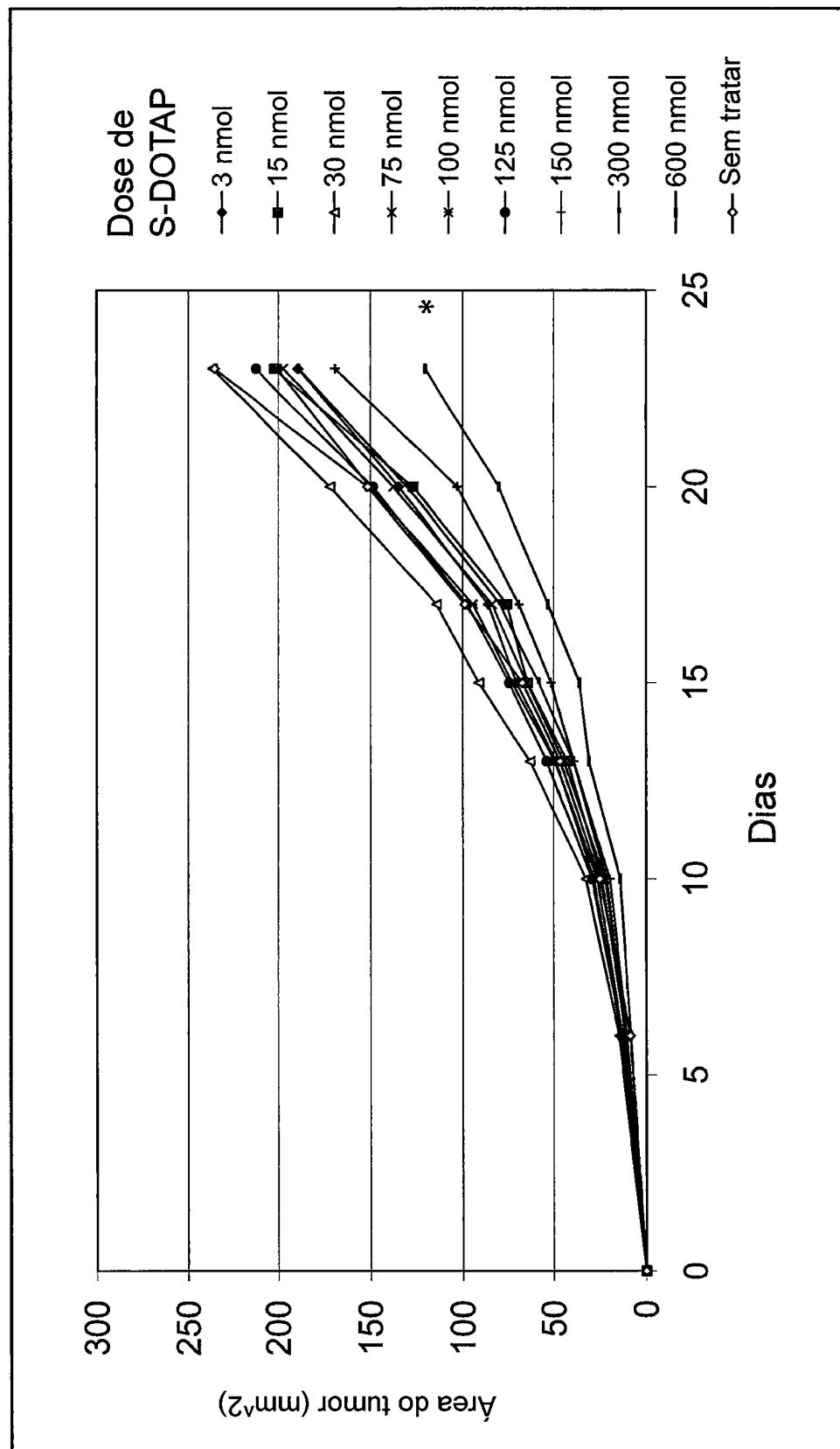


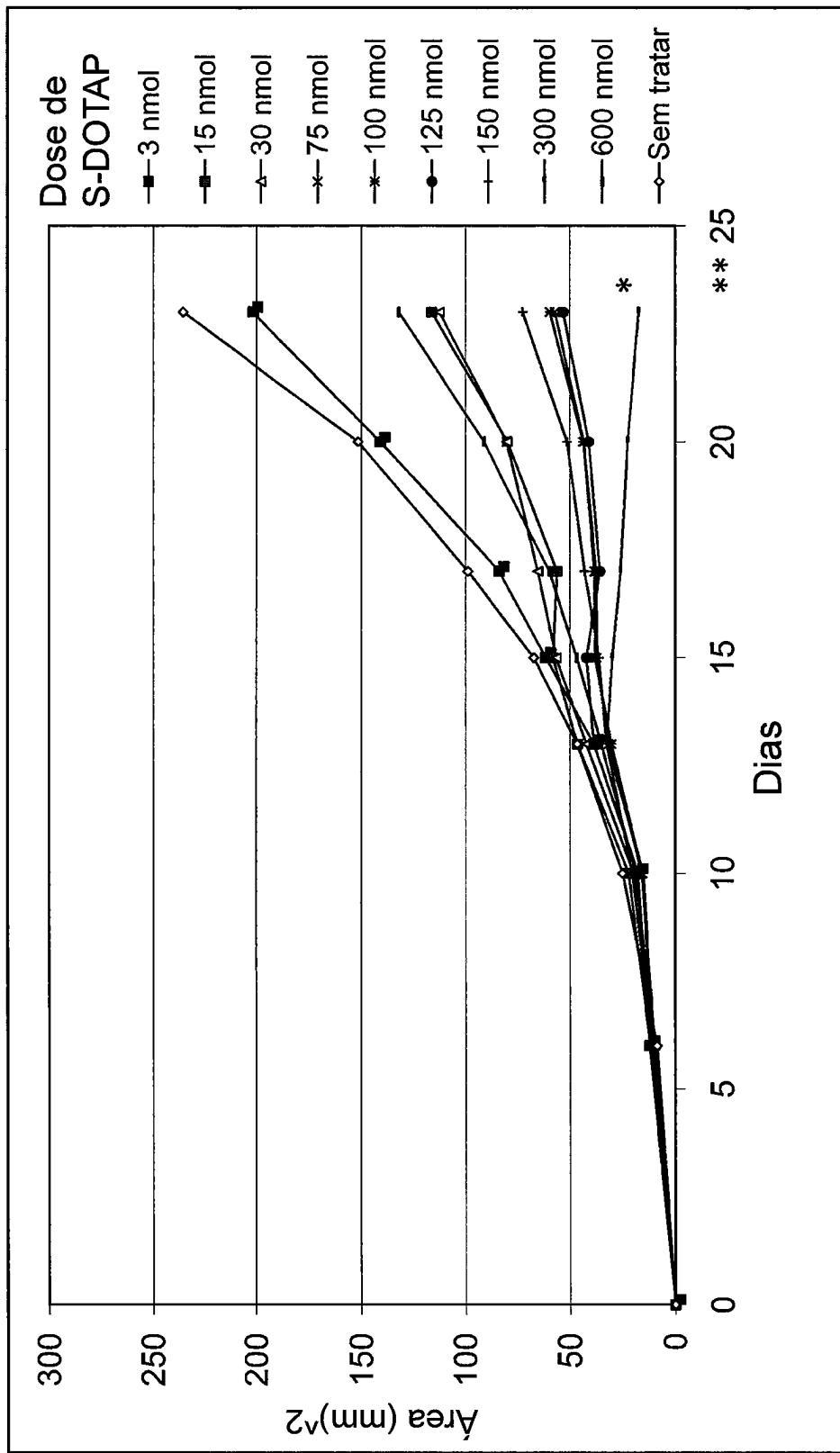
Fig. 14

Fig. 15