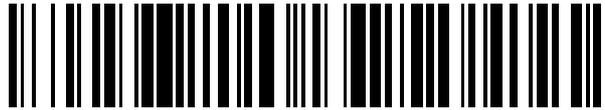


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 714**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/385** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2008 E 08799629 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2125011**

54 Título: **Estimulación de una respuesta inmunitaria por lípidos catiónicos**

30 Prioridad:

**22.03.2007 US 896412 P**  
**13.04.2007 US 911549 P**  
**09.07.2007 US 948512 P**  
**30.10.2007 US 983799 P**  
**17.03.2008 US 49957**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.03.2016**

73 Titular/es:

**PDS BIOTECHNOLOGY CORPORATION (100.0%)**  
**675 US Highway One**  
**North Brunswick, NJ 08902, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, WEIHSU;**  
**YAN, WEILI;**  
**HUANG, LEAF;**  
**CONN, GREGORY;**  
**BEDU-ADDO, FRANK y**  
**TONEY, KENYA**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 562 714 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Estimulación de una respuesta inmunitaria por lípidos catiónicos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere en general a la estimulación de una respuesta inmunitaria, y más particularmente al papel de los lípidos en las respuestas inmunes.

10 **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0002] La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Estados Unidos N° 12/049.957, presentada el 17 de marzo de 2008, por Weishu Chen, Weili Yan, Kenia Toney, Gregory Conn, Frank Bedu-Addo, y Leaf Huang y titulada "Estimulación de una respuesta inmunitaria por lípidos catiónicos", que reivindica el beneficio de cada una de la solicitudes provisionales de Estados Unidos N° 60/896.412, presentadas el 22 de marzo de 2007, por Leaf Huang, y titulada "Estimulantes inmunitarios basados en lípidos catiónicos para el tratamiento de la enfermedad"; 60/911.549, presentada el 13 de abril de 2007, por Leaf Hoja Huang y Weishu Chen, y titulada "Sistema de liberación de función dual basado en lípidos catiónicos y estimulantes inmunitarios para el tratamiento de la enfermedad"; 60/948.512, presentada el 9 de julio de 2007, por Leaf Huang, Weishu Chen y Weili Yan, y titulada "Sistema de liberación de función dual basado en lípidos catiónicos y estimulantes inmunitarios para el tratamiento de la enfermedad "; y 60/983.799, presentada el 30 de octubre de 2007, por Weishu Chen y Leaf Huang, y titulada "Inducción de respuesta inmunitaria por una Formulación de péptido liposomal".

25 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0003] En este apartado se pretende introducir al lector en diversos aspectos de la técnica que pueden estar relacionados con diversos aspectos de la presente invención, que se describen y/o reivindican a continuación. Esta discusión se cree que es útil para proporcionar al lector información de antecedentes para facilitar una mejor comprensión de los diversos aspectos de la presente invención. En consecuencia, debe entenderse que estas afirmaciones deben ser leídas en este sentido, y no como admisiones de la técnica anterior.

[0004] El desarrollo de inmunoterapias seguras y eficaces para el uso humano sigue siendo una necesidad médica urgente para los pacientes en todo el mundo. Con el fin de provocar respuestas inmunitarias apropiadas, se pueden utilizar modificadores inmunológicos ("inmunomodificadores") que mejoran, dirigen o inducen una respuesta inmunitaria en el diseño de vacunas o inmunoterapia [Gregoriadis, G., Immunological adjuvants: a role for liposomes. Immunol. Today 11:89 (1990)]. Por ejemplo, las vacunas pueden incluir antígenos para estimular una respuesta inmunitaria. Sin embargo, algunas vacunas potenciales que incluyen antígenos son estimuladores débiles de una respuesta inmunitaria debido a que las vacunas no liberan de manera eficiente el antígeno a las células presentadoras de antígeno ("APC") del sistema inmunitario y/o el antígeno es débilmente inmunogénico. Por lo tanto, se necesitan inmunoterapias que liberan eficazmente antígenos a APC, y también estimulan el sistema inmunitario para responder al antígeno. Los inmunomodificadores tienen el potencial de funcionar en dicha inmunoterapia. Tales inmunoterapias pueden tener estos y otros beneficios. Por ejemplo, cuando se incluyen como parte de una vacuna terapéutica, un inmunomodificador debe al menos (1) mejorar la liberación y/o el procesamiento de antígenos en las APC [Wang, R.F., y Wang, H.Y. Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. Nat Biotechnol 20: 149 (2002)], (2) inducir la producción de citocinas inmunomoduladoras que favorecen el desarrollo de la respuesta inmunitaria al antígeno de vacuna, promoviendo así la inmunidad mediada por células, incluyendo linfocitos T citotóxicos ("CTL"), (3) reducir el número de inmunizaciones o la cantidad de antígeno requerida de una vacuna eficaz [Vogel, F.R. Improving vaccine performance with adjuvants. Clin Infect Dis 30 Suppl 3: S266 (2000)], (4) aumentar la vida media biológica o inmunológica del antígeno de la vacuna, y (5) superar la tolerancia inmune al antígeno mediante la inhibición de factores inmunosupresores [Baecher-Allan, C y Anderson, D.E. Immune regulation in tumor-bearing hosts. Curr Opin Immunol 18: 214 (2006)].

[0005] Actualmente, la clase principal de agentes utilizados para mejorar la eficacia de los antígenos, tales como antígenos péptidos o proteínicos, en provocar una respuesta inmunitaria son adyuvantes, tales como emulsiones de agua en aceite, alumbre y otros productos químicos que potencian las respuestas de antígeno; sin embargo, estos adyuvantes no son inmunomodificadores, como se describió anteriormente, porque no tienen efectos inmunomoduladores directos por sí mismos [Vogel, F.R., y Powell, M.F. A compendium of vaccine adjuvants and excipients, Pharm Biotechnol 6: 141 (1995)]. Varios de estos adyuvantes están disponibles para su uso en animales y algunos de ellos han sido probados en ensayos clínicos. Además de adyuvantes tradicionales, tales como las sales de aluminio, productos tales como virosomas de la gripe [Gluck, R., y Walti, E. 2000. Biophysical validation of Epaxal Berna, a hepatitis A Vaccine adjuvanted with immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIV). Dev Biol (Basilea) 103: 189 (2000)] y de MF59 de Chiron [Kahn, J.O., et al. Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1SF2 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 tienen efectos inmunes intrínsecos, se está comercializando. Por ejemplo, MF59, que es un adyuvante basado en emulsión submicrométrica, es internalizado por las células dendríticas [Dupuis, M., et al.,

Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. Cell Immunol 186: 18 (1998)]. Sin embargo, de acuerdo con informes de los ensayos clínicos sobre el VHS y vacunas contra la gripe [Jones, C.A., y 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)], las pruebas de modelos de animales sugieren que el adyuvante MF59 mejora la producción de anticuerpos neutralizantes en lugar de mejorar las respuestas de células T. Por lo tanto se necesitan nuevos procedimientos para estimular respuestas inmunitarias mediadas por células.

[0006] Además, como se mencionó anteriormente, algunos antígenos son estimuladores débiles de una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, además de coadministrar el antígeno con sustancias que estimulan la respuesta inmunitaria, como se describió anteriormente, un antígeno débilmente inmunogénico puede ser modificado para aumentar su inmunogenicidad. Por ejemplo, un antígeno débilmente inmunogénico puede ser acoplado a péptidos, polisacáridos o lípidos inmunogénicos para aumentar su inmunogenicidad. Sin embargo, simplemente acoplando antígenos débilmente inmunogénicos a estos tipos de compuestos puede no ser suficiente para provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria resultante puede ser dirigida a epítomos inmunogénicos en el compuesto acoplado y no el antígeno débil, o el antígeno acoplado no puede ser liberado de manera eficiente a APC del sistema inmunitario. Por lo tanto, se necesitan procedimientos adicionales para estimular las respuestas inmunitarias a antígenos que son débilmente inmunogénicos.

#### DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0007] Ciertos aspectos de ejemplo de la invención se exponen a continuación. Debe entenderse que estos aspectos son presentados meramente para proporcionar al lector un breve resumen de algunas formas que podría adoptar la invención y que estos aspectos no pretenden limitar el alcance de la invención. De hecho, la invención puede abarcar una variedad de aspectos que no se pueden establecer de forma explícita a continuación.

[0008] La presente invención está dirigida a la utilización de lípidos catiónicos, que bajo ciertas condiciones de dosis y composición, actúan como una nueva clase de inmunoestimulantes, para (1) presentar o liberar de manera eficaz un antígeno al sistema inmunitario y (2) estimular el sistema inmunitario para responder al antígeno.

[0009] Los liposomas se han utilizado ampliamente para la liberación de fármacos de pequeño peso molecular, ADN de plásmido, oligonucleótidos, proteínas, y péptidos. Las vacunas que utilizan vehículos de liposomas como portadores de antígenos no virales son preferibles en comparación con las inmunizaciones tradicionales que utilizan vacunas vivas atenuadas o vectores virales, tales como vaccinia o virus de la gripe. La patente de Estados Unidos No. 7.303.881, describe una sencilla pero eficaz inmunoterapia a base de lípidos, un complejo lípido catiónico/antígeno, que consta de dos moléculas, el lípido catiónico y un antígeno, y al que componentes adicionales tales como estabilizantes, adyuvantes y modificadores de superficie pueden añadirse [Véase la Patente de Estados Unidos N° 7.303.881]. La formulación, que consiste en un lípido catiónico, y un antígeno [por ejemplo, E7, un virus del papiloma humano ("VPH")], induce tanto respuestas inmunes antitumorales preventivas como terapéuticas contra tumor TC-1 positivo de VPH en un modelo de ratón. Los resultados demuestran que el liposoma catiónico complejado con un antígeno sirve para estimular las respuestas inmunes e iniciar la interacción de células dendríticas (una APC) con células T.

[0010] En la presente invención, los estudios adicionales realizados para comprender aún más la capacidad del complejo lípido catiónico/antígeno para inducir una respuesta inmunitaria potente, han llevado al descubrimiento de que los lípidos catiónicos por sí mismos pueden actuar como activadores inmunes potentes en condiciones de dosis bajas mediante la activación de componentes de la proteína activada por mitógenos ("MAP"), vía de señalización de la quinasa, que existe en todas las especies de mamíferos. En combinación con un antígeno, el complejo lípido catiónico/antígeno, en condiciones de dosis bajas, induce fuertes respuestas inmunes específicas al antígeno formulado en el complejo. A dosis superiores de lípidos catiónicos, se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) en exceso en las células inmunes y disminuye la respuesta inmunitaria observada.

[0011] Por lo tanto, un aspecto de la invención proporciona una composición de al menos un lípido catiónico en una dosis suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto mediante la activación de la señalización de la MAP quinasa por las células del sistema inmunitario de un sujeto.

[0012] Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto mediante la activación de la vía de señalización de MAP quinasa mediante la administración de un lípido catiónico al sujeto.

[0013] Otro aspecto de la invención proporciona una composición de al menos un lípido catiónico en una dosis suficiente para inducir una respuesta inmunitaria mediante la inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno ("ROS") en las células del sistema inmunitario del sujeto. El complejo de lípido catiónico estimula la producción de ROS a niveles suficientes para aumentar la respuesta inmunitaria por encima de la respuesta inmunitaria presente en ausencia de dicho al menos un lípido catiónico.

[0014] Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para inducir la respuesta inmunitaria mediante la administración a un sujeto de un complejo de lípido catiónico para inducir la producción de especies reactivas de oxígeno ("ROS") en las células del sistema inmunitario del sujeto. El complejo de lípido catiónico estimula la producción de ROS hasta niveles suficientes para aumentar la respuesta inmunitaria por encima de la respuesta inmunitaria presente en ausencia de dicho al menos un lípido catiónico.

[0015] Los aspectos adicionales de la invención implican la adición de al menos un antígeno para formar un complejo lípido catiónico/antígeno en cuyo caso la respuesta inmunitaria es específica de antígeno.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016] Varias características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor cuando la siguiente descripción detallada se lea con referencia a las figuras que se acompañan en las que caracteres representan partes similares en todas las figuras, en donde:

La **figura 1** es un gráfico que representa la producción de citocinas in vitro después de la estimulación de células dendríticas con 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano ("DOTAP").

**Figura 2** Análisis de la citotoxicidad mediada por CTL por citometría de flujo. Se prepararon y se expandieron clones de linfocitos T citotóxicos ("CTL") específicos de E7. Después de cinco días de reestimulación in vitro con el péptido E7, las células efectoras se incubaron con células diana TC-1 marcadas con PKH-67 en la proporción indicada de efector:diana durante 4 horas a 37°C. Se utilizó BL-6 como un control no específico de células diana. El porcentaje de muerte específica de E7 se determinó mediante el porcentaje de células positivas PI en el canal de células diana positivas PKH-67 en citometría de flujo. El análisis estadístico se calculó comparando con el grupo control en la relación E:T 100:1 (\* p <0,01, \*\* p <0,001, n = 5).

**Figura 3.** Se observaron linfocitos T infiltrantes en tumor en ratones que recibieron DOTAP/E7 a la dosis óptima de los lípidos. Los tumores TC-1 se establecieron como se ha descrito y se dejaron sin tratar o se trataron con una única inyección en el día 6. Los tumores sólidos fueron diseccionados en el día 14 y se examinaron para la infiltración de linfocitos. Anticuerpos anti-CD8 (A, B, C) y anti-CD4 (D, E, F) conjugados con FITC se utilizaron para determinar la infiltración de células T tumor seguido de contratinción con DAPI. Se examinaron las secciones del tumor representativas de grupos de 3 ratones como se ha descrito y se fotografiaron con el microscopio confocal. El ensayo TUNEL se llevó a cabo para detectar la apoptosis en las secciones de tumor (G, H, I).

La **figura 4** es un gráfico que representa inducción de la actividad humoral mediante tratamiento con el tratamiento lípido catiónico.

La **figura 5** es un gráfico que ilustra la reducción en la población de células T reguladoras en ratones después de recibir DOTAP con péptido E7 usando citometría de flujo.

**Figura 6** Cinética de crecimiento de tumor TC-1 en ratones tratados con formulaciones DOTAP/E7. El día 6 después de la inoculación con TC-1, los ratones recibieron tratamiento de 10 µg de péptido E7 formula en liposomas DOTAP a varias concentraciones de lípidos. El tamaño del tumor de TC-1 de cada grupo en día 23 se comparó con el grupo control no tratado y se analizó estadísticamente (\* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001).

**Figura 7** La inyección subcutánea de DOTAP induce la activación de células dendríticas y la migración a los ganglios linfáticos de drenaje. Se inyectaron ratones sin tratar (n = 4-6) con el control PBS (A, C y E) o DOTAP/E7 que contiene 100 nmoles de lípidos totales con 0,5% NBD-DOTAP (B, D y F). A las 4 h después de la inyección, las células de los ganglios linfáticos de drenaje se prepararon y se tiñeron con anticuerpos apropiados para marcadores de superficie. La coexpresión de NBD y CD11c (A y B) o CD86 (C y D) se analizaron dentro de las células totales de los ganglios linfáticos, mientras que la coexpresión de NBD y CD8 (E y F) se canalizó y analizó dentro de la población de CD3<sup>+</sup>. Los números representan los porcentajes de células en los cuadrantes.

La **figura 8** muestra que la inmunización con el péptido E7 formulado en adyuvante óptimo DOTAP provoca las células T CD8<sup>+</sup> funcionales. Los números de células CD8<sup>+</sup> IFN-γ por 10<sup>5</sup> células T CD8<sup>+</sup> se muestran como media ± SD y se compararon con el control no tratado (n = 4, \*\* p < 0.01).

La **figura 9** es un gráfico que ilustra la respuesta inmunitaria anti-tumor de los complejos de lípido catiónico/E7 compuestos por diversos lípidos catiónicos en comparación con adyuvantes potentes conocidos por provocar una respuesta de células T.

La **figura 10** es un gráfico que ilustra la producción de ROS en el ganglio linfático de drenaje de los ratones y se correlacionó con la respuesta inmunitaria anti-tumor. **A** Se aislaron los ganglios linfáticos de drenaje ("DLN") de los ratones que recibieron inyecciones de DOTAP/E7 que contienen 0, 15, 100 o 600 nmol de lípido 2 h después de la inyección. Los porcentajes relativos de células con señales positivas de ROS se enumeran. **B** Citotoxicidad en los DLN se midió mediante la recogida de células a las 10 h después de la inyección de DOTAP/E7 por citometría de flujo. Los porcentajes relativos de células muertas (PI positivo) en DC (cuadrado abierto) y los números de DC en vivos por 10<sup>5</sup> células LN (barras) se muestran y se compararon con el de los controles no tratados por prueba t de Student emparejada (\*\* P <0,01). **C** La producción de especies reactivas de oxígeno ("ROS") en DLN disminuyó mediante la coformulación de un lípido neutro inerte, dioleoil fosfatidilcolina ("DOPC") con DOTAP/E7 (relación molar de DOPC/DOTAP = 5), lo que resulta en una actividad anti-tumor disminuida del complejo.

La **figura 11** ilustra el efecto de mejora de la eficiencia de encapsulación sobre la respuesta inmunitaria resultante debido al complejo de lípido catiónico/antígeno. La actividad antitumoral TC-1 se ha mejorado mediante la incorporación de E7-lipopéptido en la formulación liposomal catiónico. Los ratones con tumor TC-1 (8-12 ratones por grupo) recibieron un solo tratamiento en el día 6 con DOTAP/E7 (que contiene péptido E7 de 5 o 10 nmoles) o

DOTAP/E7-lipopéptido (que contiene 5 nmol de péptido) o lípido DOTAP solo. Los ratones tratados con dextrosa (5%) se utilizaron como control negativo. La media de tamaños de tumor de cada grupo en el día 24 se comparó con la del grupo que recibió DOTAP/E7 (5 nmol) y se analizó mediante la prueba t de Student (\* p <0,05, \*\* p <0,01).

La **figura 12** es un gráfico que demuestra que la inmunización de ratones con DOTAP/E7-lipopéptido induce el aumento de la secreción de IFN- $\gamma$  en células T CD8<sup>+</sup>.

La **figura 13** es un gráfico que ilustra el aumento de la inmunogenicidad del antígeno de péptido unido a la secuencia de aminoácidos no relacionada corta.

La **figura 14A** es un gráfico que ilustra la expresión de moléculas coestimuladoras, CD80 y CD86, en células DC2.4 después de la estimulación con diferentes liposomas catiónicos.

La **figura 14B** es un gráfico que ilustra la expresión de la dependencia con la longitud de cadena de hidrocarburo de lípidos catiónicos en la expresión de molécula co-estimuladora (CD 80) en células DC 2.4.

Figura 15 Transcripción de quimiocinas y CD11c se regula por incremento e IL-1 se regula por disminución por liposomas catiónicos. (A) análisis de microarrays de Affymetrix que muestra el incremento en número de veces en los niveles de ARNm después de DC2. Cuatro células fueron tratadas con liposomas DOTAP 50  $\mu$ M durante 24 h. (B) RT-PCR que muestra CCL2 y CCL4 se regulan por incremento por DOTAP y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfolina ("DOEPC") en BMDC incubadas con liposomas DOEPC o DOTAP 50  $\mu$ M durante 16 h seguido de la extracción total de ARN y la amplificación con cebadores específicos (100 ng/ml LPS como control positivo).

**Figura 16** Solo liposomas catiónicos inducen la liberación de CCL2 del BMDC.

**Figura 17** DOTAP induce la liberación de CCL2 de una manera dependiente de la dosis.

**Figura 18** Se utilizaron inhibidores de la MAP quinasa para estudiar las vías de señalización implicadas en la liberación de CCL2 inducida por DOTAP de BMDC. El día 6, se preincubaron BMDC con inhibidores durante 20 min, seguido de tratamiento con liposomas DOTAP 75  $\mu$ M durante 24 h. La concentración utilizada en los experimentos son: PD (PD-98059), 20  $\mu$ M; SB (SB-203580), 10  $\mu$ M; U (U-0126), 10  $\mu$ M; PTx (toxina pertussis), 200 ng/mL; PP2, 10  $\mu$ M; Wort (Wortmannin), 200 nM; GF (GF 109203X), 200 nM. El sobrenadante se analizó por ELISA. Cien nanogramos por mililitro de LPS sirvieron como control positivo.

**Figura 19** DOTAP induce la activación de ERK y p38 en BMDC. (A) Tiempo de estudio. El día 6, se sembraron BMDC en placa de 12 pocillos en la densidad de 106/ml/pocillo. Fueron incubadas con liposomas DOTAP 75  $\mu$ M para el tiempo indicado. Las células se recogieron y se sometieron a análisis de transferencia Western usando anticuerpos indicados en la figura. La misma membrana se sondeó con el anticuerpo ERK2 para servir como control de carga. (B) La activación inducida por DOTAP de ERK estaba regulada negativamente por p38. (C) La activación inducida por DOTAP de ERK fue principalmente a través de PI-3 quinasa y se reguló negativamente por p38.

**Figura 20** Regulación por disminución de la expresión génica de ERK por el enfoque con siRNA atenúa la liberación de CCL2 inducida por DOTAP de BMDC. (A) La expresión génica de ERK se bloqueó por siRNA después de 24 h de tratamiento en BMDC. (B) Bloqueo de ERK1 por siRNA atenuó específicamente la liberación de CCL2 inducida por DOTAP de BMDC. DOTAP: 75 M, LPS: 100 ng/mL. \* p <0,05 en comparación con el control de siRNA, n = 3.

**Figura 21** La formulación DOTAP/E7 induce la acumulación de CCL2 en los ganglios linfáticos de drenaje de ratones. En el día 0, los ratones (n = 3) fueron inyectados con una formulación de DOTAP/E7 (100 nmol de DOTAP y 10  $\mu$ g de péptido E7). En los días indicados, se sacrificaron los ratones y se recogieron los ganglios linfáticos de drenaje. Los ganglios linfáticos de drenaje se homogeneizaron en 100  $\mu$ l de tampón de ELISA (10% FBS en PBS) y, a continuación, se analizaron por ELISA (A) o inmunoluminométricamente se tiñeron por el anticuerpo de CCL2 (B) tal como se menciona en el texto. Aumento original: x400.

**Figura 22** Inhibición de ERK atenúa la acumulación de CCL2 en los ganglios linfáticos de drenaje y bloquea la actividad anti-tumor de la formulación de DOTAP/E7. (A) Acumulación de CCL2 en los ganglios linfáticos de drenaje se regulaba recíprocamente por las vías de ERK y p38. (B) Cinética de crecimiento de tumor TC-1 en ratones que recibieron DOTAP/E7 coformulado con o sin inhibidor. Los ratones (n = 5) fueron inyectados con células TC-1 (1x10<sup>6</sup>/ratón) en el día 0. El día 6, se trataron con DOTAP/E7, DOTAP/E7/U-0126, DOTAP/E7/SB o PBS. El tamaño del tumor se midió a continuación. \* p <0,05, en comparación con el DOTAP/E7.

**Figura 23** Los complejos lípido catiónico/antígeno activan eficazmente las células dendríticas humanas. Las figuras 20, AE, ilustran la estimulación de CD 80 por DOTAP/E7, CD 83 por DOTAP/E7, CD 86 por DOTAP/E7, CD 80 por DOEPC/E7 y DOTAP/colesterol/E7, y CD 83 por DOEPC/E7 y DOTAP/colesterol/E7 respectivamente.

La **figura 24** ilustra la capacidad del complejo DOTAP/E7 para inducir la producción de citocinas y de quimiocinas por las células dendríticas humanas. Las figuras 23 A-F ilustran la producción de TNF- $\alpha$ , IL-12, CCL3, CCL4, CCL5, y CCL-19 respectivamente.

La **figura 25** ilustra el efecto del tamaño de las partículas de complejo lípido catiónico/antígeno en la activación de células dendríticas humanas.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0017] Una o más realizaciones específicas de la presente invención se describirán a continuación. En un esfuerzo por proporcionar una descripción concisa de estas realizaciones, todas las características de una implementación real pueden no estar descritas en la memoria. Debe tenerse en cuenta que en el desarrollo de dicha implementación real deben realizarse numerosas decisiones específicas de la implementación para alcanzar los objetivos específicos de los desarrolladores, que pueden variar de una implementación a otra. Por otra parte, se debe entender que tal esfuerzo de desarrollo podría ser complejo y consumir tiempo, pero sin embargo sería un proceso de rutina para los expertos que tengan el beneficio de esta descripción.

5 **[0018]** Cuando se introducen elementos de la presente invención (por ejemplo, las realizaciones de ejemplo de la misma), los artículos "un", "una", "el/la" y "dicho/a" se entiende que significan que hay uno o más de los elementos. Los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" pretenden ser inclusivos y significan que pueden haber elementos adicionales distintos de los elementos enumerados.

10 **[0019]** Un aspecto de la presente invención proporciona un lípido catiónico para producir una respuesta inmunitaria en un mamífero para prevenir o tratar la enfermedad. El lípido catiónico puede funcionar independientemente como un inmunomodulador, de una manera dependiente de la dosis, tal como para la producción de quimiocinas y/o  
15 citocinas, mediante la activación de diversos componentes de la vía de señalización de MAP quinasa. Se observa que el intervalo de dosis óptimo difiere dentro de varias especies de mamíferos. En las especies de roedores, por ejemplo, la dosis óptima de lípido catiónico puede variar entre 50 - 300 nmol. Las dosis y composiciones específicas descritas en el presente documento son meramente de ejemplo y un experto en la técnica puede determinar las dosis apropiadas para su uso en un sujeto determinado. En otro aspecto, el lípido catiónico en un intervalo de dosis  
20 baja puede estar asociada con antígenos o medicamentos para la presentación a las células del sistema inmunológico estimulando al mismo tiempo una fuerte respuesta inmunitaria específica de antígeno. En algunos aspectos de la invención, el antígeno es un lipopéptido.

25 **[0020]** La patente US No. 7.303.881 describe que se observó que múltiples lípidos catiónicos acoplejados con antígenos asociados a la enfermedad estimulaban una respuesta inmunitaria profiláctica que prevenía la enfermedad específica (por ejemplo, cáncer positivo de VPH) y también una respuesta inmunitaria terapéutica que mató células que expresaban el antígeno particular y dio lugar a un tratamiento eficaz de la enfermedad. Actualmente, se han realizado estudios para comprender aún más la capacidad inmunoestimuladora de lípidos  
30 catiónicos utilizando DOTAP, DOEPC, y cloruro de propil-N,N,N-trimetil amonio ("DOTMA"), tres lípidos catiónicos que caen dentro de una amplia clase de lípidos demostraron funcionar como inmunoestimuladores en la patente referenciada anteriormente. Estos estudios han llevado al descubrimiento de que los lípidos catiónicos pueden funcionar de manera independiente como inmunomoduladores dentro de ciertos intervalos de dosis baja o composiciones para estimular una respuesta inmunitaria con (o sin) antígenos. Cuando los lípidos catiónicos forman  
35 complejos con un antígeno, se genera una respuesta inmunitaria específica de antígeno.

40 **[0021]** En otro aspecto, las composiciones de lípidos catiónicos de la presente invención administrados bajo ciertas condiciones de dosis aquí descritas estimulan la inducción de diversos componentes de la vía de señalización de MAP quinasa y activan la respuesta inmunitaria del cuerpo para luchar contra la enfermedad, mientras que al mismo tiempo se liberan antígenos a las células del sistema inmunológico. Como se demuestra en los ejemplos siguientes,  
45 los lípidos catiónicos inducen la producción de especies reactivas de oxígeno ("ROS") de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, más allá de la dosis óptima del lípido catiónico, la alta producción de ROS induce la apoptosis en las células del sistema inmunitario que disminuye la capacidad del lípido para generar una respuesta inmunitaria fuerte. La producción de un intervalo específico de ROS, a su vez, da lugar a la producción de citocinas y quimiocinas para regular una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, la dosis óptima de lípido catiónico es una cantidad que estimula eficazmente los niveles de producción de ROS suficientes para estimular un incremento en la  
50 respuesta inmunitaria por encima de una respuesta inmunitaria presente en ausencia de un lípido catiónico (a la vez que no se estimula el exceso de producción de ROS suficiente para inducir cantidades significativas de apoptosis en células del sistema inmunitario, es decir, suficiente apoptosis para disminuir la respuesta inmunitaria) y activa la vía de señalización de la MAP quinasa. Como se describió anteriormente, la dosis óptima puede variar entre las especies y se determina fácilmente por un experto normal en la técnica.

55 **[0022]** En otro aspecto, el lípido catiónico, a una dosis óptima, se administra en combinación con un antígeno o antígenos. En este caso la combinación lípido catiónico/antígeno es capaz de generar una respuesta inmunitaria que es específica para el antígeno o antígenos liberados en combinación con el lípido catiónico. La respuesta generada puede incluir la producción de células T citotóxicas específicas, las células T de memoria, o células B que dan lugar a la prevención de o respuesta terapéutica a la enfermedad específica asociada con el antígeno o antígenos.

60 **[0023]** Los lípidos catiónicos de la invención pueden estar en forma de complejos de lípidos catiónicos. El complejo de lípido catiónico puede tomar la forma de varias vesículas, tales como liposomas, micelas, o emulsiones. Los complejos de lípidos catiónicos pueden ser unilaminares o multilaminares. Cuando se incluye un antígeno, el antígeno puede estar encapsulado en el complejo de lípido catiónico o puede estar no encapsulado. Encapsulado se  
65 entiende que significa que el antígeno puede estar contenido dentro del espacio interno del complejo y/o incorporado en las paredes del lípido del complejo.

**[0024]** La invención se refiere además a un procedimiento para la producción de estos complejos en donde el procedimiento puede incluir opcionalmente la etapa de purificar estas formulaciones del exceso de componentes individuales. Para la producción de los complejos de antígeno de esta invención, la inclusión de la etapa de purificación es una realización ventajosa.

**[0025]** En ciertas realizaciones, los complejos de lípidos catiónicos tienen una carga positiva neta y/o una superficie cargada positivamente a pH 6,0-8,0.

**[0026]** El "antígeno" opcional que se puede incluir con los complejos de lípidos catiónicos de la invención pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, lipopéptidos, proteínas, lipoproteínas, polisacáridos, y otras macromoléculas que pueden formar un complejo directamente con lípidos catiónicos. Sin embargo, los fármacos catiónicos (por ejemplo, proteína grande catiónica) se pueden complejar directamente con un lípido aniónico o pueden complejarse secuencialmente primero con lípidos o polímero aniónico seguido por lípido catiónico. El uso de este proceso permite la liberación de fármacos cargados positivamente o neutros a las células por los complejos de la presente invención.

**[0027]** Un aspecto de la presente invención implica el uso de los complejos de lípidos catiónicos para estimular la producción de quimiocinas y citocinas. Las quimiocinas y citocinas son importantes reguladores de la respuesta inmunitaria. Las quimiocinas se identificaron originalmente como potentes quimioatrayentes para las células inflamatorias que incluyen neutrófilos, eosinófilos y monocitos/macrófagos. Estudios posteriores han revelado que las quimiocinas tienen profundos efectos en reacciones inmunes mediante la regulación del tráfico de células dendríticas y otros linfocitos en órganos linfoides. Las células dendríticas son células migratorias que depositan antígenos en el tejido, migran a los ganglios linfáticos de drenaje y maduran para estimular la respuesta de células T. CCL2, un miembro de las quimiocinas CC se identificó originalmente como un quimiotáctico y factor activador de monocitos/macrófagos. Estudios posteriores demostraron que también puede afectar a la función de las células T, células asesinas naturales, y neutrófilos. La exploración adicional encontró que era CCL2 era el activador más potente de la actividad de linfocitos T citotóxicos ("CTL") CD8+, cuando está en presencia de las citocinas Th1, la interleucina-12 ("IL-12") y el interferón- $\gamma$  ("IFN- $\gamma$ "). Esto se puede explicar por una interacción bidireccional positiva entre los sistemas de CCL2 y IFN- $\gamma$ . Una ausencia de la citocina o la quimiocina puede interferir con la polarización de Th1 y la posterior generación de inmunidad tumoral específica. Otra quimiocina CC, CCL-4, también se ha demostrado que recluta y expande las células dendríticas in vivo y potencia la inmunogenicidad de las vacunas de ADN plásmido. Recientemente, se ha demostrado que las quimiocinas mejoran la inmunidad al guiar células T CD8+ sin tratar a sitios de interacción de células T CD4+-células dendríticas y promueven la generación de células T de memoria CD8+. Algunos ejemplos de quimiocinas que pueden ser estimuladas por los complejos de lípidos catiónicos de la presente invención son CCL-2, CCL-3, y CCL-4. Ejemplos de citocinas que pueden ser estimuladas por los complejos de lípidos catiónicos de la presente invención son IL-12 e IFN- $\gamma$ . Los inventores contemplan que los complejos de lípido catiónico de la presente invención pueden estimular citocinas y quimiocinas, además de las descritas en esta memoria.

**[0028]** En un aspecto adicional, los complejos de lípidos catiónicos de la presente invención estimulan una respuesta inmunitaria mediante la activación de vías celulares de quinasas, tales como, por ejemplo, la vía de la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) (también conocida como mecamimos de quinasa activada por mitógenos (MAP)), vía de p38, o vía de fosfatidil inositol-3 (PI-3). Estas vías, a su vez, pueden regular la estimulación de la respuesta inmunitaria y la producción de citocinas y quimiocinas. Estas vías son bien conocidas por los expertos en la técnica.

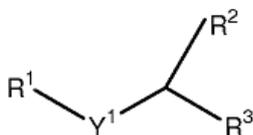
**[0029]** Los complejos de lípidos catiónicos de la presente invención pueden regular la actividad de las células T para estimular una respuesta inmunitaria. Hay tres clases de células T: células T auxiliares, células T asesinas y las células T reguladoras. Estas tres clases de células T trabajan juntos para coordinar la respuesta inmunitaria celular. Los linfocitos T citotóxicos ("CTL"), también conocidos como células T asesinas o células T CD8+, son responsables de atacar a las células que expresan antígenos extraños o tumorales. Las células T reguladoras se cree que son responsables del disminuyamiento de la inmunidad mediada por CTL, aunque las vías exactas que subyacen a este efecto de las células T reguladoras no se entienden bien. Se sabe que la disminución de la actividad de células T reguladoras puede dar lugar a un aumento de la actividad de CTL que conduce a una respuesta inmunitaria celular más robusta. Como se muestra en los ejemplos siguientes, los complejos de lípidos catiónicos de la presente invención a composiciones de dosis óptimas de lípidos también pueden estimular una respuesta inmunitaria potente mediante la disminución de la población de células T reguladoras.

## LÍPIDOS

**[0030]** Los complejos de lípidos catiónicos de la presente invención pueden formar liposomas que están opcionalmente mezclados con antígeno y pueden contener lípidos catiónicos solos o lípidos catiónicos en combinación con lípidos neutros. Especies de lípidos catiónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a: 3- $\beta$ [<sup>4</sup>N-(<sup>1</sup>N,<sup>8</sup>-diguandino espermidina)carbamoil] colesterol (BGSC); 3- $\beta$ [N,N-diguandinoetil-aminoetano)carbamoil]colesterol (BGTC); N,N<sup>1</sup>N<sup>2</sup>N<sup>3</sup> tetramiltetrapalmitilespermin (Cellfectin); N-t-butil-N'-tetradecil-3-tetradecil-aminopropionamida (CLONfectin); bromuro de dimetildiioctadecil amonio (DDAB); bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxi-etil amonio (DMRIE); trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA); 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxiespermil)-propil amida (DOSPER); 4-(2,3-bis-palmitoiloxi-propil)-1-metil-1H-imidazol (DPIM); yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis(2-hidroxi-etil)-2,3-dioleoiloxi-1,4-butanodiamonio (Tfx-50); cloruro de N-1-(2,3-dioleoiloxi)propil-N,N,N-trimetil amonio (DOTMA) u otros tensioactivos N-(N,N,N-1-dialcoxi)alquil-N,N,N-trisustituido amonio; 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetilamonio)butanol-sn-glicerol (DOBT) o butanoato de colesterilo (4'-trimetilamonio) (ChOTB) en el que el grupo trimetilamonio está conectado vía un brazo espaciador de butanol a la cadena doble (para DOTB) o grupo colesterilo (para ChOTB); DORI (DL-1,2-dioleoil-3-dimetilaminopropil-beta-hidroxi-etilamonio) o DORIE (DL-1,2-O-dioleoil-3-dimetilaminopropil-beta-hidroxi-etilamonio)

(DORIE) o análogos de los mismos tal como se describe en el documento WO 93/03709; éster de 1,2-dioleoil-3-succinil-sn-glicerol colina (DOSC); éster de hemisuccinato de colesterilo (ChOSC); lipopoliaminas, tales como dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS) y dipalmitoil fosfatidiletanolamilespermina (DPPES) o los lípidos catiónicos descritos en la patente estadounidense. No. 5.283.185, yoduro de colesteril-3 $\beta$ -carboxil-amido-etilenetrimetilamonio, yoduro de carboxilato de 1-dimetilamino-3-trimetilamonio-DL-2-propil-colesterilo, yoduro de colesteril-3-O-carboxiamidoetilenamina, colesteril-3- $\beta$ -oxisuccinamido-etilenetrimetilamonio, yoduro de 1-dimetilamino-3-trimetilamonio-DL-2-propil-colesteril-3- $\beta$ -oxisuccinato, yoduro de 2-(2-trimetilamonio)-etilmetilamino etil-colesteril-3- $\beta$ -oxisuccinato, 3- $\beta$ -N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil colesterol (DC-Chol), y 3- $\beta$ -N-(polietilenimina)-carbamoilcolesterol; O,O'-dimiristil-N-lisil aspartato (DMKE); O,O'-dimiristil-N-lisil glutamato (DMKD); bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxi etil amonio (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-trimetilamonio propano (DOTAP); dioleoil dimetilaminopropano (DODAP); 1,2-palmitoil-3-trimetilamonio propano (DPTAP); 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio propano (DSTAP), 1,2-miristoil-3-trimetilamonio propano (DMTAP); y dodecilsulfato de sodio (SDS). La presente invención contempla el uso de variantes estructurales y derivados de los lípidos catiónicos descritos en esta solicitud.

**[0031]** Ciertos aspectos de la presente invención incluyen lípidos catiónicos no esteroideos que tienen una estructura representada por la siguiente fórmula:



en el que R<sup>1</sup> es un grupo amonio cuaternario, Y<sup>1</sup> se elige entre una cadena de hidrocarburo, un éster, una cetona, y un péptido, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se eligen independientemente entre un ácido graso saturado, un ácido graso insaturado, un hidrocarburo unido a éster, fósforo-diésteres, y combinaciones de los mismos. DOTAP, DMTAP, DSTAP, DPTAP, DPEPC, DSEPC, DMEPC, DLEPC, DOEPC, DMKE, DMKD, DOSPA, DOTMA, son ejemplos de lípidos que tienen esta estructura general.

**[0032]** En una realización, los lípidos catiónicos de la invención son los lípidos en los que los enlaces entre el grupo lipófilo y el grupo amino son estables en disolución acuosa. Por lo tanto, un atributo de los complejos de la invención es su estabilidad durante el almacenamiento (es decir, su capacidad para mantener un diámetro pequeño y retener la actividad biológica en el tiempo después de su formación). Dichos enlaces utilizados en los lípidos catiónicos incluyen enlaces amida, enlaces éster, enlaces éter y enlaces carbamoilo. Los expertos en la técnica entenderán fácilmente que los liposomas que contienen más de una especie de lípido catiónico pueden ser utilizados para producir los complejos de la presente invención. Por ejemplo, los liposomas que comprenden dos especies de lípidos catiónicos, lisil-fosfatidiletanolamina y éster de  $\beta$ -alanil colesterol, se han descrito para ciertas aplicaciones de administración de fármacos [Brunette, E. et al., Nucl. Acids Res., 20: 1,151 (1,992)].

**[0033]** Se debe entender, además, que en la consideración de liposomas catiónicos adecuados para su uso en la invención y opcionalmente mezclados con el antígeno, los procedimientos de la invención no se limitan únicamente a la utilización de los lípidos catiónicos citados anteriormente, sino que se puede utilizar cualquier composición de lípidos siempre que se produzca un liposoma catiónico y la densidad de carga catiónica resultante sea suficiente para activar e inducir una respuesta inmunitaria.

**[0034]** Por lo tanto, los complejos de la invención pueden contener otros lípidos, además de los lípidos catiónicos. Estos lípidos incluyen, pero no se limitan a, liso lípidos de los cuales lisofosfatidilcolina (1-oleoil lisofosfatidilcolina) es un ejemplo, colesterol o fosfolípidos neutros incluyendo dioleoil fosfatidil etanolamina (DOPE) o dioleoil fosfatidilcolina (DOPC), así como diversos agentes tensioactivos lipofílicos, que contienen restos de polietilenglicol, de los cuales Tween-80 y PEG-PE son ejemplos.

**[0035]** Los complejos de lípidos catiónicos de la invención también pueden contener lípidos cargados negativamente, así como lípidos catiónicos siempre que la carga neta de los complejos formados sea positivo y/o la superficie del complejo esté cargada positivamente. Los lípidos cargados negativamente de la invención son los que comprenden al menos una especie de lípido que tiene una carga neta negativa a pH fisiológico o cerca del mismo, o combinaciones de éstos. Las especies de lípidos cargados negativamente adecuados incluyen, pero no se limitan a, CHEMS (hemisuccinato de colesterilo), NGPE (N-glutaril fosfatidiletanolamina), fosfatidil glicerol y ácido fosfatídico o un análogo de fosfolípido similar.

**[0036]** Los procedimientos para producir los liposomas a utilizar en la producción de los complejos de liberación de fármacos que comprenden lípidos de la presente invención son conocidos por los expertos en la técnica. Una revisión de las metodologías de preparación de liposomas se puede encontrar en Liposome Technology (CFC Press

Nueva York 1984); Liposomes por Ostro (Marcel Dekker, 1987); Methods Biochem Anal. 33: 337-462 (1988) y la patente de EE.UU. N° 5.283.185. Tales procedimientos incluyen la extrusión de congelación-descongelación y sonicación. Los liposomas unilamelares (menos de aproximadamente 200 nm de diámetro medio) y liposomas multilamelares (mayor de aproximadamente 300 nm de diámetro medio) se pueden utilizar como componentes de partida para producir los complejos de esta invención.

**[0037]** En los liposomas catiónicos utilizados para producir los complejos de lípidos catiónicos de esta invención, el lípido catiónico está presente en el liposoma a desde aproximadamente 10% molar a aproximadamente 100% molar de lípido liposomal total, o de aproximadamente 20% molar a aproximadamente 80% molar. El lípido neutro, cuando se incluye en el liposoma, puede estar presente a una concentración de desde aproximadamente 0% molar a aproximadamente 90% molar del lípido liposomal total, o de aproximadamente 20% molar a aproximadamente 80% molar, o de 40% molar a 80% molar. El lípido cargado negativamente, cuando se incluye en el liposoma, puede estar presente en una concentración que varía de aproximadamente 0% molar a aproximadamente 49% molar del lípido liposomal total, o de aproximadamente 0% molar a aproximadamente 40% molar. En una realización, los liposomas contienen un lípido catiónico y un lípido neutro, en proporciones comprendidas entre aproximadamente 2:8 y aproximadamente 6:4. Se entiende, además, que los complejos de la presente invención pueden contener lípidos modificados, proteínas, policationes o ligandos de receptores que funcionan como un factor de reconocimiento dirigiendo el complejo a un tejido o tipo de célula particular. Ejemplos de factores de reconocimiento incluyen, pero no se limitan a, asialoglicoproteína, insulina, lipoproteína de baja densidad (LDL), ácido fólico y anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra moléculas de la superficie celular. Además, para modificar la vida media circulatoria de los complejos, la carga de superficie positiva puede protegerse estéricamente mediante la incorporación de tensioactivos lipófilos que contienen restos de polietilenglicol.

**[0038]** Los complejos de lípidos catiónicos pueden almacenarse en sacarosa isotónica o solución de dextrosa tras la recogida del gradiente de sacarosa o pueden liofilizarse y a continuación reconstituirse en una solución isotónica antes de su uso. En una realización, los complejos de lípidos catiónicos se almacenan en solución. La estabilidad de los complejos de lípidos catiónicos de la presente invención se mide mediante ensayos específicos para determinar la estabilidad física y actividad biológica de los complejos de lípidos catiónicos con el tiempo en almacenamiento. La estabilidad física de los complejos de lípidos catiónicos se mide determinando el diámetro y la carga de los complejos de lípidos catiónicos mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, microscopía electrónica, cromatografía de filtración en gel o por medio de dispersión de la luz cuasi-elástica utilizando, por ejemplo, un analizador del tamaño de partículas Coulter N4SD tal como se describe en los Ejemplos. La estabilidad física del complejo de lípidos catiónicos es "sustancialmente invariable" sobre el almacenamiento cuando el diámetro de los complejos de lípidos catiónicos almacenados no se incrementa en más de un 100%, o no más de 50%, o no más de 30%, sobre el diámetro de los complejos de lípidos catiónicos tal como se determina en el momento de purificación de los complejos de lípidos catiónicos.

**[0039]** Aunque es posible administrar el lípido catiónico en una forma pura o sustancialmente pura, es preferible presentarlo como una composición, formulación o preparación farmacéutica. Las formulaciones farmacéuticas que utilizan los complejos de lípidos catiónicos de la invención pueden comprender los complejos de lípidos catiónicos en un tampón estéril fisiológicamente compatibles, tal como, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, solución salina isotónica o tampón de baja fuerza iónica, tal como acetato o Hepes (estando un pH de ejemplo en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0). Los complejos de lípidos catiónicos se pueden administrar en forma de aerosoles o soluciones líquidas para administración intratumoral, intraarterial, intravenosa, intratraqueal, intraperitoneal, subcutánea e intramuscular.

**[0040]** Las formulaciones de la presente invención pueden incorporar cualquier estabilizador conocido en la técnica. Estabilizadores ilustrativos son el colesterol y otros esteroides que pueden ayudar a rigidizar la bicapa del liposoma y evitar la disgregación o la desestabilización de la bicapa. También agentes, tales como polietilenglicol, poli- y mono-sacáridos, pueden incorporarse en el liposoma para modificar la superficie del liposoma y evitar que sea desestabilizada debido a la interacción con componentes de la sangre. Otros estabilizadores ilustrativos son proteínas, sacáridos, ácidos inorgánicos, o ácidos orgánicos que pueden ser utilizados solos o como mezclas.

**[0041]** Se pueden emplear un número de procedimientos farmacéuticos para controlar, modificar o prolongar la duración de la estimulación inmunitaria. Las preparaciones de liberación controlada se pueden lograr mediante el uso de complejos de polímeros, tal como poliésteres, poliaminoácidos, metilcelulosa, polivinil, poli(ácido láctico), e hidrogeles para encapsular o atrapar los lípidos catiónicos y liberarlos lentamente. También se pueden utilizar polímeros similares para adsorber los liposomas. Los liposomas pueden estar contenidos en formulaciones de emulsión con el fin de alterar el perfil de liberación del estimulante. Alternativamente, la duración de la presencia del estimulante en la circulación de la sangre se puede mejorar mediante el recubrimiento de la superficie del liposoma con compuestos, tales como polietilenglicol u otros polímeros y otras sustancias, tales como sacáridos, que son capaces de aumentar el tiempo de circulación o media vida de los liposomas y emulsiones.

**[0042]** Cuando se requieren preparaciones orales, los lípidos catiónicos pueden combinarse con portadores farmacéuticos típicos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o goma arábiga, entre otros. Los lípidos catiónicos también se pueden encapsular en cápsulas

o comprimidos para la administración sistémica.

[0043] La administración del lípido catiónico de la presente invención puede ser para un propósito profiláctico o terapéutico. Cuando se proporciona profilácticamente, el lípido catiónico se proporciona antes de cualquier evidencia o síntoma de la enfermedad. Cuando se proporciona terapéuticamente, el lípido catiónico se proporciona en o después de la aparición de la enfermedad. La administración terapéutica del estimulante inmunitario sirve para atenuar o curar la enfermedad. Para ambos propósitos, el lípido catiónico se puede administrar con un agente o agentes terapéuticos adicionales o antígeno o antígenos. Cuando los lípidos catiónicos se administran con un agente terapéutico o antígeno adicional, puede generarse un efecto profiláctico o terapéutico contra una enfermedad específica.

[0044] Las formulaciones de la presente invención, tanto para uso veterinario como para uso humano, comprenden un lípido catiónico solo como se describe anteriormente, y también opcionalmente, con uno o más ingredientes terapéuticos, tal como un antígeno o antígenos o molécula o moléculas de fármaco. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica farmacéutica.

## ANTÍGENOS

[0045] En una realización, el lípido catiónico se administra sin agentes adicionales con el fin de potenciar o disminuir varias respuestas inmunitarias, incluyendo la producción de otros moduladores inmunitarios, y para estimular la respuesta inmunitaria a la lucha contra la enfermedad. En otra realización, el lípido catiónico se administra en combinación con un antígeno o antígenos. En este caso, el objetivo es generar una respuesta inmunitaria, que es específica para el antígeno o antígenos liberados en combinación con el lípido catiónico. La respuesta generada puede incluir la producción de células T citotóxicas, células T de memoria, o las células B específicas que dan lugar a la prevención de o respuesta terapéutica a la enfermedad específica asociada con los antígenos. El antígeno puede ser cualquier antígeno asociado a tumor o un antígeno microbiano o cualquier otro antígeno conocido para un experto en la técnica.

[0046] Un "antígeno asociado a tumor," como se usa en el presente documento, es una molécula o compuesto (por ejemplo, una proteína, péptido, polipéptido, lipoproteína, lipopéptido, glicoproteína, glicopéptidos, lípido, glicolípido, hidratos de carbono, ARN y/o ADN) asociado con una célula de tumor o cáncer y que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria (humoral y/o celular) cuando se expresa en la superficie de una célula presentadora de antígeno en el contexto de una molécula MHC. Los antígenos asociados a tumores incluyen antígenos propios, así como otros antígenos que no pueden estar asociados específicamente con un cáncer, pero no obstante potencian una respuesta inmunitaria a y/o reducen el crecimiento de una célula tumoral o de cáncer cuando se administran a un animal. Las realizaciones más específicas se proporcionan en el presente documento.

[0047] Un "antígeno microbiano", como se usa en el presente documento, es un antígeno de un microorganismo e incluye, pero no se limita a, virus infecciosos, bacterias infecciosas, parásitos infecciosos y hongos infecciosos. Antígenos microbianos pueden ser microorganismos intactos, y aislados naturales, fragmentos, o derivados de los mismos, compuestos sintéticos que son idénticos o similares a antígenos microbianos naturales y, preferiblemente, inducen una respuesta inmunitaria específica para el microorganismo correspondiente (de la que el antígeno microbiano natural se originó). En una realización preferida, un compuesto es similar a un antígeno de microorganismo natural si induce una respuesta inmunitaria (humoral y/o celular) similar a un antígeno de microorganismo natural. Los compuestos o antígenos que son similares a un antígeno de microorganismo de origen natural son bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, una proteína, péptido, polipéptido, lipoproteína, lipopéptido, glicoproteína, glicopéptidos, lípido, glicolípido, hidratos de carbono, ARN y/o ADN. Otro ejemplo no limitativo de un compuesto que es similar a un antígeno de microorganismo de origen natural es un péptido mimético de un antígeno polisacárido. Las realizaciones más específicas se proporcionan en el presente documento.

[0048] El término "antígeno" pretende abarcar además análogos de péptidos o proteínas de antígenos conocidos o de tipo salvaje, tales como los descritos en esta memoria. Los análogos pueden ser más solubles o más estables que el antígeno de tipo salvaje, y también pueden contener mutaciones o modificaciones que hacen el antígeno más inmunológicamente activo. El antígeno puede modificarse de cualquier manera, tal como la adición de restos lipídicos o de azúcar, mutando secuencias de aminoácidos de péptido o proteína, mutando la secuencia de ADN o ARN, o cualquier otra modificación conocida por un experto en la técnica. Los antígenos pueden modificarse utilizando procedimientos estándar conocidos por un experto en la técnica.

[0049] También son útiles en las composiciones y procedimientos de la presente invención péptidos o proteínas que tienen secuencias de aminoácidos homólogas con la secuencia de aminoácidos de un antígeno deseado, donde el antígeno homólogo induce una respuesta inmunitaria al tumor, microorganismo o célula infectada respectiva.

[0050] En una realización, el antígeno en el complejo de lípido catiónico comprende un antígeno asociado a un tumor o cáncer, es decir, un antígeno asociado al tumor, para producir una vacuna para prevenir o tratar un tumor.

Por tanto, en una realización, las vacunas de tumor o cáncer de la presente invención comprenden además al menos un epítipo de al menos un antígeno asociado a tumor. En otra realización preferida, las vacunas de tumor o cáncer de la presente invención comprenden además una pluralidad de epítipos de uno o más antígenos asociados a tumores. Los antígenos asociados a tumores que son útiles en los complejos de lípidos catiónicos y procedimientos de la presente invención pueden ser intrínsecamente inmunogénicos, o no inmunogénicos, o ligeramente inmunogénicos. Como se demuestra en el presente documento, los antígenos propios asociados a tumores se pueden emplear ventajosamente en estas vacunas para el efecto terapéutico, ya que las composiciones en cuestión son capaces de romper la tolerancia inmune contra dichos antígenos. Los antígenos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, antígenos sintéticos, recombinantes, exógenos, u homólogos, y los materiales antigénicos pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, polipéptidos, lipoproteínas, lipopéptidos, lípidos, glicolípidos, hidratos de carbono, ARN y ADN. Los ejemplos de tales vacunas incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer cervical, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinoma de intestino, o cualquier otro tipo de cáncer conocido en la técnica como susceptible a la inmunoterapia, usando un lípido catiónico en un complejo con un antígeno o antígenos asociados al tumor. También es posible formular el antígeno con el lípido catiónico sin encapsular en el liposoma.

**[0051]** Los complejos de lípidos catiónicos de la presente invención pueden usarse en procedimientos para tratar o prevenir el cáncer. En tal caso, el mamífero a inmunizar se inyecta con la formulación farmacéutica que contiene el liposoma con el antígeno o antígenos encapsulados. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse con vacunas de tumor incluyen, pero no se limitan a, la prevención o tratamiento de cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer cervical, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinoma de intestino, o cualquier otro tipo de cáncer conocido en la técnica usando un lípido catiónico y un antígeno o múltiples antígenos peptídicos asociados con el cáncer. También es posible formular el antígeno con el lípido catiónico sin encapsular el antígeno en el liposoma.

**[0052]** Los antígenos asociados a tumores adecuados para uso en la presente invención incluyen moléculas naturales y modificadas que pueden ser indicativas de un tipo de tumor individual, compartidos entre varios tipos de tumores, y/o exclusivamente expresados o sobreexpresados en células tumorales en comparación con células normales. Además de las proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, péptidos y lipopéptidos, también se han documentado patrones específicos de tumores de expresión de hidratos de carbono, gangliósidos, glicolípidos, y mucinas. Los antígenos asociados a tumores de ejemplo para su uso en vacunas contra el cáncer incluyen productos proteicos de oncogenes, genes supresores de tumores y otros genes con mutaciones o reordenamientos únicos a las células tumorales, productos génicos embrionarios reactivados, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación específicos del tejido (pero no específicos de tumores), receptores del factor de crecimiento, residuos de hidratos de carbono de la superficie celular, proteínas virales exógenas y un conjunto de otras proteínas propias.

**[0053]** Las realizaciones específicas de antígenos asociados a tumores incluyen, por ejemplo, antígenos mutados o modificados, tales como los productos proteicos de los protooncogenes Ras p21, supresor de tumores p53 y oncogenes HER-2/neu y BCR-ABL, así como CDK4, MUM1, caspasa 8, y Beta catenina; antígenos sobreexpresados, tales como la galectina 4, galectina 9, anhidrasa carbónica, aldolasa A, PRAME, Her2/neu, ErbB-2 y KSA, antígenos oncofetales, tales como alfa fetoproteína (AFP), gonadotropina coriónica humana (hCG); autoantígenos, tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígenos de diferenciación de melanocitos, tales como Mart 1/Melan A, gp100, gp75, tirosinasa, TRP1 y TRP2; antígenos asociados a próstata, tales como PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 y PSM-P2; productos de genes embrionarios reactivados, tales como MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE, y otros antígenos de cáncer testicular, tales como NY-ESOL, SSX2 y SCPL; mucinas, tales como Muc-1 y Muc-2; gangliósidos, tales como GM2, GD2 y GD3, glicolípidos y glicoproteínas neutras, tales como Lewis (y) y globo-H; y glicoproteínas, tales como Tn, antígeno de Thompson-Freidenreich (TF) y sTn. También se incluyen como antígenos asociados a tumores en el presente documento células completas y lisadas de células tumorales, así como las partes inmunogénicas de las mismas, así como idiotipos de inmunoglobulina expresados en proliferaciones monoclonales de linfocitos B para su uso contra los linfomas de células B.

**[0054]** Los antígenos asociados a tumores y sus respectivas células tumorales diana incluyen, por ejemplo, citoqueratinas, particularmente citoqueratina 8, 18 y 19, como antígenos para el carcinoma. El antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno de embriones humanos (HEA-125), glóbulos de grasa de la leche humana, MBr1, MBr8, Ber-EP4, 17-1A, C26 y T16 son también antígenos de carcinoma conocidos. La desmina y actina muscular específica son antígenos de sarcomas miogénicos. La fosfatasa alcalina placentaria, la beta gonadotropina coriónica humana, y la alfa-fetoproteína son antígenos de tumores trofoblásticos y tumores de células germinales. El antígeno específico de próstata es un antígeno de carcinomas prostáticos, antígeno carcinoembrionario de los adenocarcinomas de colon. HMB-45 es un antígeno de los melanomas. En el cáncer de cuello de útero, los antígenos útiles podrían ser codificados por el virus del papiloma humano. La cromagranina-A y la sinaptofisina son antígenos de tumores neuroendocrinos y neuroectodérmicos. De particular interés son los tumores agresivos que forman masas tumorales sólidas con áreas de necrosis. La lisis de dichas células necróticas es una fuente rica de antígenos para células presentadoras de antígeno, y por tanto la terapia en cuestión puede ser útil de forma ventajosa en combinación con la quimioterapia convencional y/o terapia de radiación.

**[0055]** En una realización, se utilizan antígenos del virus del papiloma humano VPH. Un antígeno específico de VPH que se utiliza como antígeno asociado a tumor es el VPH subtipo16 E7. Los complejos de lípidos catiónicos-antígeno E7 de VPH son eficaces en la prevención y el tratamiento del cáncer de cuello uterino. Además, una proteína E7 modificada genéticamente, es decir, la proteína E7M, que tiene actividad antigénica, pero sin actividad tumorigénica, es un antígeno asociado a tumor eficaz. Los complejos de lípidos catiónicos-E7M inducen inmunidad celular para causar la regresión completa de tumores establecidos y, por tanto, son útiles como potentes vacunas contra el cáncer de cuello uterino.

**[0056]** Los antígenos asociados a tumores se pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, estos antígenos se pueden preparar a partir de células cancerosas, ya sea mediante la preparación de extractos crudos de células de cáncer (por ejemplo, como se describe en Cohen et al, Cancer Res., 54: 1.055 (1.994)), purificando parcialmente los antígenos, por tecnología recombinante, o por síntesis de novo de antígenos conocidos. El antígeno también puede estar en forma de un ácido nucleico que codifica un péptido antigénico en una forma adecuada para la expresión en un sujeto y la presentación al sistema inmunitario del sujeto inmunizado. Además, el antígeno puede ser un antígeno completo, o puede ser un fragmento de un antígeno completo que comprende al menos un epítipo.

**[0057]** Los antígenos derivados de patógenos conocidos por predisponer a ciertos tipos de cáncer también se pueden incluir ventajosamente en las vacunas contra el cáncer de la presente invención. Se estima que cerca del 16% de la incidencia mundial de cáncer se puede atribuir a agentes patógenos infecciosos; y una serie de tumores malignos comunes se caracterizan por la expresión de productos génicos virales específicos. Por lo tanto, la inclusión de uno o más antígenos de patógenos implicados en la causa del cáncer puede ayudar a ampliar la respuesta inmunitaria del huésped y potenciar el efecto profiláctico o terapéutico de la vacuna contra el cáncer. Los patógenos de interés particular para su uso en las vacunas contra el cáncer proporcionados en este documento incluyen, virus de la hepatitis B (carcinoma hepatocelular), virus de la hepatitis C (hepatomas), virus de Epstein Barr (EBV) (linfoma de Burkitt, cáncer de nasofaringe, PTLD en individuos inmunosuprimidos), HTLV (leucemia de células T adulta), virus del papiloma humano oncogénicos tipos 16, 18, 33, 45 (cáncer cervical adulto), y la bacteria *Helicobacter pylori* (linfoma gástrico de células B). Otros microorganismos médicamente relevantes que pueden servir como antígenos en mamíferos y más particularmente en los seres humanos se describen ampliamente en la literatura, por ejemplo, C.G.A. Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1.983, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia.

**[0058]** En otra realización, el antígeno en el complejo de lípido catiónico comprende un antígeno derivado de o asociado con un patógeno, es decir, un antígeno microbiano. Como tal, en una realización, las vacunas de patógenos de la presente invención comprenden además al menos un epítipo de al menos un antígeno microbiano. Los patógenos que pueden ser objetivo de las vacunas en cuestión incluyen, pero no se limitan a, virus, bacterias, parásitos y hongos. En otra realización, las vacunas de patógenos de la presente invención comprenden además una pluralidad de epítopos de uno o más antígenos microbianos.

**[0059]** Los antígenos microbianos son útiles en los complejos de lípidos catiónicos y los procedimientos pueden ser inherentemente inmunogénicos o no inmunogénicos, o ligeramente inmunogénicos. Los antígenos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, antígenos sintético, recombinante, exógeno u homólogo, y los materiales antigénicos pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, polipéptidos, lipoproteínas, lipopéptidos, lípidos, glicolípidos, hidratos de carbono, ARN y ADN.

**[0060]** Los patógenos virales ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los virus que infectan a mamíferos, y más particularmente los seres humanos. Los ejemplos de virus incluyen, pero no están limitados a: Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, como el VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, como el VIH-LP); Picornaviridae (por ejemplo, virus de la poliomieltis, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); Calciviridae (por ejemplo, las cepas que causan la gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, los coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia); Coronaviridae (por ejemplo corona virus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus del ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la gripe); Bungaviridae (por ejemplo, virus Hantaan, virus del bonga, flebovirus y virus Nairo); Arena viridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus, y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvovirida (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus de polioma); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); virus del Herpes simplex Herpesviridae (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes; Poxviridae (virus variólico, virus vaccinia, virus de la viruela); e Iridoviridae (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y los virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1 = transmite internamente; clase 2 = transmite por vía parenteral (es decir, la hepatitis C); Norwalk y virus relacionados, y astrovirus)

[0061] Además, las bacterias gram negativas y gram positivas pueden ser las dianas de las composiciones y procedimientos en cuestión en animales vertebrados. Dichas bacterias gram positivas incluyen, pero no se limitan a, especies de *Pasteurella*, especies de estafilococos, y especies de estreptococos. Las bacterias gram negativas incluyen, pero no se limitan a, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a: *Helicobacter pylori*, *Borella burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Micobacterias* sps (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracelular*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A.), *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaeróbicas.), *Streptococcus pneumoniae*, especie *Campylobacter* patógena, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringers*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenuae*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

[0062] Los polipéptidos de patógenos bacterianos que pueden ser útiles como fuentes de antígenos microbianos en las presentes composiciones incluyen, pero no se limitan a, una proteína de membrana externa regulada por hierro ("IROMP"), una proteína de membrana externa ("OMP"), y una proteína A de *Aeromonis salmonicida* que causa furunculosis, proteína p57 de *Renibacterium salmoninarum* que causa la enfermedad bacteriana del riñón ("BKD"), antígeno asociado a superficie principal ("msa"), una citoxina expresada en superficie ("mpr"), una hemolisina expresada en superficie ("ish"), y un antígeno flagelar de *Yersiniosis*; una proteína extracelular ("ECP"), una proteína de membrana externa regulada por hierro ("IROMP"), y una proteína estructural de *Pasteurellosis*; una OMP y una proteína flagelar de *Vibrosis anguillarum* y *V. ordalii*; una proteína flagelar, una proteína OMP, aroA y purA de *Edwardsiellosis ictaluri* y *E. tarda*; y el antígeno de superficie de *Ichthyophthirius*; y una proteína estructural y reguladora de *Cytophaga columnari*; y una proteína estructural y reguladora de *Rickettsia*. Tales antígenos pueden aislarse o prepararse recombinantemente o por cualquier otro medio conocido en la técnica.

[0063] Ejemplos de patógenos adicionales incluyen, pero no se limitan a, los hongos que infectan a mamíferos, y más particularmente los seres humanos. Ejemplos de hongos incluyen, pero no se limitan a: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Ejemplos de parásitos infecciosos incluyen *Plasmodium*, tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax*. Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen *Toxoplasma gondii*. Los polipéptidos de un patógeno parásito incluyen, pero no se limitan a, los antígenos de superficie de *Ichthyophthirius*.

[0064] Otros microorganismos médicamente relevantes que sirven como antígenos en mamíferos y más particularmente los seres humanos se describen ampliamente en la literatura, por ejemplo, véase CG A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983, el contenido entero del cual se incorpora aquí como referencia. Además del tratamiento de enfermedades humanas infecciosas y patógenos humanos, las composiciones y procedimientos de la presente invención son útiles para el tratamiento de infecciones de mamíferos no humanos. Muchas vacunas para el tratamiento de mamíferos no humanos se describen en Bennett, K. Compendium of Veterinary Products, tercera ed. North American Compendios, Inc., 1995; ver también el documento WO 02/069369.

[0065] Los patógenos no humanos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, virus de tumor mamario de ratón ("MMTV"), virus del sarcoma de Rous ("RSV"), virus de la leucemia aviar ("ALV"), virus de la mieloblastosis aviar ("AMV"), virus de leucemia murina ("MLV"), virus de la leucemia felina ("FeLV"), virus del sarcoma murino ("MSV"), virus de la leucemia del mono gibón ("GALV"), virus de la necrosis del bazo ("SNV"), virus de reticuloendoteliosis ("RV"), virus de sarcoma de simio ("SSV"), virus del mono Mason-Pfizer ("MPMV"), retrovirus de simio tipo 1 ("SRV-1"), lentivirus, tales como el VIH-1, VIH-2, SIV, virus Visna, virus de inmunodeficiencia felina ("VIF"), y virus de la anemia infecciosa equina ("VAIE"), virus de la leucemia de células T, tales como HTLV-1, HTLV-II, virus de la leucemia de células T de simio ("STLV"), y virus de la leucemia bovina ("BLV"), y virus espumosos, tales como virus espumoso humano ("HFV"), virus espumoso del simio ("SFV") y virus espumoso bovino ("BFV").

[0066] En algunas realizaciones, "tratamiento", "tratar" y "que trata", como se usa en el presente documento con referencia a los agentes patógenos infecciosos, se refieren a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto a la infección con un patógeno o disminuye la probabilidad de que el sujeto se infecte con el patógeno; y/o el tratamiento después de que el sujeto se haya infectado con el fin de combatir la infección, por ejemplo, reducir o eliminar la infección o prevenir que empeore.

[0067] Los antígenos microbianos se pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, estos antígenos se pueden preparar directamente a partir de células virales y bacterianas, ya sea mediante la preparación de extractos crudos, purificando parcialmente los antígenos, o, alternativamente, por tecnología recombinante o por síntesis de novo de antígenos conocidos. El antígeno también puede estar en forma de un ácido nucleico que codifica un péptido antigénico en una forma adecuada para la expresión en un sujeto y la presentación al sistema inmunitario del sujeto inmunizado. Además, el antígeno puede ser un antígeno completo, o puede ser un

fragmento de un antígeno completo que comprende al menos un epítipo.

[0068] Con el fin de mejorar la incorporación del antígeno en las vesículas de lípidos catiónicos y también para mejorar la liberación a las células del sistema inmunitario, el antígeno puede ser modificado para aumentar su hidrofobicidad o la carga negativa en el antígeno. La hidrofobicidad de un antígeno se puede aumentar tal como, por ejemplo, mediante la conjugación a una cadena de lípidos o aminoácidos hidrófobos con el fin de mejorar es la solubilidad del antígeno en las cadenas de acilo hidrófobas del lípido catiónico, manteniendo las propiedades antigénicas de la molécula. El antígeno modificado puede ser una lipoproteína, un lipopéptido, una proteína o un péptido modificado con una secuencia de aminoácidos que tiene una mayor hidrofobicidad, y combinaciones de los mismos. El antígeno modificado puede tener un enlazador conjugado entre el lípido y el antígeno tal como, por ejemplo, una  $\alpha$  o  $\epsilon$ -palmitoil lisina, que puede estar conectado al antígeno a través de un enlazador dipéptido serina-serina. Como se discute en mayor detalle a continuación, el complejo DOTAP/E7-lipopéptido exhibió una mayor respuesta funcional de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno in vivo en comparación con la formulación DOTAP/E7. Además, el antígeno puede ser manipulado para aumentar su carga negativa mediante la alteración del tampón de formulación en la que el antígeno está encapsulado en los complejos de lípido catiónico o por unión covalente de restos aniónicos, tales como, por ejemplo, los aminoácidos aniónicos al antígeno.

[0069] Como se ha demostrado en el Ejemplo 1 (a continuación) la inmunogenicidad del antígeno E7 se incrementó mediante la modificación covalente del antígeno. Era posible unir covalentemente al antígeno una secuencia de aminoácidos de tal manera que la secuencia de aminoácidos del antígeno resultante no se encuentra en la proteína parental de la que se deriva el antígeno. Los estudios se realizaron para demostrar que el antígeno modificado proporcionaba una afinidad de unión a MHC de clase I superior en comparación con el antígeno nativo. Esta afinidad de unión superior, como se ha demostrado, se tradujo a la generación de una respuesta inmunitaria contra el tumor in vivo superior contra los tumores TC1 VPH positivo. La presente invención se entenderá adicionalmente a la luz de los siguientes ejemplos.

Ejemplos

#### Ejemplo 1

### **LA ESTIMULACIÓN EFICAZ DEL SISTEMA INMUNITARIO Y LIBERACIÓN DE ANTÍGENOS A LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS MEDIANTE COMPOSICIONES DE DOSIS ESPECÍFICA DE LÍPIDOS CATIÓNICOS CONDUCE A UNA RESPUESTA INMUNITARIA POTENTE EN LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD**

#### **1. Preparación de liposomas para su uso como estimulantes del sistema inmunitario incluyendo lípido catiónico (por ejemplo, DOTAP) solo, o liposomas catiónicos que incorporan un antígeno (por ejemplo, antígeno de péptido E7 proteína VPH).**

[0070] Se utilizó agua de calidad de cultivo celular (disponible comercialmente de Cambrex of Walkersville, MD) o solución salina tamponada con fosfato en todos los procedimientos de preparación de liposomas. El antígeno E7 fue el epítipo de CTL limitado con H-2D<sup>b</sup> (aminoácido 49-57, RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]) derivado de la proteína E7 de VPH 16 (sintetizada por la Universidad de Pittsburgh, Instituto de Medicina Molecular, Pittsburgh, PA).

[0071] Los liposomas utilizados en estos estudios se fabricaron usando películas lipídicas. Las películas lipídicas se realizaron en viales de vidrio mediante (1) disolución de los lípidos en cloroformo, y (2) evaporación de la solución de cloroformo bajo una corriente constante de gas nitrógeno seco. Los rastros de disolvente orgánico se eliminaron manteniendo las películas al vacío durante la noche. Las películas lipídicas se hidrataron a continuación durante 12 h mediante la adición de la cantidad requerida de agua o tampón para conseguir una concentración final de 10 mg/mL. Las suspensiones se sonicaron a continuación en un sonicador tipo baño durante 10 min seguido por extrusión a través de filtros de membrana de 400, 200 y 100 nm (disponibles comercialmente de Hamilton Co., Reno, NV) y se almacenaron a 4°C. Para la preparación de DOTAP/E7, la película lipídica se rehidrató por una solución acuosa de péptido E7. También pueden utilizarse otros procedimientos utilizados en la preparación general de liposomas que son bien conocidos para los expertos en la técnica.

#### **2. Producción de IL-12 y TNF- $\alpha$ por las células de los ganglios linfáticos y las células dendríticas se estimula después del tratamiento con lípidos catiónicos**

[0072] Con el fin de dilucidar la vía inmunoestimulante del lípido catiónico DOTAP y caracterizar adicionalmente su actividad inmunoestimulante es importante evaluar si DOTAP puede inducir la producción de citocinas Th1 adecuada para mejorar la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, hemos examinado la producción de citocinas por células dendríticas derivadas de médula ósea ("BMDC") después de la estimulación con DOTAP. Después de seis días de cultivo in vitro en presencia de MGM-CSF recombinante y mL-4, se estimularon BMDC (10<sup>6</sup> células en 2 ml por pocillo) con medio de control, liposomas de DOTAP, LPD (ADN complejado con lípido catiónico y protamina) o lipopolisacárido (LPS) en 0,1  $\mu$ g/mL durante 20 horas a 37°C. La producción de IL-12 y TNF- $\alpha$  en el sobrenadante se analizó por un equipo ELISA BD. LPD y LPS se usaron como controles positivos. El ADN bacteriano en LPD

contiene motivos CpG conocidos por activar el sistema inmunitario a través de receptores de tipo Toll y estimular TNF- $\alpha$ . El sobrenadante de cultivo se recogió y los niveles de citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$  se evaluaron mediante ELISA. En la Figura 1, la producción de IL-12, pero no TNF- $\alpha$ , aumentó en respuesta a la concentración de DOTAP. Esto indica que, además de las células dendríticas, otros tipos de células, por ejemplo células T, también pueden estar implicadas en la producción de citocinas Th 1 estimulada por liposoma con DOTAP observada in vivo. Además, el hecho de que los lípidos catiónicos no indujeron niveles significativos de la citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  sugiere que la vía inmunoestimulador puede ser independiente de la vía de los receptores de tipo Toll.

### 3. La respuesta inmunitaria de CTL específica de antígeno es inducida de una manera dependiente de la dosis de lípidos por un complejo lípido catiónico/antígeno.

**[0073]** Se inmunizaron ratones C57BL/6 hembra con formulaciones de DOTAP/E7 en los días 0 y 7. Se utilizaron diversas concentraciones de DOTAP, sin embargo la concentración del antígeno E7 de VPH 16 se mantuvo a una dosis de 10  $\mu$ g. El antígeno E7 fue el epítipo de CTL limitado con H-2D<sup>b</sup> (aminoácido 49-57, RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO. 1) derivada de proteína E7 de VPH 16. Siete días después de la última inmunización, los ratones se sacrificaron y los esplenocitos se recogieron y disociaron. Después de la eliminación de RBC, la población de esplenocitos total (células respondedoras) se estimuló durante 5 días con el péptido E7 (10  $\mu$ g/ml) en presencia de 40 U/ml de IL-2 recombinante (disponible comercialmente de los R&D Systems de Minneapolis, MN) en medio completo RPMI-1640. Después de la expansión in vitro de CTL, las células respondedoras estaban listas para ser utilizadas como efectores de CTL. La línea de células TC-1 se utilizó como células diana en este ensayo. Las células de TC-1 son células epiteliales de pulmón de ratón C57BL/6 transformadas con oncogenes E6 y E7 de VPH 16 y la H-ras activada. Para discriminar entre los efectores y diana, las células TC-1 se etiquetaron con PKH-67 (disponible comercialmente de Sigmaof St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los efectores y dianas marcadas se sembraron en placas de 96 pocillos en diversas proporciones efector:diana (E:T) y las reacciones de lisis se llevaron a cabo durante 4 horas a 37°C. Las células se recogieron a continuación y se tiñeron con yoduro de propidio (PI) para el análisis en un citómetro de flujo digital BD FACSCanto (disponible comercialmente de BD Biosciences de San Diego, CA). El porcentaje de lisis específica de E7 se determinó mediante el porcentaje de células positivas PI dentro de la región positiva de FL1 (PKH-67).

**[0074]** Volviendo ahora a la Figura 2, se observa que los ratones que recibieron el DOTAP/E7 a 100 nmoles de DOTAP exhibieron una actividad significativa de CTL dando lugar a la destrucción específica de las células TC-1 mientras que los ratones que recibieron DOTAP/E7 a 600 nmoles de DOTAP mostraron un efecto de destrucción significativamente reducido, lo que indica un efecto dosis-respuesta del lípido catiónico. Los ratones que recibieron DOTAP/E7 a 15 nmoles de DOTAP no dieron lugar a la actividad de CTL que era significativamente diferente de los ratones de control tratados con PBS. Se confirmó que esta destrucción era específica de E7 mediante la incubación de células efectoras de los grupos que recibieron la dosis óptima de DOTAP con células BL6 negativas de E7 de VPH como dianas, y dio como resultado la muerte celular insignificante. Además de una destrucción mediada por CTL, también se investigó citotoxicidad mediada por células asesinas naturales ("NK"). Las células NK son capaces de destruir las células tumorales sin la inmunización deliberada o activación y también juegan un papel importante en respuestas inmunes innatas [Wu, J y Lanier, LL, Natural killer cells and cancer. Adv Cancer Res 90: 127 (2003); y Lodoen, MB, y Lanier, LL, Natural killer cells as an initial defense against pathogens. Curr Opin Immunol 18: 391 (2006)]. Los ratones que recibieron complejo DOTAP/E7, en varias dosis de DOTAP, exhibieron una destrucción significativa contra las células YAC-1, una diana susceptible de NK.

### 4. La administración de un complejo de lípido catiónico/antígeno induce la producción de células T CD8+ y CD4+ in vivo de una manera dependiente de la dosis de lípidos y la migración en el micromedio tumores positivos de E-7

**[0075]** Con el fin de entender si la formulación óptima de DOTAP/E7 induce la producción de linfocitos T (células T) y si los linfocitos T emigrarían efectivamente al sitio de las células que expresan el antígeno E7, se realizó un examen inmunohistoquímico de linfocitos T infiltrantes en tumores (Figura 3). Se adquirieron ratones hembras C57BL/6 de 6-7 semanas de edad de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) y se utilizaron en todos los estudios de animales. Los tumores subcutáneos positivos de VPH se establecieron mediante la inyección de las células TC-1 (10<sup>5</sup> células) en el flanco recortado de pelo del ratón en el día 0. En el día 6, los ratones (n = 6-12) fueron inyectados subcutáneamente con 150  $\mu$ l de formulaciones seleccionadas de DOTAP/E7 (15, 100, 600 nmol), conteniendo cada una 10  $\mu$ g del péptido E7.

**[0076]** Los tumores positivos de VPH sólidos fueron extirpados de los ratones y se diseccionaron en el día 14 y embebieron en compuesto Tissue-Tek® OCT (disponible comercialmente de Sakura Finetek de Torrance, CA) (seguido por preparación por criosección). Las muestras se cortaron en secciones de 8  $\mu$ m de grosor por un criostato (disponible comercialmente de H/I Hacker Instrumentos & Industries Inc.). Los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 conjugados a FITC (disponible comercialmente en Miltenyi Biotec Inc. de Auburn, CA) se utilizaron para determinar las células T infiltrantes de tumor seguido de contratiñación de los núcleos con DAPI. Las imágenes de las secciones fueron tomadas con un microscopio confocal Leica SP2.

[0077] Se realizaron ensayos TUNEL usando un equipo TACS™ TdT (disponible comercialmente de R & D Systems de Minneapolis, MN) y se revelaron con DAB según las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron imágenes de las muestras con un microscopio Nikon Microphot SA.

5 [0078] Como se muestra en la Figura 3, una alta proporción de linfocitos T CD8+ (~5%) se encontraron en ratones que recibieron DOTAP/E7 a 100 nmoles (Figura 3B) en comparación con los ratones no tratados (Figura 3A) y los que recibieron composición DOTAP a dosis alta (600 nmol, Figura 3C). Un resultado similar se encontró para las células T CD4+, (Figuras 3E-F). El ensayo de TUNEL para determinar la apoptosis se realizó también en algunas crio-secciones tumorales. En la Figura 3H, después de tratar los ratones con la dosis de 100 nmol de lípido en el complejo DOTAP/E7, se observó una reacción positiva TUNEL en los núcleos condensados y fragmentados de las células tumorales de los ratones en comparación con los ratones no tratados (Figura 3G) y un grupo con una dosis alta en lípidos (Figura 3I), que exhibió las células normales y tumorales vitales. Se observa un efecto de dosis respuesta similar de dosis de lípido catiónico en la producción de linfocitos T al efecto de dosis respuesta en la respuesta de CTL específica de antígeno descrita anteriormente en la sección 3 titulada "La respuesta inmunitaria de CTL específica de antígeno es inducida de una manera dependiente de la dosis de lípidos por un complejo lípido catiónico/antígeno."

### 5. Administración de un complejo de lípido catiónico/antígeno induce inmunidad humoral.

20 [0079] La Figura 4 muestra los resultados de la inyección de ratones con un complejo de lípido catiónico/antígeno que contiene DOTAP y el antígeno de proteína, ovoalbúmina. Los ratones se evaluaron por la capacidad del complejo para estimular la actividad de células B y para inducir la producción de anticuerpos, también conocida como la respuesta inmunitaria humoral. La respuesta humoral se evaluó mediante el control de la formación de anticuerpos IgG. Como se ilustra en la Figura 4, los complejos DOTAP/ovoalbúmina provocaron una respuesta humoral de una manera dependiente de la dosis. Estos datos sugieren que las formulaciones de DOTAP se pueden utilizar para estimular tanto las respuestas inmunes celulares como humorales.

### 6. Administración de un complejo de lípido catiónico/antígeno reduce las poblaciones de células T reguladoras de una manera dependiente de la dosis de lípidos.

30 [0080] Se piensa que las células T reguladoras disminuyen la inmunidad de las células T a antígenos asociados a tumores y son el principal obstáculo que templan la inmunoterapia con éxito y la vacunación activa. Por lo tanto, se investigó la capacidad de DOTAP/E7 en una formulación de vacuna terapéutica en su dosis óptima para romper la tolerancia inmunitaria mantenida por células T reguladoras en ratones portadores de tumores, mejorando así la inmunidad de células T a antígenos asociados a tumores. Todos los anticuerpos anti-ratón utilizados para el análisis de citometría de flujo se adquirieron de y están disponibles comercialmente de BD Pharmingen (San Diego, CA) o eBioscience, Inc. (San Diego, CA). Las células de bazo se recogieron y se disociaron mediante el uso de 1 mg/ml de colagenasa y un filtro de células de 70 µm. Después de la extracción de los glóbulos rojos (RBC), se tiñeron suspensiones de células individuales con anticuerpos monoclonales anti-CD4 marcado con fluorescencia (RM4-5), anti-CD8a (53-6,7), anti-CD3e (145-2c11), anti-NK1.1 (pk136) y anti-CD25 (pc61.5) durante 30 minutos a 4°C. Después de la fijación y permeabilización utilizando el kit Cytofix/Cytoperm<sup>(R)</sup> (BD Pharmingen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, las células se tiñeron con anti-Foxp3 (FJK-16s) en 50 µl de tampón Perm/Wash<sup>(R)</sup> durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces más en tampón Perm/Wash<sup>(R)</sup> y, finalmente, se resuspendieron en 300 µl de tampón de tinción y se analizaron en un citómetro de flujo digital BD FACSCanto (comercialmente disponible de BD Biosciences de San Diego, CA). Como se muestra en la Figura 5, las células de bazo recogidas de ratones que recibieron el complejo DOTAP/E7 (100 nmol DOTAP), pero no la dosis alta (600 nmol DOTAP), los animales exhibieron cantidades más bajas de las subpoblaciones de células T-reg (Foxp3+, CD25+ y CD25+/Foxp3+) en comparación con ratones portadores de tumor no tratados.

50 [0081] En la Tabla 1 se resumen diez experimentos representativos para el análisis de T-reg. La población de células T CD4+ aumentó significativamente en las células de bazo después de que los ratones recibieron tratamiento óptimo de DOTAP/E7, un aumento similar también se encontró en las células T CD8+ (datos no presentados). Además, una disminución significativa de las poblaciones de T-reg (CD4+/Foxp3+ y CD4+/CD25+/Foxp3+) se encontró en este grupo de tratamiento. Fue especialmente evidente que la actividad antitumoral reducida de DOTAP/E7 a dosis alta de DOTAP se asoció con una mayor población de células T-reg. Se observa de nuevo un efecto dosis-respuesta del lípido catiónico. Este resultado indica que la composición de lípido catiónico utilizada en la inmunoterapia en una dosis óptima de lípidos es capaz de mejorar posiblemente la respuesta inmunitaria observada con el cáncer específico al romper la tolerancia en ratones portadores de tumores y de estimular la proliferación de linfocitos T funcionales CD4+ y CD8+ específicos de antígeno, a la vez que se suprime la población de células T-reg.

**Tabla 1:** Porcentaje de subpoblación Treg en células de bazo en ratones portadores de tumores después del tratamiento con complejo de DOTAP/E7

65

	CD4+	CD4+/Foxp3+	CD4+/CD25+/Foxp3+
tratado con PBS	18.8±2.9%	13.1±0.1%	9.5±0.5%
DOTAP/E7 15 nmol	21.7±1.3%	12.0±1.0%	8.4±0.2%
DOTAP/E7 100 nmol	25.1±2.4%	11.4±0.2%	7.2±0.2%
DOTAP/E7 600 nmol	22.1±2.1%	14.3±2.3%	9.5±0.9%
LPD/E7 100 nmol	26.8±2.2%	11.0±0.1%	7.4±0.1%

\*\* p <0,01, \*\*\*p <0,001 (n = 10 por grupo)

**10. Cinética de crecimiento de tumores Tc-1 VPH-positivo en ratones tratados con composiciones DOTAP/E7 en dosis variables de DOTAP.**

[0082] En la Figura 6, los ratones fueron inyectados subcutáneamente con células TC-1 en día 0 con el fin de inducir el crecimiento de tumores VPH-positivo. Los ratones recibieron composiciones DOTAP/E7 que contienen 10 µg de péptido E7 por vía subcutánea en el lado opuesto del abdomen en el día 6. La concentración de lípidos DOTAP en el complejo varió de 3 a 600 nmoles (3, 15, 30, 75, 150, 300 y 600 nmoles). La dosis baja de DOTAP (15 nmol) mostró un efecto parcial inhibición del tumor (P <0,05) en comparación con el control sin tratar en el día 23, mientras que DOTAP a 30, 150 o 300 nmol exhibió una eficacia mejorada (P <0,01). DOTAP a 75 nmol mostró el efecto de regresión tumoral más significativo (P <0,001). Una vez más, los ratones que recibieron una dosis alta de DOTAP (600 nmol) no mostraron actividad antitumoral, lo que confirma que los liposomas con DOTAP a una dosis alta podría haber inducido una regulación negativa de la respuesta inmunitaria. Además, los liposomas con DOTAP en la dosis de 100 nmol, pero sin péptido E7, no mostró una inhibición significativa del crecimiento del tumor, indicando que el efecto antitumoral era específico de antígeno.

**11. El complejo DOTAP/E7 es captado principalmente por células dendríticas después de la inyección e induce la activación de células dendríticas y la migración a los ganglios linfáticos de drenaje.**

[0083] Ratones sin tratar (n = 4-6) fueron inyectados con control PBS (Figura 7 A, C y E) o DOTAP/E7 que contiene 100 nmoles de lípidos totales con 0,5% de 1-oleoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-3-trimetilamonio propano] ("NBD-DOTAP") (Figura 7 B, D y F). A las 4 h después de la inyección, se prepararon y se tiñeron con anticuerpos apropiados a marcadores de superficie células de ganglios linfáticos de drenaje. La co-expresión de NBD y CD11c (Figura 7 A y B) o CD86 (Figura 7 C y D) se analizó dentro de las células de ganglios linfáticos totales, mientras que la co-expresión de NBD y CD8 (Figura 7 E y F) se canalizó y se analizó dentro de la población de CD3<sup>+</sup>. Los números representan los porcentajes de células en los cuadrantes. Las células de ganglios linfáticos de drenaje se recogieron y se analizaron por citometría de flujo en diferentes puntos temporales después de la inyección. El número de células CD11c<sup>+</sup> entre las células totales de ganglios linfáticos se incrementó en más de 2,5 veces en comparación con los ratones no tratados 4 h después de inyección con NBD-DOTAP/E7 (Figura 7 A y B). Se investigó la expresión de la molécula coestimuladora, CD86, en la células NBD<sup>+</sup> y las células NBD<sup>+</sup> mostraron altos niveles de CD86 (Figura 7 C y D), lo que indica que la inyección subcutánea de DOTAP induce la activación de células dendríticas. La captación de NBD por otros tipos de células, tales como linfocitos T, también fue investigada por cotinción con anticuerpos anti-CD3, CD4 y CD8. Las células CD3<sup>+</sup> se canalizaron y se analizaron en la (Figura 7 E y F) y no mostraron captación de NBD después de la inyección de NBD-DOTAP. Los resultados demostraron claramente que NBD-DOTAP es captado principalmente por células dendríticas (~80%) poco después de la inmunización y DOTAP induce la migración de células dendríticas activadas a ganglios linfáticos de drenaje, lo que da lugar a interacciones célula dendrítica-célula-Ty provoca fuertes respuestas de las células T.

**12. La inmunización con el complejo DOTAP/E7 formulado con una dosis particularmente ventajosa de DOTAP provoca células T CD8<sup>+</sup> funcionales.**

[0084] IFN- $\gamma$  secretadas por las células T activadas o células NK se sabe que juegan papeles importantes en la respuesta inmunitaria de tipo Th1, así como en la inducción de respuesta de los CTL. Para evaluar si los linfocitos T CD8<sup>+</sup> funcionales inducidos por la vacunación de DOTAP/E7 serían capaces de producir la citocina esencial, las células de bazo de ratones inmunizados o de control se aislaron una semana después de la inmunización final y se incubaron con 5  $\mu$ g/ml de péptido E7 o sin péptido durante 6 h seguido de tinción intracelular de IFN- $\gamma$ . Como se representa en la figura 8, el número de células CD8<sup>+</sup> productoras IFN- $\gamma$  fue significativamente mayor en los ratones que recibieron E7 formulada en la dosis de lípidos óptima de control positivo DOTAP y LPD que el grupo de control negativo. La producción de IFN- $\gamma$  por las células CD8<sup>+</sup> se produjo de una manera específica de E7. Estos resultados muestran que DOTAP en dosis óptima es un adyuvante de vacuna potente para la inducción de CTL, así como la generación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  en los órganos linfoides sistémicos.

### 13. Comparación de la eficacia antitumoral de los complejos de lípido catiónico/E7 con la actividad antitumoral de E7 formulado en adyuvantes principales conocidos por inducir la actividad de CTL específica de antígeno.

[0085] Para comparar la eficacia de las formulaciones de lípidos catiónicos/E7 con otros adyuvantes para inducir una respuesta inmunitaria a un tumor, se trataron 6-12 ratones portadores de tumores por formulación, seis días después de establecer los tumores, con liposomas formulados con péptido E7 compuestos de (1) lípido catiónico (DOTAP, DOEPC y DOTMA), a la composición de dosis de 100 nmol de lípido catiónico, (2) lípido aniónico (DOPG), o (3) adyuvantes (adyuvante completo de Freund ("CFA") o CpG ODN1826). En la figura 9, los ratones que recibieron ambos adyuvantes, así como las formulaciones de lípidos catiónicos, mostraron una inhibición efectiva de crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control en el día 26. Los ratones que recibieron el lípido aniónico DOPG/E7 no mostraron regresión del tumor. Los ratones que recibieron formulaciones DOTAP/E7 y DOEPC óptimas exhibieron una actividad anticáncer mejor ( $p < 0,01$ ) en comparación con los que recibieron formulaciones CpG/E7 o CFA/E7. Los ratones que recibieron DOTMA/E7 óptima también mostraron una mejor actividad anticáncer en comparación con los que recibieron formulaciones CpG/E7 o CFA/E7.

### 14. Los lípidos catiónicos inducen la producción de ROS de una manera dependiente de la dosis, lo que resulta en la muerte de células dendríticas y la reducción del efecto inmunoestimulador en dosis altas

[0086] Los ganglios linfáticos de drenaje de ratones ( $n = 4$  por condición) que recibieron inyecciones subcutáneas de DOTAP/E7 que contiene 0, 15, 100 o 600 nmoles de lípidos se aislaron a las 2 horas después de la inyección. Las células totales de ganglios linfáticos se incubaron con el compuesto DCFH-DA a 37°C durante 30 min antes del análisis citométrico de flujo. Las células granulares grandes se canalizaron y se analizaron para la expresión de ROS donde el producto fluorescente DCF fue generado en la presencia de ROS. Los porcentajes relativos de células con señales positivas de ROS se enumeran en la figura 10A. La citotoxicidad en el ganglio linfático de drenaje se llevó a cabo mediante la recogida de células a las 10 h después de la inyección de DOTAP/E7 y la tinción con anticuerpos apropiados. En la figura 10b, los porcentajes relativos de células muertas en las células dendríticas (DC) se muestran en el gráfico de líneas ( ) y el gráfico de barras representa el número de DC vivas por 10<sup>5</sup> células LN. Los números se normalizaron a los controles no tratados y se analizaron estadísticamente (\*\*  $p < 0,01$ ). Las células de los ratones que recibieron DOTAP 15 nmol mostraron un nivel basal de la producción de ROS (<5%), mientras que las células de ratones inyectados con dosis DOTAP de 100 nmol produjeron niveles relativamente más altos de ROS (~20%). Sorprendentemente, la mayoría de las células granulares grandes (~80%) del grupo de DOTAP 600 nmol mostró una señal de ROS positiva. A las 10 h después de la inyección subcutánea, el total de células de ganglios linfáticos se recogieron y se analizaron para la muerte celular por citometría de flujo (figura 10B). El porcentaje de muerte celular (yoduro de propidio positivo) dentro de la población de CD11c<sup>+</sup> (célula dendrítica) aumentó con la dosis de lípidos y se correlacionó positivamente con la producción de ROS mostrada en la figura 10A. El porcentaje de muerte celular en la población de DC era aproximadamente dos veces más alto para el grupo inyectado con dosis altas de DOTAP en comparación con el grupo de control no tratado. También se muestra en la figura 10B los números de células por células CD11c<sup>+</sup> vivas por 10<sup>5</sup> células de ganglios linfáticos en función de la dosis de lípido DOTAP. Los ratones que recibieron DOTAP/E7 con lípido a 100 nmol exhibieron la cantidad más alta (\*\*  $p < 0,01$ ) de las células dendríticas vivas entre los otros grupos de tratamiento. Los ganglios linfáticos de drenaje pesaban más 2 días después de que los ratones recibieron la formulación óptima. Colectivamente, los resultados indican que la producción de ROS inducida por la alta DOTAP dosis puede causar la muerte de células dendríticas.

[0087] Además, como se ilustra en la figura 10C, la densidad de la carga catiónica es importante para el efecto inmunoestimulador y la consiguiente actividad anticáncer. Tanto la actividad contra el cáncer como la generación de ROS se ve disminuida por la coformulación de altas proporciones de un lípido inerte neutro, DOPC, con el complejo lípido catiónico/E7, dando lugar a una disminución de la densidad de carga catiónica.

### 15. Lipidación de un antígeno peptídico da lugar a la mejora de la encapsulación en el complejo de lípido catiónico/antígeno

[0088] Se prepararon complejos de lípido catiónico/antígeno como se ha descrito anteriormente. La eficiencia de

encapsulación del péptido se determina por el porcentaje del péptido unido a liposoma usando el kit de cuantificación de péptidos LavaPep<sup>(R)</sup> (disponible comercialmente de Fluorotechnics de Sydney, Australia). Dado que lipopéptido no incorporada se agregaba y no podía pasar el filtro de exclusión, el lipopéptido incorporado se midió como la cantidad asociada a los liposomas extruidos en presencia de 1% SDS y se expresa como la media  $\pm$  SD (n = 3). Para péptido soluble en agua, tal como E7 nativa y KSS-E7, el péptido no unido se separó del complejo por un dispositivo de filtración centrífuga Microcon<sup>®</sup> (disponible comercialmente de Millipore de Bedford, MA). La concentración del péptido no unido se midió usando LavaPep<sup>(R)</sup> de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La eficiencia de encapsulación se determinó como (1-% péptido no unido) y se describió en la Tabla 2 como la media  $\pm$  SD (n = 3).

**Tabla 2:** Composición de los lipopéptidos sintéticos y comparación de la eficiencia de atrapamiento de antígeno peptídico en en liposomas con DOTAP en relación molar lipopéptido:DOTAP = 1:40

Nombre del péptido	Lípido	Composición peptídica		Eficiencia de atrapamiento (%)
		Seq. espaciador	Epítipo de CTL	
E7 nativo	-	-	RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]	27.1 $\pm$ 5.8 %
KSS-E7	-	KSS	RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]	26.4 $\pm$ 6.1 %
PA-E7	Palmitico	-	RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]	84.5 $\pm$ 6.4 %
$\alpha$ -PA-KSS-E7	Palmitico	KSS	RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]	92.8 $\pm$ 4.2 %
$\varepsilon$ -PA-KSS-E7	Palmitico	KSS	RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]	94.1 $\pm$ 4.6 %

## 16. Eficacia antitumoral del complejo lípido catiónico/antígeno mejora con la eficiencia de encapsulación de antígeno

[0089] A ratones portadores de tumor TC-1 (8-12 por grupo) se les dio un tratamiento de dosis única en el día 6 (después del establecimiento del tumor) con DOTAP/E7 (que contiene 10 nmol o 5 nmol de péptido) o formulaciones DOTAP/lipopéptido-E7 (que contiene 5 nmol de antígeno peptídico). Se usaron composiciones de 100 nmol de lípido catiónico en cada caso. DOTAP/E7 con 5 nmol de péptido no mostró una actividad antitumoral significativa. Por el contrario, ambos lipopéptidos-E7 (posición  $\alpha$  o  $\varepsilon$ ) a 5 nmol de antígeno, cuando se formularon en liposomas con DOTAP, mostraron un efecto terapéutico mejorado significativo (\*\* p <0,01) en comparación con DOTAP con el antígeno E7 nativo a 5 nmol (Figura 11). La actividad antitumoral provocada por los lipopéptidos fue similar a la de DOTAP/E7 con 10 nmol. PA-E7, que es un péptido E7 palmitoilado (sin espaciado KSS), cuando se formula en liposoma DOTAP, no mostró una actividad antitumoral mejorada como se ve en otras formulaciones de lipopéptidos, probablemente debido al epítipo que se oculta por unir directamente un ácido graso al péptido. La actividad antitumoral se mejora con DOTAP/lipopéptido E7 debido, al menos en parte, al aumento de la eficiencia de encapsulación del antígeno. Esto demuestra que al aumentar la hidrofobicidad del antígeno, la incorporación en el complejo se incrementa, lo que resulta en un aumento de la respuesta inmunitaria específica de antígeno. Los ratones tratados con dextrosa (5%) se utilizaron como control negativo.

## 17. Complejo lípido catiónico/antígeno lipidado aumenta la respuesta de CTL específica de antígeno

[0090] La inmunización con DOTAP/lipopéptido E7 aumentó la producción de células CD8<sup>+</sup> T secretoras de IFN- $\gamma$ . Los ratones fueron inyectados con las diversas formulaciones y siete días después de la última inmunización, se aislaron las células del bazo de ratones inmunizados. Las células se estimularon *in vitro* con o sin péptido E7 (5  $\mu$ g/ml) durante 6 h, y se tiñeron con un marcador CD8 de superficie y una citocina IFN- $\gamma$  intracelular antes del análisis FACS. El porcentaje de células positivas dobles CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  por 10<sup>4</sup> CD8<sup>+</sup> total de cada grupo de tratamiento se muestra en la figura 12 como media  $\pm$  SD y se analizaron estadísticamente mediante la prueba t apareada (\*\* p <0,01, n = 4).

[0091] Para evaluar la respuesta inmunitaria específica epítipo inducida por la vacunación de DOTAP/lipopéptido E7, se analizaron las células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$ . Se aislaron células de bazo de ratones inmunizados o de control una semana después de la inmunización final y se estimularon con 5  $\mu$ g/ml de péptido E7 o sin péptido seguido de la tinción intracelular para IFN- $\gamma$ . Como se describe en la Tabla 2 (anterior) y representado en la Figura 12, la incorporación de antígeno en el complejo mejoró significativamente en el caso del antígeno de lipopéptido, y el número de células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  era, por tanto, significativamente mayor en los ratones que

recibieron 5 nmol de  $\epsilon$ -PA-KSS-E7 formulada en los liposomas con DOTAP que los de 10 y 5 nmoles del E7 nativo (\*\* p < 0,01). Una vez más, KSS-E7 mostró un resultado superior que el E7 nativa a la misma cantidad de antígeno. La producción de IFN- $\gamma$  por las células CD8<sup>+</sup> era específica de E7, ya que las células no pulsadas mostraron sólo nivel de base de la citocina. Estos resultados mostraron que la incorporación de lipopéptidos-E7 con el aumento de la hidrofobicidad y la eficiencia de la formación de complejos en los liposomas DOTAP claramente mejoraron la eficacia del complejo de lípido catiónico/antígeno y aumentaron de la cantidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  en el órgano linfoide.

**18. Antigenicidad del antígeno peptídico se mejora mediante la unión de una secuencia de aminoácidos corta no relacionada con secuencias existentes en la secuencia de péptido parental, conduciendo a la mejora de la eficacia antitumoral de un complejo lípido/antígeno que consiste en DOTAP y KSS-péptido E7**

[0092] El péptido E7-KSS (lisina-serina-serina) sin la cadena lipídica unida, cuando se formula en lípido catiónico DOTAP, proporcionó una respuesta inmunitaria mucho más fuerte que el péptido E7 nativo formulado en el complejo con DOTAP (Figuras 11 y 12), a pesar de la eficiencia de encapsulación comparable a la del E7 nativo (Tabla 2). Se sabe que la capacidad de un péptido para unirse y estabilizar moléculas MHC de clase I se puede correlacionar directamente con su capacidad para inducir respuestas de CTL específicas [Feltkamp, MC et al, Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. Eur J Immunol, 23, (9), 2242-2249 (1993)]. Se evaluó la afinidad de unión a MHC de clase I de los péptidos E7 nativos y alargados con KSS. Se incubaron células RMA-S, una línea celular de linfoma de ratón, a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml durante la noche a 27°C con péptido E7 nativo o KSS-E7 (10  $\mu$ M). Las células incubadas con medio se utilizaron como control. Las células fueron incubadas a continuación durante 2 horas a 37°C. Después de los lavados, las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales conjugados fluorescentemente contra moléculas H-2D<sup>b</sup> o H-2K<sup>b</sup> en la superficie celular antes del análisis por citometría de flujo. El péptido E7 (aa. 49-57) es un epítipo conocido restringido a H-2D<sup>b</sup> y causó una regulación por incremento de cuatro veces de moléculas H-2D<sup>b</sup> sobre células RMA-S en comparación con el control (Figura 13). Se observó un aumento de 8 veces en la fluorescencia media para el péptido KSS-E7. No se detectó regulación por incremento de moléculas H-2K<sup>b</sup> en células RMA-S después de la incubación con péptido E7 o péptido KSS-E7. Los resultados demuestran que KSS-E7 presenta una afinidad de unión mejorada a moléculas H-2D<sup>b</sup> que el péptido E7 nativo, lo que condujo a una actividad antitumoral superior cuando se formula en el complejo de DOTAP/antígeno.

[0093] El estudio demuestra que la inmunogenicidad de un péptido inmunogénico puede ser mejorada o alterada mediante la unión de una secuencia corta de aminoácidos no relacionada con la secuencia de la proteína parental natural de la que deriva el péptido inmunogénico.

**19. El efecto de la interacción iónica entre el lípido catiónico y el antígeno en la eficiencia de la incorporación de antígeno en los complejos de lípido catiónico/antígeno**

[0094] Para estos estudios se solubilizó DOTAP en cloroformo y se prepararon películas secas a partir de 7 mg de DOTAP en tubos de vidrio de 16 x 100 mm. Después de secar al vacío, los liposomas se hidrataron con 0,5 ml del antígeno (E7 de VPH 16, aminoácidos 11-20, YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO. 2) en (1) un medio de alta fuerza iónica (fosfato de sodio 15 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0), o (2) un medio de baja fuerza iónica (0,5 ml del antígeno en fosfato de sodio 15 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0). El tamaño de partícula era 100 nm.

[0095] La eficiencia de encapsulación del antígeno se analizó mediante el filtrado de las partículas sobre un microfiltro 100K Nanosep (comercialmente disponible de Pall Corp. de Ann Arbor, MI), durante 20 minutos a 5000 rpm en una microcentrífuga. La concentración de antígeno en el tampón de partida y en el flujo de los filtros de Nanosep (péptido no unido) se analizó por cromatografía de fase inversa para determinar el porcentaje de encapsulación. La eficiencia de encapsulación se calculó como (1 - % de péptido no incorporado) como se observa en la Tabla

**Tabla 3:** Encapsulación de antígeno en el complejo de lípido catiónico/antígeno se ve aumentada al aumentar la carga negativa en el antígeno.

Tampón de formulación	Porcentaje de encapsulación
Medio de fuerza iónica elevada, fosfato de sodio 20 mM NaCl 150 mM, pH 7,0	22%
Medio de fuerza iónica baja, fosfato de sodio 20 mM NaCl 50 mM, pH 7,0	53%

[0096] Las interacciones iónicas se reducen al mínimo en el medio de alta fuerza iónica. Los medios de mayor fuerza iónica disminuyen efectivamente la carga negativa mediante el aumento de la fuerza iónica de la solución tampón de formulación (NaCl 150 mM), las interacciones iónicas entre el antígeno cargado negativamente y el lípido cargado positivamente se minimizaron dando lugar a una reducción de la encapsulación. Al reducir la fuerza iónica, las interacciones iónicas entre el lípido y el antígeno aumentaron conduciendo a una mayor incorporación del

antígeno en el complejo. Por lo tanto, la eficiencia de incorporación en el complejo de lípido catiónico/antígeno puede aumentar mediante la manipulación del antígeno para aumentar la carga negativa mediante la alteración de la solución tampón de formulación o uniendo un compuesto aniónico o polianiónico al antígeno.

## 5 DISCUSIÓN

[0097] Tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 7.303.881, una amplia clase de lípidos catiónicos puede actuar como potentes inmunoestimulantes junto con un antígeno para generar respuestas inmunes específicas de antígeno en el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, la patente US 7303881 da a conocer que los liposomas compuestos por lípidos catiónicos activan las células dendríticas como se demuestra por la estimulación por los lípidos catiónicos de la expresión de moléculas coestimuladoras CD80/CD86 en las células dendríticas DC2.4 (Figura 14A y 14B). Tal como se muestra en la figura. 14A, la capacidad de estimular la expresión de CD80/CD86 en las células DC2.4 por diferentes liposomas catiónicos varía ampliamente. Lipofectamine. RTM., una formulación de liposomas 3:1 (p/p) del lípido policatiónico trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminocarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino (DOSPA) y el lípido neutro dioleil fosfatidiletanolamina (DOPE), y los liposomas preparados a partir de O,O'-dimiristil-N-lisil aspartato (DMKE) y O,O'-dimiristil-N-lisil glutamato (DMKD), estimularon fuertemente la expresión de CD80/CD86 por células CD2.4.

[0098] La capacidad de los diferentes lípidos catiónicos para estimular la expresión de CD80 en células DC 2.4 varió. Tanto la cabeza hidrófila como la cola lipofílica de los lípidos tienen un efecto significativo en esta capacidad. Por ejemplo, los lípidos DXEPC con grupos de cabeza de etil fosfocolina (EPC), en general, parecen ser más potentes que los lípidos DXTAP con el grupo de cabeza de trimetilamonio propano (TAP). Dentro de los lípidos que llevan una estructura de grupo de cabeza particular, los lípidos con cadenas acilo más cortas (1,2-dilauroil-sn-glicero-3- etilfosfocolina (DLEPC-12:0), 1,2-dimiristil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DMEPC-14:0)) o insaturadas (1,2-dioleil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DOEPC-18:1)) parecen ser más potentes que aquellas con cadenas acilo más largas (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DPEPC-16:0)) o saturadas (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DSEPC-16:0)) (figura 14B).. Estos datos demostraron que múltiples lípidos catiónicos eran capaces de estimular la activación de células dendríticas. Tres lípidos catiónicos representativos DOTAP, DOTMA y DOEPC fueron por tanto seleccionados para estudios adicionales para determinar la vía por el cual los lípidos catiónicos actúan como estimuladores inmunes. Los datos presentados en este documento con los lípidos catiónicos representativos pueden ser extrapolados a otros lípidos catiónicos que estimulan respuestas inmunitarias.

[0099] Los datos de los presentes estudios han conducido a la observación de que los lípidos catiónicos son no sólo vehículos de reconocimiento y liberación para antígenos a APC del sistema inmunitario, sino también funcionan como adyuvantes potentes bajo intervalos de composición de dosis baja para influir directamente en la función del sistema inmunitario a través de la activación de vías de señalización dependientes de MAP quinasa con la producción resultante de moléculas reguladoras del sistema inmunitario, incluyendo citocinas y quimiocinas. Se ha observado un efecto dosis-respuesta claro de lípido catiónico en las capacidades inmunoestimulantes de las formulaciones. Con este fin, hemos demostrado que cuando un antígeno, tal como, por ejemplo, un epítipo de péptido de la proteína E7 del VPH de tipo 16, se encapsula en los liposomas catiónicos de cualquiera de DOTAP, DOTMA o DOEPC (DOTAP/E7, DOTMA/E7 o DOEPC/E7) y el complejo de antígeno/lípido se administra a composiciones de dosis de aproximadamente 100 nmol mediante una sola inyección subcutánea, induce la regresión del tumor positivo E7 de VPH, TC-1, en ratones. Al recibir el complejo lípido/antígeno, las partículas fueron recogidas principalmente por las células dendríticas, las principales células presentadoras de antígenos profesionales. La iniciación de la activación de células dendríticas y la migración a los ganglios linfáticos de drenaje facilitan respuestas inmunes contra tumores TC-1 específicos de antígeno tal como se ha demostrado. Se generaron linfocitos T CD8<sup>+</sup> funcionales en ratones después de recibir una inyección de DOTAP/E7 y los tamaños tumorales se redujeron y exhibieron un aumento de la apoptosis, debido al creciente número de células T infiltrantes en el microambiente tumoral. La curva dosis-respuesta resultante del lípido catiónico en forma de campana (la actividad disminuye por encima y por debajo de la dosis óptima) demuestra actividad a dosis muy bajas, lo que indica que la actividad de los lípidos catiónicos como adyuvantes o inmunoestimuladores es tan potente que la CE<sub>50</sub> es tan baja como aproximadamente 15 nmol por inyección. Las dosis altas de lípidos catiónicos eliminan la actividad inmunoestimuladora. También hemos demostrado que cuando un antígeno tal como, por ejemplo, ovoalbúmina, se incorpora en los liposomas catiónicos y se administra en una sola inyección subcutánea, se producen anticuerpos eficaces contra el antígeno. Es evidente que en las composiciones de dosis óptimas, los lípidos catiónicos y los complejos de lípido catiónico/antígeno proporcionan inmunoterapias simples, seguras, eficientes y muy útiles para prevenir y tratar enfermedades.

[0100] Las células T reguladoras se describieron inicialmente por Gershon et al. [Eardley, DD, et al., Immunoregulatory circuits among T-cell sets. I. T-helper cells induce other T-cell sets to exert feedback inhibition. J Exp Med 147:1106; y Cantor, H, et al., Immunoregulatory circuits among T-cell sets. II. Physiologic role of feedback inhibition in vivo: absence in NZB mice. J Exp Med 147: 1116 (1978)], en la década de 1970 y fueron llamadas células T supresoras. Estudios recientes han explorado el papel de las células T reguladoras CD4+CD25+ (T-reg) en la supresión de la inmunidad tumoral en varios modelos murinos, así como en pacientes con cáncer [Comes, A, et al., CD25+ regulatory T cell depletion augments immunotherapy of micrometastases by an Il-21-secreting cellular vaccine. J Immunol 176: 1750 (2006)]. La frecuencia de la población celular de T-reg aumenta en la sangre periférica

de pacientes con cáncer [Sasada, T, et al, CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: posible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98: 1089 (2003)]. También se enriquecen entre los linfocitos infiltrantes de tumor y en los ganglios linfáticos de drenaje [Baecher-Allan, C, y Hafler, DA, Supressor T cells in human diseases. *J Exp Med* 200: 273 (2004)]. Además, la acumulación de T-reg en el tejido asociado al tumor predice un mal pronóstico o supervivencia [Baecher-Allan, C, y Anderson, DE Immune regulation in tumor-bearing hosts. *Curr Opin Immunol* 18: 214 (2006)]. Aunque la vía detallado de cómo T-reg disminuye la inmunidad de células T normales no se entiende bien, se ha descrito que la actividad antitumoral se mejora mediante el uso de anticuerpo anti-CD25 para bloquear las células T-reg [Attia, P, et al., Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother* 28: 582 (2005)]. De hecho, se ha hecho evidente que será necesario vigilar y caracterizar las respuestas tanto efectoras como de T-reg en pacientes que reciben candidatos de vacunas tumorales humanas [Baecher-Allan, C, y Anderson, DE Immune regulation in tumor-bearing hosts. *Curr Opin Immunol* 18: 214 (2006)]. En los presentes estudios, se encontró una correlación clara de la actividad antitumoral de DOTAP/E7 con la reducción de células T-reg.

**[0101]** Los lípidos catiónicos, por tanto, constituyen una nueva clase de inmunoestimuladores que a dosis específicas se pueden aplicar de manera efectiva en la modulación de la respuesta inmunitaria del cuerpo y en el desarrollo de agentes terapéuticos y vacunas, tanto para uso profiláctico como terapéutico.

**[0102]** Se ha sabido desde hace varios años que las proteínas y péptidos tienen un potencial significativo para su uso en el desarrollo de inmunoterapias y vacunas. Un inconveniente importante para el desarrollo con éxito de tales terapias ha sido la liberación ineficiente de los antígenos al sistema inmunitario. Además, se han realizado intensos esfuerzos para desarrollar inmunoestimulantes seguros y potentes para su uso en enfermedades infecciosas y como terapias para el cáncer. Las tecnologías actuales que implican adyuvantes tales como Montanide ISA<sup>(R)</sup> 51 y 720 de Seppic, Inc., que es una mezcla de un agente tensioactivo de la familia de monooleato de manida con un aceite mineral o aceite no mineral, respectivamente, han sido probadas en vacunas para enfermedades infecciosas y el cáncer en los seres humanos [Aucouturier, J, et al, Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 1:111 (2002)]. Diversos estudios demuestran la capacidad de Montanide ISA<sup>(R)</sup> 51 y 720 para mejorar los títulos de anticuerpos y también la respuesta de CTL específica [Yamshchikov, GV, et al., Evaluation of peptide vaccine immunogenicity in draining lymph nodes and peripheral blood of melanoma patients. *Int J Cancer* 92: 703 (2001)]. Sin embargo, este tipo de adyuvante de aceite-en-agua requiere un paso crítico de emulsificación durante el proceso de fabricación, que no siempre es fácil de controlar. Más importante aún, una fase I de ensayos clínicos de un polipéptido TAB9 multiepitopo combinado con Montanide ISA 720 indicó que siete de los ocho voluntarios del grupo de dosis baja mostraron inflamación local moderada o grave, mientras que cuatro de los ocho sujetos del grupo de dosis más alta desarrollaron granulomas y abscesos estériles [Toledo, H, et al., A phase I clinical trial of a multi-epitope polypeptide TAB9 combined with Montanide ISA720 adjuvant in non-HIV-1 infected human volunteers. *Vaccine* 19: 4328 (2001)]. ISA 720 se compone de aceite metabolizable y se supone que es menos reactogénico en los seres humanos. Sin embargo, como la mayoría de otros adyuvantes, el tensioactivo en la emulsión puede desencadenar receptores tipo toll (TLR) en las células dendríticas y los macrófagos, induciendo así la producción de NF-κB y las respuestas inflamatorias [Aucouturier, J, et al., Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 1: 111 (2002)].

**[0103]** Hemos demostrado que los lípidos catiónicos no mejoran la expresión de NF-κB, lo que sugiere que la estimulación de células dendríticas por lípidos catiónicos está señalizada a través de una vía independiente de NF-κB [Cui, Z., et al (2005). Immunostimulation mechanism of LPD nanoparticle as a vaccine carrier. *Mol Pharm* 2: 22-28)]. Por lo tanto, los liposomas catiónicos pueden pertenecer a una clase única de adyuvante con un perfil de seguridad mejorado.

**[0104]** También hemos demostrado que mediante lipidación de un antígeno tal como, por ejemplo, la unión de un ácido mono-palmitico a un péptido E7 alargado con KSS (en cualquiera de las posiciones α o ε), la eficiencia de encapsulación de péptidos dentro del complejo de liposoma catiónico/antígeno puede mejorarse sobre la del antígeno soluble en agua. El complejo de DOTAP/lipopéptido-E7, que consiste en sólo dos moléculas, indujo una mejora general en la generación de CTL específicos de antígeno para la erradicación de células TC-1 positivas de VPH. La composición de lípido catiónico se mantuvo a 100 nm. Cuando el antígeno se administró a una dosis reducida (5 nmol o menos) a ratones portadores de tumores, el complejo DOTAP/lipopéptido-E7 exhibió una actividad antitumoral superior en comparación con la formulación DOTAP/E7 original a una dosis completa (10 nmol). El aumento de la actividad antigénica y antitumoral del lipopéptido se correlacionó con el aumento de la encapsulación del lipopéptido en los liposomas. Como se muestra en la Tabla 2, la eficiencia de atrapamiento de lipopéptido fue del 90% con una carga del péptido de 2,5% molar de lípido total, mientras que sólo alrededor del 25% del péptido E7 nativo soluble en agua solo se incorporó en el complejo. También se ha descrito una encapsulación en liposomas mejorada similar de lipopéptidos [Yagi, N. et al., Preparation of functional liposomes with peptide ligands and their binding to cell membranes. *Lipids*, 35, 673-680 (2000); y Liang, MT et al, Encapsulation of lipopeptides within liposomes: effect of number of lipid chains, chain length and method of liposome preparation. *Int J Pharm*, 301, 247-254 (2005)]. Para que el péptido se presente por la vía de MHC de clase I, el péptido tiene que entrar en el citoplasma de la APC. Los liposomas catiónicos liberan el péptido encapsulado, pero no libre, en las células. Por lo

tanto, cuanto mayor sea la encapsulación del péptido, se puede esperar una mejor liberación y antigenicidad. Además, en condiciones de dosificación como se ha demostrado, el lípido catiónico también actúa como un potente inmunoestimulador que conduce a una fuerte respuesta inmunitaria específica de antígeno que da lugar a la observada muerte de células tumorales.

5 [0105] La importancia de ROS se ha implicado en la respuesta inmunitaria innata y la activación de las células T [Kantengwa et al, Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med 167: 431-437 (2003)], y la alta producción de ROS conduce a la muerte celular [Tobiome K, et al, ASK1 is required for sustained activation of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. EMBO Rep 2: 222-228 (2001)], [Aramaki Y, et al, Induction of apoptosis in WEHI 231 cells by cationic liposomes. Pharm Res 17: 515-520 (2000)]. Hemos demostrado que ROS era inducida por el lípido catiónico en células en el ganglio linfático de drenaje y una alta dosis de lípido DOTAP conducía a la destrucción de células dendríticas. De hecho, Iwaoka et al. han demostrado que los liposomas catiónicos pueden inducir ROS en los macrófagos in vitro [Iwaoka S, et al, Cationic liposomes induce apoptosis through p38 MAP kinase caspase-8-Bid pathway in macrophage-like RAW264.7 cells. J Leukoc Biol 79: 184-191 (2006)]. Los datos mostrados en la figura 10A demuestran claramente que los lípidos catiónicos son capaces de generar ROS in vivo en el ganglio linfático de drenaje después de la inyección subcutánea de los complejos de DOTAP/E7. Los mismos datos también sugieren que el exceso de ROS generado por una alta dosis de lípido catiónico conduce a una mayor muerte de las células dendríticas. Estos datos apoyan la administración a un sujeto de un lípido catiónico en una dosis suficiente para inducir la producción de ROS en células de un sistema inmunitario del sujeto en el que el nivel de ROS inducido es suficiente para aumentar la respuesta inmunitaria por encima de la respuesta inmunitaria presente en ausencia del lípido catiónico. Puede haber otras posibles razones relacionadas con la pérdida de inmunoestimulación y actividad contra el cáncer resultante debido a la alta dosis de DOTAP del complejo de DOTAP/E7. Sin embargo, la disminución en la cantidad de APC activadas en el DLN definitivamente debe desempeñar un papel importante en la disminución observada en la infiltración de linfocitos (figura 3), las actividades de CTL específicos de antígeno y la producción de IFN- $\gamma$  (Figuras 2 y 8) y, lo más importante, la actividad antitumoral (figura 6) a una dosis alta de vacuna. Por otro lado, se requiere un nivel deseable de producción de ROS ya que ROS inducido por DOTAP es probablemente la señal inicial para mediar en la posterior transducción de señales, como las MAP quinasas ERK y p38, necesarias para la actividad de vacuna tal como se discute más adelante en el Ejemplo 2. Además, hemos demostrado la importancia de la densidad de la carga catiónica en el efecto inmunoestimulador y la consiguiente actividad anticáncer en la figura 10C. Aquí se demuestra que tanto la generación de ROS como la actividad contra el cáncer pueden disminuir mediante la coformulación de altas proporciones de un lípido inerte, neutro, DOPC con el complejo de lípido/E7, dando lugar a una disminución de la densidad de carga catiónica.

35 [0106] El ejemplo 1 demuestra la importancia de la dosis de lípido catiónico en el efecto inmunoestimulador y también pone de relieve el papel de los complejos de lípido catiónico/antígeno en el desarrollo de inmunoterapias sencillas y seguras para generar fuertes respuestas inmunes específicas de antígeno para el tratamiento de cáncer y múltiples enfermedades, tales como infecciones bacterianas y virales.

## 40 EJEMPLO 2

### MECANISMO DE LA ACTIVIDAD INMUNOESTIMULADORA DE LÍPIDOS CATIÓNICOS: FOSFORILACIÓN DE UNA MAP QUINASA, ERK E INDUCCIÓN DE QUIMIOCINAS

#### 45 A. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

##### 1. Líneas celulares y péptidos

50 [0107] Las células TC-1 fueron proporcionados por TC Wu (Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MD). Estas células son células endoteliales de pulmón C57BL/6 de ratón que han sido transformadas con los oncogenes E6 Y E7 DE VPH 16 y H-ras activado. Las células fueron cultivadas en medio RPMI (disponible comercialmente en Invitrogen de Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal al 10% y 100 U/ml de penicilina, y 100 mg/ml de estreptomycin. El péptido restringido de MHC de clase I de la proteína E7 de VPH 16 (aminoácido 49-57, RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]) fue sintetizado por la instalación de síntesis de péptidos de la Universidad de Pittsburgh mediante síntesis en estado sólido utilizando un sintetizador de péptidos Advanced ChemTech modelo 200 y se purificó por HPLC. [tal como se describe en Feltkamp, et al. Eur J Immunol 23, 2242-2249 (1993)]. Los anticuerpos monoclonales de ratón específicos de pERK y ERK2 y siARN fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., de Santa Cruz, CA. El anticuerpo policlonal de conejo específico para p38 fosforilada (p-p38) se obtuvo de Cell Signaling Technology Inc. de Danvers, MA. El array de GeneChip Mouse Genome 430 2.0 se obtuvo de Affymetrix, Inc. PD-98059, U-0126, PP2, wortmannin y GF109203X se obtuvieron de Calbiochem. La toxina pertussis y otros reactivos se obtuvieron de Sigma.

##### 2. Preparación de complejos de lípido/antígeno y la determinación de las propiedades físicas

65 [0108] Todos los lípidos fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids (Alabaster AL). Los liposomas unilamelares pequeños DOTAP, DOEPC y DOTMA fueron preparados mediante la hidratación de una película delgada seguido

de extrusión. El lípido, con o sin un medicamento, en cloroformo se secó como una capa fina bajo una corriente de nitrógeno en un tubo de vidrio. La película delgada se desecó al vacío durante 2-3 h y a continuación se rehidrató en agua de calidad de cultivo celular (disponible comercialmente de Cambrex de Walkersville, MD) o tampón que contenía péptido E7 hasta una concentración final de 0,7 mg de lípido y 0,1 mg de E7 por ml (relación molar = 11: 1). La dispersión de los lípidos se extruyó secuencialmente a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 0,4, 0,2 y 0,1  $\mu\text{m}$ . El péptido no atrapado no se eliminó. Los liposomas se almacenaron a 4°C hasta su uso. La asociación del péptido E7 con el liposoma se determinó midiendo el porcentaje de péptido unido a liposoma. En resumen, el péptido E7 no unido de los complejos DOTAP/E7 o DOTAP/E7/fármaco (inhibidor de la MAP quinasa) se separó mediante un dispositivo de filtrado centrífuga Microcon® (Millipore, Bedford, MA) y la concentración de péptido no unido se midió por el kit de ensayo de proteínas Micro BCA® (Pierce, Rockford, IL). La eficacia de la asociación de péptido se determinó como el porcentaje de péptido no unido. Aproximadamente el 30% de péptido E7 se asoció con los liposomas.

### 3. Análisis estadístico.

[0109] Los datos se presentan como la media  $\pm$  SD de por lo menos 3 experimentos independientes. Se utilizaron pruebas t de Student de dos colas para evaluar la significación estadística de las diferencias en las medias. La significación se fijó a  $p < 0,05$ .

### 4. Extracción de ARN y microarrays (“micromatrices”)

[0110] Se extrajo ARN mediante el RNeasy Mini Kit de Qiagen de Germantown, MD, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron siete  $\mu\text{g}$  de ARN total para sintetizar ADNc. Se utilizó un kit de ADNc habitual de Life Technologies of Gaithersburg, MD, con un cebador T7-(dT)<sub>24</sub> para esta reacción. A continuación el ARNc biotinilado se generó a partir de la reacción de ADNc utilizando el BioArray High Yield RNA Transcript Kit. El ARNc se fragmentó a continuación en tampón de fragmentación (5X tampón de fragmentación: Tris-acetato 200 mM, pH 8,1, KOAc 500 mM, MgOAc 150 mM) a 94°C durante 35 minutos antes de la hibridación al chip. A continuación, se añadieron quince  $\mu\text{g}$  de ARNc fragmentada a un cóctel de hibridación (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ARNc fragmentado, 50 pM de oligonucleótido de control B2, y los controles de hibridación *BioB*, *BioC*, *BioD*, y *cre*, 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque, 0,5 mg/ml de BSA acetilado, 100 mM de MES, 1M de NaCl, 20 mM de EDTA, 0,01% de Tween 20). Se usaron diez  $\mu\text{g}$  de ARNc para la hibridación. Las matrices (“arrays”) se hibridaron durante 16 horas a 45°C en el horno de hibridación GeneChip 640. Las matrices se lavaron y se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina R en el GeneChip Fluidics Station 400. Después de esto, las matrices se rastrearon con el escáner Hewlett Packard GeneArray. Se utilizó software de Affymetrix GeneChip Microarray Suite 5.0 para el lavado, rastreo y análisis básico. La calidad de la muestra se evaluó mediante el examen de las relaciones de intensidad 3' a 5' de ciertos genes.

### 5. Células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC)

[0111] Se generaron BMDC utilizando un procedimiento modificado del descrito en Inaba K., et al., Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow culture supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693-702, (1992). Brevemente, se recogió médula ósea de los fémurs y tibias de ratones C57BL/6 hembra. Después de la lisis de glóbulos rojos, la adherencia plástica permitió la separación de precursores de células dendríticas de linfocitos. Las células de médula ósea restantes se cultivaron durante 6 días en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, aminoácidos no esenciales, antibiótico/antimicótico y GM-CSF y 1L-4 (R&D systems) a 1000 U/ml cada uno. El medio se cambió cada dos días. Las células se utilizan en los ensayos en el día 6. Estas células fueron > 90% de células dendríticas, verificado por citometría de flujo para la expresión de CD11c.

### 6. RT-PCR

[0112] Se aisló el ARN total de BMDC mediante el RNeasy Mini Kit de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la digestión con DNasa durante 30 minutos a 37°C, la concentración total de ARN se determinó por espectrofotometría. Los pares de cebadores para CCL2, CCL3, CCL4 y beta-actina de ratón (cebador directo 5'-AAGCCAGCTCTCTCTTCCTC-3' [SEQ. ID. NO. 3] y cebador inverso 5'-CCTCTCTCTTTGAGCTTGTTG-3' [SEQ. ID. NO. 4] para CCL2; cebador directo 5'-ATCATGAAGGTCTCCACCAC-3' [SEQ ID NO 5] y cebador inverso 5'-TCTCAGGCATTCAGTTCCAG-3' [SEQ ID NO 6] para CCL3; cebador directo 5'-GCTCTGTGCAAACCTAACCC-3' [SEQ ID NO 7] y el cebador inverso 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3' [SEQ ID NO 8] y cebador inverso 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3' [SEQ ID NO 9] para la beta-actina [Wang H., et al., Potential involvement of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/CCL2 in IL-4-mediated tumor immunity through inducing dendritic cell migration into the draining lymph nodes. *Int Immunopharmacol* 3: 627-42, (2003)] fueron sintetizados mediante tecnología IDT. La RT-PCR se realizó usando el kit de RT-PCR de un solo paso (disponible comercialmente en Invitrogen de Carlsbad, CA), donde la transcripción reversa y la amplificación de ADN ocurren en la misma reacción. Brevemente, se usó 1  $\mu\text{g}$  de ARN total como molde en una reacción que incluía los cebadores apropiados en presencia tanto de la transcriptasa inversa como de la Taq polimerasa. La mezcla se incubó a 45°C durante 30 min y se cicló 25 veces a 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, y 72°C durante 2 min. Los controles negativos apropiados

de amplificación incluían reacciones en ausencia de transcriptasa inversa. Los productos de PCR se visualizaron mediante transiluminación UV de geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio.

## 7. Producción de CCL2 por células de los ganglios linfáticos y BMDC después de la estimulación con DOTAP

[0113] Dos días después de que los ratones C57BL/6 hembra (n = 5) recibieron inyecciones subcutáneas de PBS, DOTAP/E7 o DOTAP/E7/Inhibidor de MAP quinasa, la cantidad de la producción de CCL2 dentro de los ganglios linfáticos de drenaje se analizó mediante kit ELISA para CCL2 (comercialmente disponible en BD Biosciences). Se cultivaron BMDC de ratones C57BL/6 durante seis días en presencia de mGM-CSF recombinante y mL-4 tal como se ha descrito. En el día 6, se estimularon BMDC ( $10^6$  células en 1 ml/pocillo) con medio de control o liposomas durante 1 h, 24 h o 48 h a 37°C. Para el tratamiento con inhibidor, los inhibidores se preincubaron con BMDC durante 20 min antes de la estimulación con liposoma. La producción de CCL2 en el sobrenadante se analizó mediante kit ELISA para CCL2.

## 8. Tinción inmunohistoquímica de CCL2

[0114] Los ganglios linfáticos de drenaje de ratones se extrajeron en el día 2, se embebieron en compuesto OCT, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso para el análisis inmunohistoquímico. Se utilizó el Sistema de tinción ABC de cabra (disponible comercialmente de Santa Cruz Biotechnology Inc. de Santa Cruz, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se cortaron secciones criostáticas de 8 µm de grosor de ganglios linfáticos de drenaje y se fijaron en acetona fría durante 10 min y se lavaron en PBS 3 veces durante 5 min cada lavado. Las secciones se incubaron secuencialmente en peróxido de hidrógeno al 1% (en H<sub>2</sub>O) durante 10 minutos para bloquear las peroxidasa endógenas, en suero de bloqueo al 1,5% (suero de burro) en PBS durante 60 min, y a continuación con el anticuerpo primario (dilución 1:100; disponible comercialmente en Santa Cruz Biotechnology Inc., de Santa Cruz, CA) durante la noche a 4°C. Los portaobjetos se incubaron a continuación con el anticuerpo secundario biotinilado (dilución 1:150; disponible comercialmente de Santa Cruz Biotechnology Inc. de Santa Cruz, CA) con el reactivo de enzima AB durante 30 min y se incubaron en 3 gotas de sustrato de peroxidasa durante 10 min o más

## 9. Transferencia Western

[0115] Se recogió el lisado de células BMDC después de diferentes tratamientos y se separó la proteína celular total en geles de SDS/poliacrilamida y a continuación se transfirió a membranas de difluoruro de polivinilideno. Las membranas se bloquearon con 5% de leche sin grasa en solución salina tamponada con Tris durante 1 h y después se incubaron de 1 h a toda la noche con el anticuerpo primario. Después de lavar las membranas con solución salina tamponada con Tris tres veces, se incubaron las membranas con peroxidasa de rábano picante conjugada anticuerpo secundario durante 1 h. Las bandas de actividad de la peroxidasa asociada a proteína se detectaron por quimioluminiscencia aumentada utilizando ECL plus (Amershan Internacional), seguido por autorradiografía.

## 10. Tratamiento con siARN

[0116] Los experimentos de ARN de interferencia se realizaron con siARN para ERK1 y siARN de control (disponible comercialmente de Santa Cruz Biotechnology de Santa Cruz, CA) usando reactivo de Lipofectamine 2000 (disponible comercialmente en Invitrogen de Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, en el día 5, se sembraron BMDC a  $5 \times 10^5$  por pocillo en 12 placas de pocillos y se transfectaron inmediatamente con 80 nM de siARN utilizando 4 µl de reactivo de transfección. Las células se incubaron con DOTAP o LPS durante otras 16 h. El sobrenadante se analizó mediante ELISA para CCL2.

## B. RESULTADOS

[0117] Se utilizó una línea de células dendríticas transformadas, DC2.4, que ha demostrado ser un buen modelo para APC [Mendoza L., et al., Prophylactic, therapeutic and anti-metastatic effects of BMDC and DC lines in mice carrying HPV 16-associated tumours, *Int J Oncol* 23: 243-7, (2003); Okada N., et, Effects of lipofectin-antigen complexes on major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation pathway in murine dendritic cells and on dendritic cell maturation, *Biochim Biophys Acta* 1527: 97-10, (2001)], para estudiar la regulación génica global inducida por DOTAP mediante el análisis de microarrays de Affymetrix (Figura 15A). Los datos mostraron que DOTAP induce la sobreexpresión de varias quimiocinas, incluyendo la proteína-1 quimioatrayente de monocitos ("MCP-1")/quimiocina CC-2 ("CCL2"), proteína-1 alfa inflamatoria de macrófagos ("MIP-1α")/quimiocina CC-3 ("CCL3"), proteína-1 beta inflamatoria de macrófagos (MIP-1β)/quimiocina CC-4 ("CCL4"). Además de la inducción de quimiocinas CC, se reguló por descenso la señal de IL-1, porque IL-1β disminuyó y el antagonista del receptor de IL-1 ("IL1RA") aumentó tras un tratamiento con 50 µM de DOTAP durante 16 h. Curiosamente, el marcador de células dendríticas, CD11c, fue inducido por los liposomas de DOTAP, lo que sugiere que los lípidos catiónicos juegan un papel en la maduración de células dendríticas. La inducción de ARNm de quimiocinas fue confirmada por RT-PCR con BMDC murino (Figura 15B).

**[0118]** Tal como se mencionó anteriormente, las quimiocinas están implicadas en la migración de linfocitos y desempeñan papeles importantes en la respuesta inmunitaria. La inducción de quimiocinas puede explicar la principal actividad adyuvante de los liposomas catiónicos como se mencionó anteriormente. Esta hipótesis nos llevó a estudiar más a fondo los mecanismos detallados que subyacen al proceso. Se utilizaron liposomas preparados a partir de diferentes lípidos para determinar si la inducción de quimiocinas es un fenómeno general por liposomas. Usando BMDC, los resultados mostraron que sólo los liposomas catiónicos cuaternarios (DOTAP y DOEPC) indujeron la liberación de MCP-1/CCL2 de BMDC. Los liposomas neutros (DOPC y DOG) y con carga negativa (DOPG y DOPS) no lo hicieron (Figura 165). También un análogo de amina terciaria de DOTAP, DODAP, no indujo tampoco la actividad, lo que sugiere que la actividad requiere un grupo de cabeza de amino cuaternario en el lípido. LPS también se incluyó en los experimentos como control positivo. La Figura 16 también muestra que la inducción de CCL2 por liposomas catiónicos alcanza un valor máximo en 24 h, porque la incubación de 48 horas no resultó en niveles más altos de producción de quimiocinas. Nuestros datos también muestran que la expresión de CCL2 inducida por DOTAP es dependiente de la dosis (Figura 17). Cinco  $\mu\text{M}$  de DOTAP indujeron cantidades significativas de CCL2 a partir de BMDC y la máxima de inducción se alcanzó a 45-75  $\mu\text{M}$ . Para identificar qué vía estaba involucrada en la inducción de CCL2 por DOTAP en BMDC, se utilizaron varios inhibidores específicos de distintas vías de señalización. PD98059 ("PD") y U-0126 ("U"), inhibidores específicos de la vía de ERK, casi anularon completamente la producción de CCL2, pero, sorprendentemente, SB203586 ("SB"), un inhibidor de la vía de p38, aumentó sinérgicamente la producción de CCL2 inducida por DOTAP (Figura 18). Nuestros datos también mostraron claramente que la vía de PKC y Src quinasa no están involucradas en la producción de CCL2 inducida por DOTAP, porque el inhibidor de PKC GF109203X ("GF") y el inhibidor de la Src quinasa PP2 no tuvieron efecto inhibitorio. La Figura 18 también indica que la PI-3 quinasa y el receptor acoplado a proteína G dependiente de Gi (GPCR) estaban probablemente involucrados en la liberación de CCL2 tras el tratamiento con DOTAP, porque wortmanina ("Wort") y la toxina pertussis ("PTx") tenían cierto efecto inhibitorio.

**[0119]** Se sabe que algunas quimiocinas están reguladas por la vía de ERK [Yoo J.K., et al, IL-18 induces monocyte chemotactic protein-1 production in macrophages through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and MEK/ERK1/2 pathways, *J Immunol* 175: 8280-6, (2005)], y se verifica en nuestro sistema. Usando BMDC para estudiar la activación de la vía de ERK, nuestros datos mostraron que DOTAP indujo la fosforilación de ERK en 10 minutos de exposición y fosfo-ERK (pERK) permaneció en un nivel alto durante al menos 40 min (Figura 19A). Además, p38 fue también ligeramente activado por DOTAP. Sin embargo, no se detectó fosforilación de I $\kappa$ B y la degradación posterior después de la incubación con DOTAP (datos no mostrados), lo que sugiere que NF- $\kappa$ B no participó en la transducción de señales iniciada por DOTAP, en consonancia con nuestros resultados anteriores [Cui Z., et al., Immunostimulation mechanism of LPD nanoparticle as a vaccines carrier, *Mol Pharm* 2: 22-8, (2005)]. La transferencia Western mostró que la inhibición de p38 también podría aumentar sinérgicamente la fosforilación de ERK provocada por DOTAP, lo que sugiere que la vía de ERK y p38 están regulados recíprocamente (Figura 19B). En otras palabras, la activación de p38 puede inhibir la activación de ERK. Consistente con los datos de ELISA en la Figura 18, nuestros datos también han demostrado que la activación inducida por DOTAP de ERK está mediada por PI-3 quinasa porque la wortmanina inhibe la fosforilación de ERK inducida por DOTAP. Sin embargo, PTx, el inhibidor de Gi, sólo mostró un ligero efecto inhibitorio sobre la fosforilación de ERK inducida por DOTAP (Figura 19C). Por otro lado, la vía de PKC y Src quinasa no están involucradas en este proceso, porque GF y PP2 no tuvieron efecto sobre la fosforilación de ERK inducida por DOTAP.

**[0120]** Para verificar adicionalmente que la vía de ERK está involucrada en la liberación de CCL2 iniciada por DOTAP, se utilizó la estrategia de ARN de interferencia para bloquear la expresión de genes de ERK en BMDC. La figura 20A indicó que la ERK1 estaba regulado por descenso por siARN después de 24 h de tratamiento. La liberación de CCL2 por DOTAP también fue atenuada en las células tratadas con siARN, que bloquean la expresión de genes de ERK1 (Figura 20B). Sin embargo, a pesar de que ERK1 fue regulada por descenso, LPS continuó induciendo la liberación de CCL2 (Figura 20B). Los datos también demuestran que el tratamiento con siARN de ERK1 no afectó a otras vías de señalización.

**[0121]** Hasta el momento, los datos demuestran la activación de ERK inducida por DOTAP y inducción de CCL2 *in vitro*. Hemos investigado si la vía de señalización anterior desempeña un papel en la actividad adyuvante de DOTAP *in vitro*. Se utilizó la formulación de vacuna de liposomas DOTAP/E7 para inmunizar ratones por vía subcutánea, y se recogieron los ganglios linfáticos de drenaje y se ensayaron mediante ELISA para CCL2. Los datos muestran que el CCL2 acumulado en los ganglios linfáticos de drenaje después de la inmunización y la acumulación máxima fue 2 días después de la inyección (Figura 21A). Estos datos se confirmaron mediante tinción inmunohistoquímica (Figura 21B). Los mismos datos también demuestran que más linfocitos migran a los ganglios linfáticos de drenaje tras el tratamiento con DOTAP/E7, dando como resultado la ampliación de los ganglios.

**[0122]** Los inhibidores de las vías de ERK y p38 también se formularon en los complejos de liposomas DOTAP/E7. DOTAP/E7/U-0126 y DOTAP/E7/SB203580 formaron suspensiones claras, pero PD98059 era difícil de formular en el complejo DOTAP/E7. Las formulaciones DOTAP/E7/fármaco estables tenían potenciales zeta, tamaños de partícula y capacidades de carga de antígeno similares a la formulación DOTAP/E7, indicando que la incorporación del fármaco no alteró significativamente las características físicas de la vacuna. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea con DOTAP/E7/U-0126 y DOTAP/E7/SB203580. Consistente con los datos *in vitro*, la formulación DOTAP/E7 indujo la acumulación de CCL2 en los ganglios linfáticos de drenaje y U-0126 y SB-203580 regularon

recíprocamente la inducción CCL2 (Figura 22A). Con el fin de determinar si las vías de ERK y p38 están relacionados con la actividad antitumoral de DOTAP/E7, hemos examinado la actividad antitumoral de formulaciones de DOTAP/E7/fármaco. Como se muestra en la Figura 22B, los ratones portadores de tumores tratados con DOTAP/E7 a la dosis de lípido de 100 nmoles mostraron un fuerte efecto inhibitor sobre el crecimiento del tumor TC-1. El inhibidor de ERK, U-0126, cuando se coformula con DOTAP/E7, a una dosis de lípido similar anuló completamente la actividad antitumoral de DOTAP/E7. Del mismo modo, se observó la inhibición parcial de la actividad antitumoral cuando los ratones recibieron tratamiento con DOTAP/E7 coformulado con SB203580, indicando que ambas vías de ERK y p38 desempeñan papeles importantes en la actividad antitumoral del complejo de DOTAP/E7.

## C. DISCUSIÓN

**[0123]** Los liposomas son estructuras cerradas de vesículas que consisten en bicapas de lípidos anfipáticos hidratados [Small D.M., Surface and bulk interactions of lipids and water with a classification of biologically active lipids based on these interactions, *Federation Proc.* 29:1320-1326, (1970)]. Dado que fueron identificados como adyuvantes en 1974 [Allison A.G. y Gregoriadis G., Liposomes as immunological adjuvants, *Nature* 252: 252, (1974)], los liposomas se han explorado ampliamente como un sistema de liberación de vacunas de proteínas y ADN [Chen W.C. y Huang L., Non-viral vector as vaccine carrier, *Adv Genet* 54: 315-37, (2005); Gregoriadis G., et al, Vaccine entrapment in liposomes, *Methods* 19: 156-62, (1999); Perrie Y., et al, Liposome-mediated DNA immunization via the subcutaneous route, *J Drug Target.* 11:555-63, (2003)]. Los liposomas muestran varias ventajas únicas para la liberación de antígeno. En primer lugar, hay versatilidad significativa en la composición de lípidos, el tamaño, la lamellaridad, la carga, y los procedimientos de preparación, que pueden elegirse para aplicaciones específicas. Además, teniendo en cuenta la relación de portador a antígeno, el sistema de vesícula liposomal tiene una alta eficiencia de carga de antígeno en forma de encapsulación o asociación estable. Desde el punto de vista de la seguridad, los liposomas son biodegradables, biocompatibles y tienen una inmunogenicidad baja [Copland M.J., et al, Lipid based particulate formulations for the delivery of antigen, *Immunol Cell Biol* 83: 97-105, (2005); O'Hagan D.T. y Singh M., Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems, *Expert Rev Vaccines* 2: 269-83, (2003)]. Además, los liposomas se han utilizado también para introducir antígenos proteicos dentro de la vía citosólica de MHC de clase I para generar respuestas de células T CD8+ [Chikh G. y Schutze-Redelmeier M.P., Liposomal delivery of CTL epitopes to dendritic cells, *Biosci Rep* 22: 339-53, (2002)].

**[0124]** Puesto que los liposomas catiónicos pueden interactuar con la membrana celular cargada negativamente, son ampliamente utilizados para terapia génica y administración de vacunas [Anderson P., Effective vaccination of mice against Mycobacterium tuberculosis infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins, *Infect Immun* 62: 2536-44, (1994); Hasegawa A., et al, Nasal immunization with diphtheria toxin conjugated-CD52 core peptide induced specific antibody production in genital tract of female mice, *Am J Reprod Immunol* 34: 305- 11, (2002)]. Sin embargo, los propios liposomas catiónicos han sido considerados como inertes en cuanto a ser capaces de activar respuesta inmunitarias innatas [Moinegeon P., et al., Towards the rational design of Th1 adjuvants, *Vaccine* 19: 4363-72, (2001)]. Sin embargo, los liposomas catiónicos también pueden inducir la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD83 y activar células dendríticas humanas (figuras 23A-E y 25A-B). También inducen células dendríticas humanas para producir quimiocinas y citocinas críticas que participan en la generación de una potente respuesta inmunitaria a la enfermedad (figuras 24A-F). Estos hallazgos sugieren que los liposomas catiónicos, además de una liberación eficaz a las células dendríticas, son potentes activadores del sistema inmunitario.

**[0125]** A diferencia de los adyuvantes que se utilizan actualmente, tales como alumbre, CpG, y CFA, los inmunomoduladores de lípidos catiónicos no mejoran la expresión de NF- $\kappa$ B, lo que demuestra que la estimulación del sistema inmunitario por lípidos catiónicos se señala a través de una vía independiente de NF- $\kappa$ B, eliminando la probabilidad de respuestas inflamatorias de tipo LPS de nuestras terapias basadas en lípidos catiónicos. Estos estudios indican que los liposomas catiónicos, además de ser un sistema de liberación eficiente, pertenecen a una clase única de estimulantes inmunes con un perfil de seguridad mejorado.

**[0126]** En esta memoria, se estudiaron los posibles mecanismos moleculares de la actividad adyuvante de los liposomas catiónicos. Se investigaron varios componentes de la vía de señalización de MAP quinasa por su papel en la actividad inmunoestimulante de los lípidos catiónicos. Los lípidos fueron investigados como un estimulador activo de células dendríticas. Se demostró que la producción de quimiocinas era inducida por los lípidos catiónicos y la inducción era mediada principalmente por la vía de ERK. Además, los datos muestran claramente que la vía de p38 regula negativamente este proceso. Un informe reciente demostró que p38 juega un papel negativo en la producción de IL-2, mediada principalmente a través de su capacidad para regular la actividad de ERK. Un inhibidor específico de p38 indujo la activación de ERK, en última instancia conduciendo a un aumento de la activación del gen de IL-2 [Kogkopoulou O., et al., Conditional up-regulation of IL-2 production by p38 MAPK inactivation is mediated by increase Erk1/2 activity, *J Leukoc Biol* 79: 1052- 60, (2006)]. La fosforilación y la activación de p38 aumenta su interacción con ERK1/2 y se correlaciona con la inhibición de la actividad de ERK1/2 fosfotransferasa, lo que sugiere que p38 activado puede secuestrar ERK1/2 y estéricamente bloquear su fosforilación por MEK1 [Zhang H., et al., Stress-reduced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase, *J Biol Chem* 276: 6905-8, (2001)]. Trabajos recientes sugieren que la fosforilación robusta y sostenida de ERK da lugar a la fosforilación del

factor de transcripción de AP-1 c-Fos en células dendríticas, que a su vez suprime la expresión de la citocina que define T<sub>h</sub>1 IL-12, favoreciendo así la tendencia a T<sub>h</sub>2. Sin embargo, nuestros resultados muestran dos diferencias significativas con esos informes. En primer lugar, el Pam-3-Cys (un ligando de TLR-2) utilizado en los estudios mostraron una mayor activación de ERK en comparación con LPS (Dillon et al., 2004), pero la activación de ERK inducida por lípidos catiónicos es menor que la observada por LPS. También se examinó IL-10, una citoquina T<sub>h</sub>2, y los resultados no mostraron inducción de IL-10 por DOTAP (datos no mostrados). Por lo tanto, la señal de ERK inducida por DOTAP no es suficiente para desencadenar la respuesta de T<sub>h</sub>2. En segundo lugar, la regulación por descenso inducida por DOTAP de la señal de IL-1 también podía suprimir la respuesta de T<sub>h</sub>2. Parece ser que la activación de ERK inducida por DOTAP se controla adecuadamente.

**[0127]** Nuestros resultados sugieren que se requiere la PI-3-quinasa para la activación inducida por DOTAP de ERK y la inducción de CCL2. Se necesita más investigación para identificar la conexión precisa entre PI-3 quinasa y ERK. Aunque los datos de ELISA muestran que PTx inhibe la liberación de CCL2 inducida por DOTAP, la fosforilación de ERK inducida por DOTAP se inhibe sólo ligeramente por PTx tal como se muestra con los datos de transferencia Western. Por lo tanto, los receptores acoplados a proteína G pueden o no pueden estar implicados en la transducción de señales iniciada por DOTAP. Curiosamente, la lisofosfatidilcolina (LPC) induce la activación de ERK dependiente del receptor G2A y la migración de células T [Radu C.G., et al, T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor, Proc Natl Acad Sci USA. 101: 245-50, (2004)]. Los autores informaron originalmente que LPC era un ligando del receptor G2A [Kabarowski J.H., et al, Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A, Science 293: 702-5, (2001)], pero posteriormente, la activación de ERK inducida por LPC se demostró a través de la vía de regulación del secuestro intracelular y la expresión en superficie de los receptores G2A [Wang L, et al, Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A, Mol Biol Cell 16: 2234-47, (2005)]. Los lípidos catiónicos activos contienen un grupo de cabeza grande polar y dos cadenas de acilo largas. Tales características estructurales pueden facilitar su inserción en las membranas de lípidos, resultando en la posible alteración de una curvatura espontánea de la monocapa lipídica, así como los cambios conformacionales y funcionales de proteínas de membrana.

**[0128]** Dado que p38 regula negativamente la activación de ERK de la inducción de CCL2, esperábamos que el inhibidor de p38, SB203580, formulado en vacunas de E7/DOTAP podría aumentar la actividad antitumoral. Sin embargo, se encontró un resultado contrario que implicaba que p38 también puede desempeñar un papel positivo en la regresión tumoral inducida por DOTAP/E7. Puesto que los liposomas catiónicos pueden inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden conducir a la activación de p38, es posible que la activación de p38 inducida por DOTAP es a través de ROS [Iwaoka et al., 2006]. La evidencia acumulada muestra que la activación de p38 induce la liberación de citocina Th1 de las células dendríticas [DeSilva D.R., et al., The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in activated and Anergic Th1 cells, Cell Immunol. 180: 116-23, (1997); Yu J.J., et al, Regulation and phenotype of an innate Th1 cell: role of cytokines and the p38 kinase pathway, J Immunol 171: 6112-8, (2003)]. En las especies de mamíferos, las MAP quinasas (ERK, p38 y JNK) están implicadas en todos los aspectos de la respuesta inmunitaria, desde la fase de iniciación de la inmunidad innata, a la activación de la inmunidad adaptativa, y a la muerte celular cuando la función inmune es completa [Dong C., et al, MAP kinases in the immune response, Annu Rev Immunol 20: 55-72, (2002)].

**[0129]** Una gran variedad de adyuvantes experimentales están disponibles para su uso en animales y algunos de ellos han sido probados en ensayos clínicos. Incluyen varias emulsiones de agua en aceite, liposomas y otros adyuvantes químicos [Vogel, F.R., y Powell, M.F. A compendium of vaccine adjuvants and excipients, Pharm Biotechnol 6: 141 (1995)]. Sin embargo, sólo los virosomas de la gripe [Gluck, R., y Walti, E., Biophysical validation of Epaxal Berna, a hepatitis A vaccine adjuvanted with immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIV). Dev Biol (Basel) 103: 189 (2000)] y MF59 de Chiron [Kahn, J.O., et al, Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1SF2 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)] ya están en el mercado, además de las sales de aluminio. De forma similar a liposomas catiónicos (datos no publicados), el adyuvante basado en emulsiones submicrométricas, MF59, es internalizado por las células dendríticas [Dupuis, M., et al., Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. Cell Immunol 186: 18 (1998)]. Estimula una variedad de actividades inmunes que conducen a reacciones elevadas de anticuerpos y de células T contra antígenos reacciones coliberados. Sin embargo, según el informe del ensayo clínico sobre el VHS y vacunas contra la gripe [Jones, C.A., y Cunningham, A.L., Vaccination strategies to prevent genital herpes and neonatal herpes simplex virus (HSV) disease. Herpes 11: 12 (2004); y 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)], las pruebas de modelos de animales sugiere que el adyuvante MF59 aumenta los anticuerpos neutralizantes en lugar de las respuestas de células T. Por lo tanto, los liposomas catiónicos como adyuvante de la vacuna son diferentes de MF59 en que genera una fuerte respuesta inmunitaria mediada por células tal como se muestra por nuestros datos.

**[0130]** El complejo lípido catiónico/antígeno parece ser la formulación de vacuna contra el cáncer más simple descrita alguna vez. Sólo contiene dos moléculas, es decir, un antígeno y un portador. Además de la liberación del péptido E7 al citoplasma de las células presentadoras de antígeno, tales como, por ejemplo, las células dendríticas,

DOTAP también debe activar DC. De hecho, los liposomas que consisten en DOTAP solo inducen la expresión de moléculas coestimuladoras CD80/CD86 en células dendríticas.

[0131] En conclusión, nuestros hallazgos sugieren por primera vez que los liposomas catiónicos son potentes estimuladores del sistema inmunológico. Los resultados descritos en el presente documento arrojan luz sobre los mecanismos moleculares de la actividad adyuvante de los lípidos catiónicos, tales como, por ejemplo, DOTAP.

[0132] DOTAP media la inducción de varias citocinas y quimiocinas cuya expresión está mediada por la vía de ERK. Nuestros estudios también identificaron la vía de ERK como un nuevo marcador molecular para la evaluación de la actividad adyuvante de los liposomas catiónicos. Estos marcadores se pueden usar para el cribado de alto rendimiento o el diseño de potentes adyuvantes basados en lípidos y los sistemas de administración de vacunas.

### EJEMPLO 3

#### DEMOSTRACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOESTIMULANTE DE COMPLEJOS DE LÍPIDO CATIÓNIC/O ANTÍGENO EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO HUMANO

##### 1. Complejos de lípido catiónico/E7 activan las células dendríticas humanas de una manera dependiente de la dosis de lípidos

[0133] Los liposomas catiónicos se prepararon como se describe anteriormente. El antígeno E7 usado en la formulación es el péptido E7 humano identificado restringido por HLA-A\* 0201 (E7 de VPH-16, aminoácidos 11-20, YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO. 2). El péptido se sintetizó por la Universidad de Pittsburgh, Instituto de Medicina Molecular, Pittsburgh, PA. Las células dendríticas humanas HLA-A2 se obtuvieron de Lonza (de Walkersville, MD). Los crioviales congelados se descongelaron y las células dendríticas se cultivaron en medio LGM-3 (disponible comercialmente de Lonza de Walkersville, MD) suplementado con 50 microgramos/ml de IL-4 y GM-CSF a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> a una densidad de recubrimiento inicial de 125.000 células/cm<sup>2</sup> en 2 ml de medio en placas de cultivo tisular de 12 pocillos. Las células se cultivaron durante 3 días en cultivo y apareció como una mezcla de células adherentes y redondeadas mediante examen microscópico.

[0134] Las células se trataron en el día 3 con una nueva dosis de 50 microgramos/ml de IL-4 y GM-CSF (todos los pocillos) y los pocillos de ensayo se trataron con una mezcla de interleucina 1-beta ("IL-1 $\beta$ "), interleucina 6 ("IL-6") y TNF- $\alpha$  a 10 ng/ml, y prostaglandina E2 ("PGE-2") a 10  $\mu$ g/ml (control positivo para la activación), ningún tratamiento (control de activación negativo) y DOTAP/E7 a 2,5, 10 y 40 micromolar de concentraciones finales, DOEPC a 2,5, 10 y 40 micromolar de concentraciones finales, y DOTAP/colesterol/E7 a 2,5, 10 y 40 micromolar de concentraciones finales de lípidos y colesterol. El colesterol, un estabilizador de la bicapa lipídica, se añadió a 25% molar. Las células dendríticas tratadas se mantuvieron en cultivo durante 24 horas y se recogieron para la tinción con marcador de superficie celular y análisis por citometría de flujo. Las células recogidas se contaron mediante hemocitómetro y se añadieron secuencialmente 10  $\mu$ l de los siguientes conjugados de anticuerpo a cada muestra para marcar los marcadores de superficie: CD80-FITC, CD83-APC, y CD86-PE (BD Biosciences). Las células marcadas en la superficie se analizaron posteriormente por citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo BD FACScaliber, y las moléculas marcadoras de células dendríticas coestimulantes CD80, CD83, y CD86, que se producen tras la activación, se monitorizaron. Como se ve en las Figuras 23 A, B y C, las células dendríticas primarias humanas tratadas con el complejo de lípido catiónico/E7 a diversas dosis de lípidos regularon por incremento la expresión de los tres marcadores coestimuladores de la activación de células dendríticas evaluada y requerida para la presentación de antígeno satisfactoria a las células T. Como se ve en las figuras 23 D y E, componentes adicionales, tales como estabilizantes, también se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas sin impactar negativamente en las capacidades inmunoestimulantes del complejo.

##### 2. Complejos de lípidos catiónicos/E7 activan las células dendríticas humanas e inducen la producción de quimiocinas y citocinas

[0135] Las células dendríticas HLA-A2 humanas (Lonza, Walkersville, MD) se trataron y se cultivaron en cultivo como se describe anteriormente. En el día 3 las células fueron tratadas con 40 micromolar de complejo de DOTAP/E7 o el lipopolisacárido inmunoestimulante potente (LPS) a concentraciones de 50 micromolar (control positivo). El medio de los pocillos de ensayo se extrajo y se centrifugó a 1.300 rpm en una microcentrífuga durante 5 minutos para sedimentar las células dendríticas no fijadas. Los sobrenadantes se extrajeron y se trataron con 10 microlitros por ml del grupo I del cóctel de inhibidores de proteasas Calbiochem (La Jolla, CA) (Cat. No. 539131) y se almacenaron congelados antes del análisis. Las muestras se analizaron para la expresión de citocinas mediante Pierce Biotechnology (Woburn, MA) utilizando su ensayo ELISA Searchlight Protein Array Multiplex.

[0136] Se evaluaron la producción de TNF- $\alpha$  e IL-12, y la producción de quimiocinas seleccionadas conocidas por ser esenciales en la respuesta inmunitaria celular, CCL3, CCL4, CCL5, y CCL19 (Figura 24A-F). La Figura 24 ilustra que el complejo de DOTAP/E7 induce la producción de citocinas y quimiocinas por células dendríticas humanas. Las figuras 24 A-F ilustran la producción inducida por DOTAP/E7 de TNF- $\alpha$ , IL-12, CCL3, CCL4, CC15, y CCL-19, respectivamente.

**[0137]** Al igual que en las observaciones realizadas con las células dendríticas murinas (Ejemplo 1), a diferencia de LPS, el complejo de DOTAP/E7 no indujo una producción significativa de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , lo que confirma que en el sistema humano también la señalización mediada por NF-kB no es activada por los lípidos catiónicos. DOTAP/E7 estimula la producción eficaz de múltiples quimiocinas, lo que demuestra que los lípidos catiónicos actúan como potentes estimuladores inmunes y proporcionan correlaciones similares de activación eficaz en las células inmunes murinas y humanas.

### 3. Efecto del tamaño de partícula de DOTAP/E7 en la activación de células dendríticas humanas

**[0138]** Células dendríticas HLA-A2 humanas (Lonza, Walkersville, MD), se trataron y se cultivaron en cultivo como se describe anteriormente. En el día 3 los pocillos de ensayo se trataron con una mezcla de IL- $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  a 10 ng/ml, y PGE-2 a 10  $\mu$ g/ml (control positivo para la activación), ningún tratamiento (control de activación negativa), el lipopolisacárido inmunoestimulante potente (LPS) a concentraciones 50 micromolar (segundo control positivo), o 10 micromolar de complejo DOTAP/E7 con tamaños de partícula de 100 nm, 200 nm y 400 nm. Los resultados mostrados en la Figura 25 demuestran que los complejos de lípido catiónico/antígeno pueden utilizarse dentro de un intervalo de tamaños amplio para inducir una respuesta inmunitaria en el desarrollo de inmunoterapias.

## DISCUSIÓN

**[0139]** Los estudios descritos en los Ejemplos 1 y 2 condujeron al desarrollo de una formulación de inmunoterapia que consiste en un complejo de lípido catiónico/antígeno. Tras la estimulación con lípidos catiónicos, tales como DOTAP y DOEPC, se activaron células dendríticas derivadas de médula ósea murina (BMDC) para la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, y CD86 [Vangesseri et al., Immunostimulation of dendritic cells by cationic liposomes. Mol Membr Biol 23: 385-395 (2006)]. La activación de diversos componentes de la vía de señalización de MAP quinasa y varias quimiocinas, tales como CCL2, también se observaron en BMDC activadas por DOTAP. Los estudios en animales sugirieron que los liposomas con DOTAP dentro de intervalos específicos de dosis actúan tanto como un portador de antígeno como como un adyuvante potente para la inducción de la migración de las células dendríticas activadas a los ganglios linfáticos de drenaje, conduciendo así a la generación de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno in vivo contra células portadoras de antígeno, tales como células tumorales. Las pruebas in vitro en la activación de las células dendríticas humanas primarias indican que los lípidos catiónicos son inmunoestimuladores potentes, que promueven la activación de células dendríticas hacia la expresión de moléculas coestimuladoras que se requieren para el reconocimiento de células T y la presentación de antígenos. También hemos demostrado que las células dendríticas humanas, tras la activación por liposomas de DOTAP/E7, promueven la proliferación significativa de células T humanas in vitro.

**[0140]** Los estudios descritos anteriormente identifican composiciones y aplicaciones específicas y únicas de liposomas catiónicos, que pueden ser explotadas para desarrollar inmunoterapias sencillas, rentables, y muy necesarias para varias enfermedades debilitantes.

**[0141]** Como se podrían hacer diversos cambios en los aspectos anteriormente descritos y realizaciones de ejemplo sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior se interprete como ilustrativa y no en sentido limitante. Con ese fin, mientras que los ejemplos discuten principalmente los lípidos catiónicos DOTAP, DOEPC, y DOTMA, los expertos en la técnica reconocerán que estos lípidos catiónicos son meramente de ejemplo y que los procedimientos son aplicables a otros lípidos catiónicos.

## LISTADO DE SECUENCIAS

### **[0142]**

<110> Chen, Weihsu Yan, Weili Toney, Kenya Conn, Gregory Bedu-Addo, Frank Huang, Leaf

<120> ESTIMULACIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNITARIA POR LIPIDOS CATIÓNICOS

<130> PDSB-08

<150> 60896412

<151> 2007-03-22

<150> 60911549

<151> 2007-04-13

<150> 60948512

<151> 2007-07-09

<150> 60983799

<151> 2007-10-30

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano tipo 16

10

<400> 1

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe  
1 5

15

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano tipo 16

20

<400> 2

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr  
1 5 10

25

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

30

<213> Mus musculus

<400> 3

aagccagctc tctctcctc 20

35

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

40

<400> 4

cctctctctt tgagcttggt g 21

45

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Mus musculus

50

<400> 5

atcatgaagg tctccaccac 20

55

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 6

# ES 2 562 714 T3

tctcaggcat tcagttccag 20

<210> 7

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 7

gctctgtgca aacctaacct 20

10

<210> 8

<211> 22

<212> ADN

<213> Mus musculus

15

<400> 8

tgtgatggtg ggaatgggtc ag 22

<210> 9

20 <211> 22

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 9

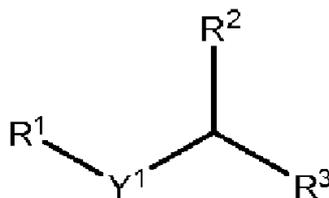
25 tttgatgtca cgcacgattt cc 22

## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:

al menos un lípido catiónico en una dosis suficiente para activar la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos ("MAP") en células del sistema inmunitario de un sujeto para utilizar en la obtención de un efecto adyuvante inmunoestimulador en el sujeto, incluyendo el efecto células T o anticuerpos o combinaciones de los mismos.

2. Composición, según la reivindicación 1, para utilizar en la obtención de un efecto adyuvante inmunoestimulador en el sujeto, en la que el lípido catiónico comprende un lípido catiónico no esteroideo que tiene una estructura representada por la fórmula:



en el que R<sup>1</sup> es un grupo amonio cuaternario, Y<sup>1</sup> es un espaciador elegido entre una cadena de hidrocarburo, un éster, una cetona, y un péptido, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se eligen independientemente entre un ácido graso saturado, un ácido graso insaturado, un hidrocarburo unido a éster, fósforo-diésteres, y combinaciones de los mismos.

3. Composición, según la reivindicación 2, para utilizar en la obtención de un efecto adyuvante inmunoestimulador en el sujeto, en la que el lípido catiónico se elige entre DOTAP, DOTMA, DOEPC y combinaciones de los mismos.

4. Composición, según la reivindicación 1, para utilizar en la obtención de un efecto adyuvante inmunoestimulador en el sujeto, que comprende además al menos un antígeno para formar un complejo de lípido catiónico/antígeno, en el que el complejo de lípido catiónico/antígeno o mezcla estimula una respuesta inmunitaria específica de antígeno.

5. Composición, según la reivindicación 1 ó 4, para utilizar en la obtención de un efecto adyuvante inmunoestimulador en el sujeto, en la que el lípido catiónico active la vía de señalización de MAP quinasa mediante la estimulación de al menos uno de ERK1, ERK2 y p38.

6. Composición, según la reivindicación 4, para utilizar en la obtención de un efecto adyuvante inmunoestimulador en el sujeto, en la que dicho al menos un antígeno se elige entre un antígeno asociado a tumor, un antígeno viral, un antígeno microbiano y combinaciones de los mismos.

7. Composición, según la reivindicación 4, para utilizar en la obtención de un efecto adyuvante inmunoestimulador en el sujeto, en la que dicho al menos un antígeno incluye un antígeno lipidado o un antígeno modificado para incrementar su hidrofobicidad y, opcionalmente, que comprende una secuencia enlazadora entre el antígeno y el grupo hidrófobo unido.

8. Composición, según la reivindicación 7, para utilizar en la obtención de un efecto adyuvante inmunoestimulador en el sujeto, en la que dicho al menos un antígeno se elige entre una lipoproteína, un lipopéptido, una proteína o péptido modificado con una secuencia de aminoácidos que presenta una mayor hidrofobicidad, y combinaciones de los mismos.

9. Composición, según la reivindicación 4, para utilizar en la obtención de un efecto adyuvante inmunoestimulador en el sujeto, que comprende además:

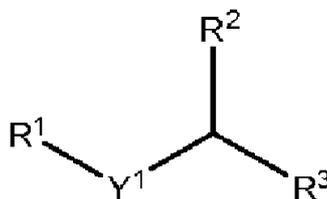
- una secuencia de aminoácidos unida a dicho al menos un antígeno, en la que la secuencia de aminoácidos de antígeno resultante no se encuentra en la proteína parental de la que se deriva el antígeno; o
- una secuencia de aminoácidos unida a dicho al menos un antígeno, en la que la secuencia de aminoácidos es una lisina unida covalentemente a una serina que está unida covalentemente a una serina.

10. Composición, según la reivindicación 4, para utilizar en la obtención de un efecto adyuvante inmunoestimulador en el sujeto, en la que dicho al menos un antígeno incluye un antígeno manipulado para incrementar la carga negativa en el antígeno.

11. Utilización de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

12. Composición que comprende al menos un lípido catiónico en una dosis suficiente para utilizar en la prevención o tratamiento de una enfermedad mediante la disminución de la población de células T reguladoras para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto.

13. Composición, según la reivindicación 12, para utilizar en la prevención o tratamiento de una enfermedad mediante la disminución de la población de células T reguladoras para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, en la que dicho al menos un lípido catiónico comprende un lípido catiónico no esteroideo que tiene una estructura representada por la fórmula:



en el que  $R^1$  es un grupo amonio cuaternario,  $Y^1$  se elige entre una cadena de hidrocarburo, un éster, una cetona, y un péptido,  $R^2$  y  $R^3$  se eligen independientemente entre un ácido graso saturado, un ácido graso insaturado, un hidrocarburo unido a éster, fósforo-diésteres, y combinaciones de los mismos.

14. Composición, según la reivindicación 12, para utilizar en la prevención o tratamiento de una enfermedad mediante la disminución de la población de células T reguladoras para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende además al menos un antígeno para formar un complejo de lípido catiónico/antígeno.

15. Composición, según la reivindicación 12, para utilizar en la prevención o tratamiento de una enfermedad mediante la disminución de la población de células T reguladoras para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, en la que dicho al menos un lípido catiónico se selecciona entre DOTAP, DOTMA, DOEPC, y combinaciones de los mismos.

16. Utilización de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad mediante la disminución de la población de células T reguladoras para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto.

17. Composición, según la reivindicación 1, para utilizar en la que el lípido catiónico es DOTAP.

18. Utilización de una composición, según la reivindicación 17, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria.

19. Utilización de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o cualquiera de las reivindicaciones 12-15, o la reivindicación 17, para la fabricación de un medicamento para obtener un efecto adyuvante inmunoestimulador en un sujeto, incluyendo el efecto células T o anticuerpos o combinaciones de los mismos.

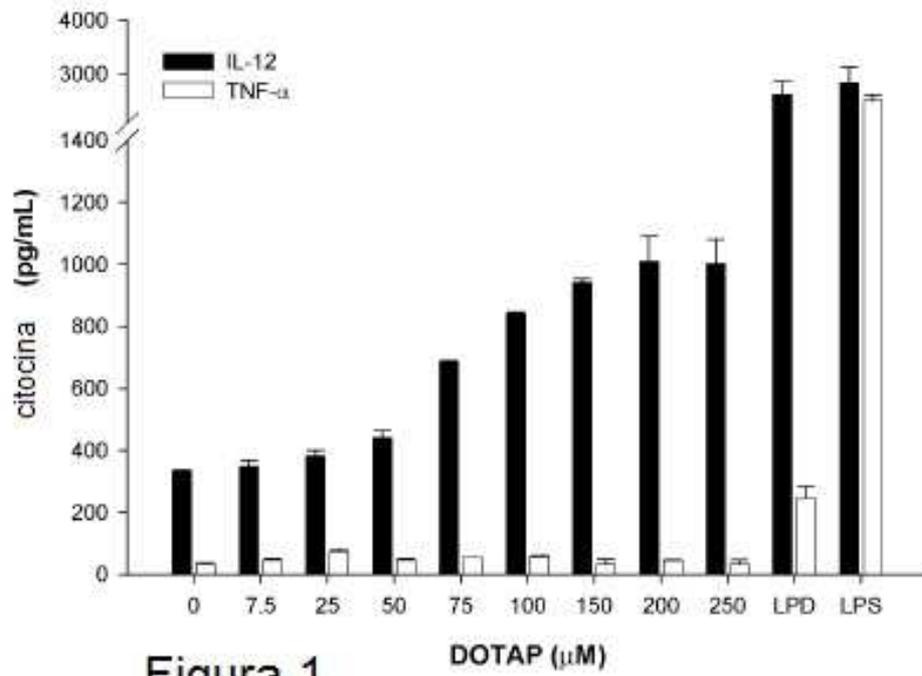


Figura 1

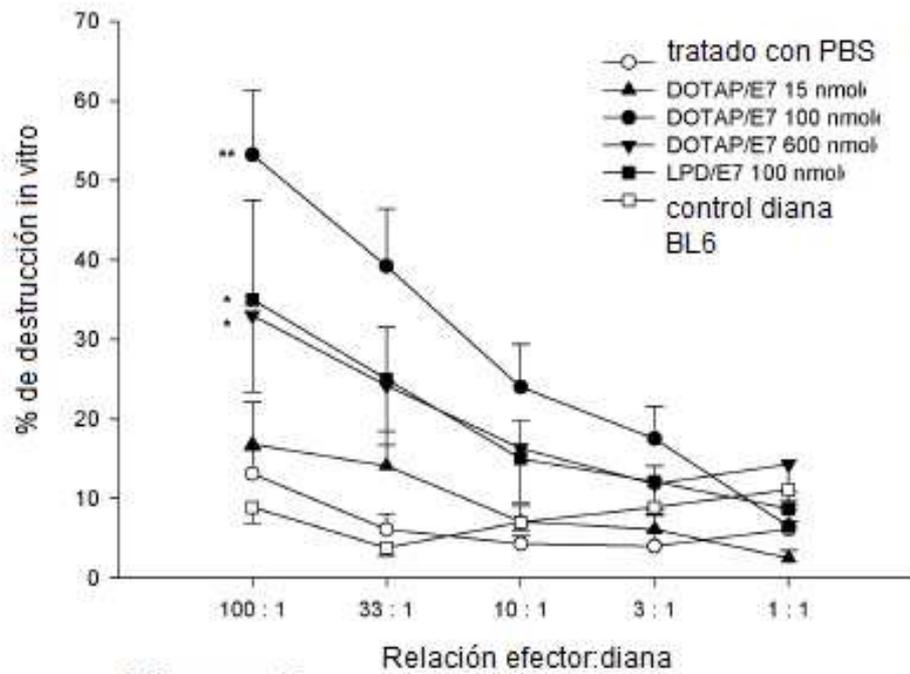


Figura 2

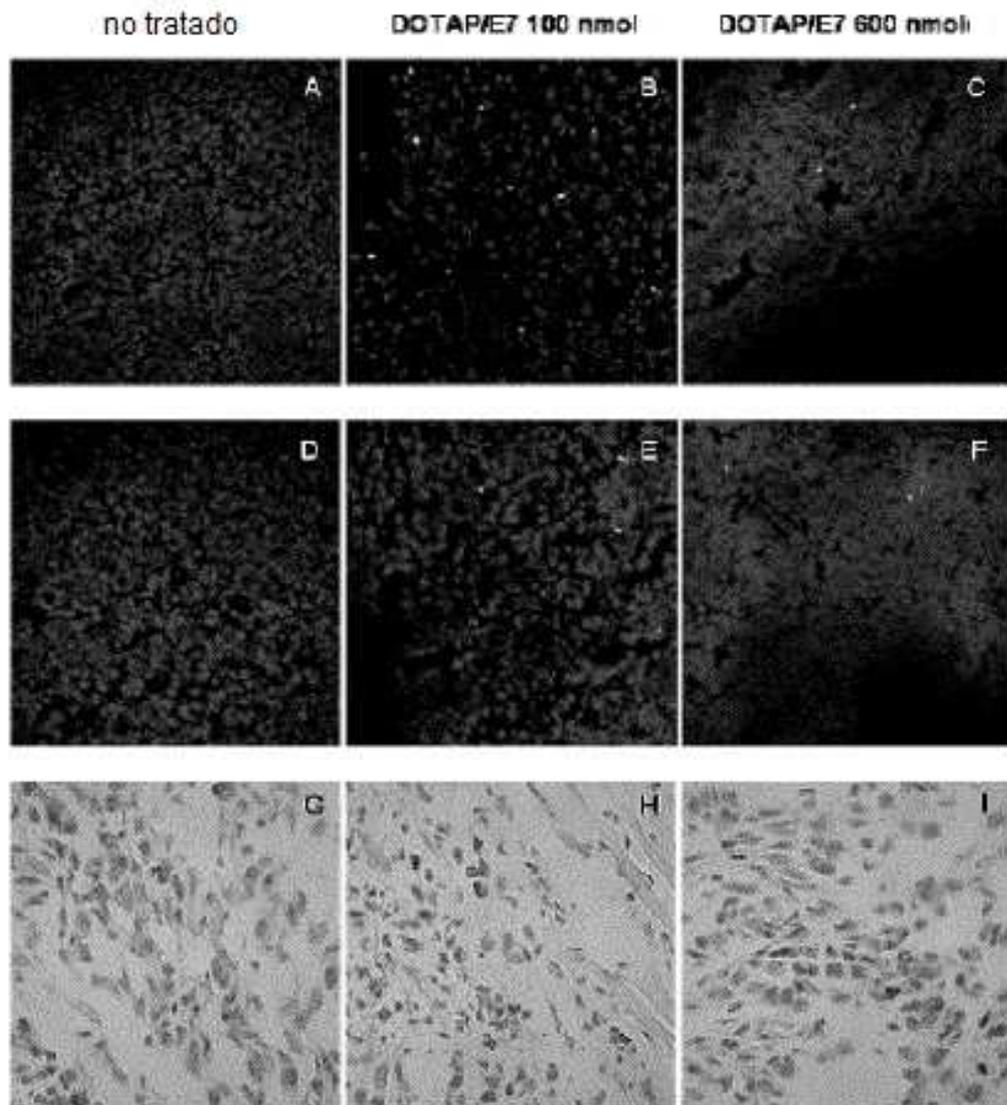


Figura 3

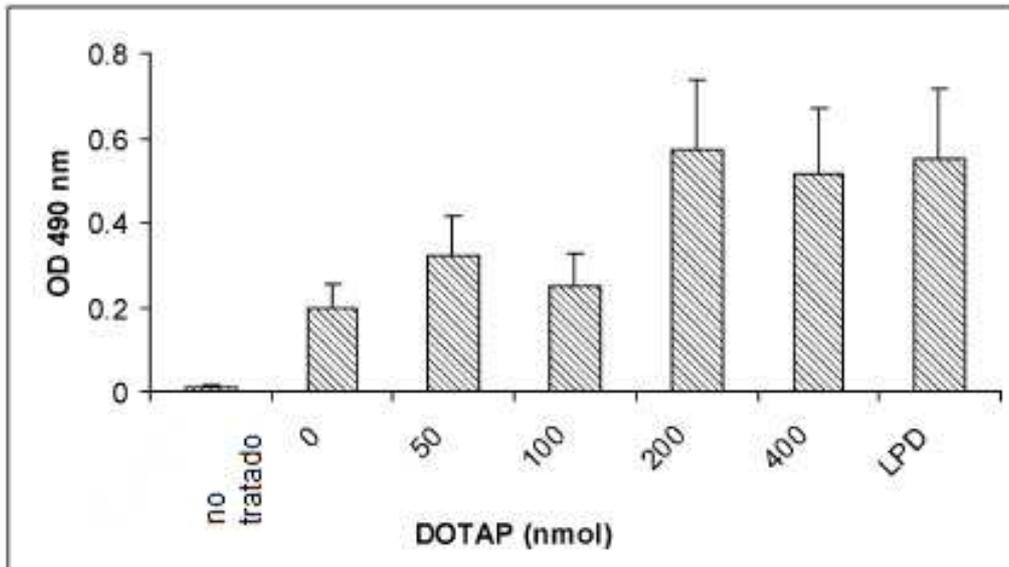


Figura 4

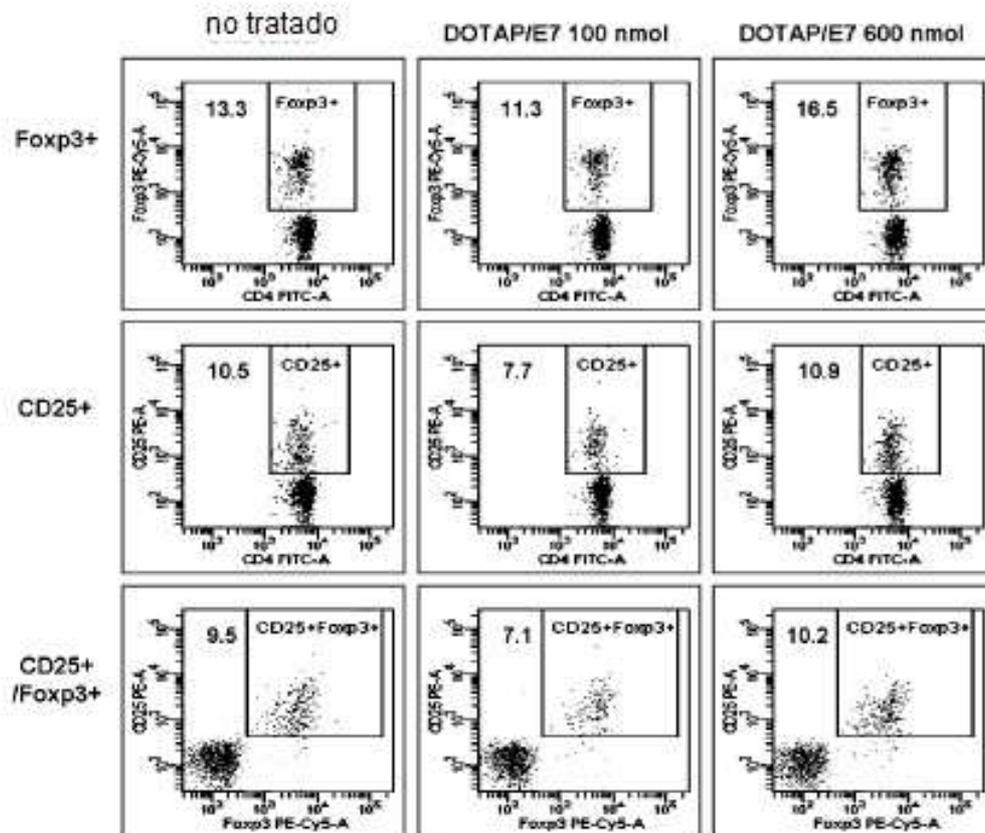


Figura 5

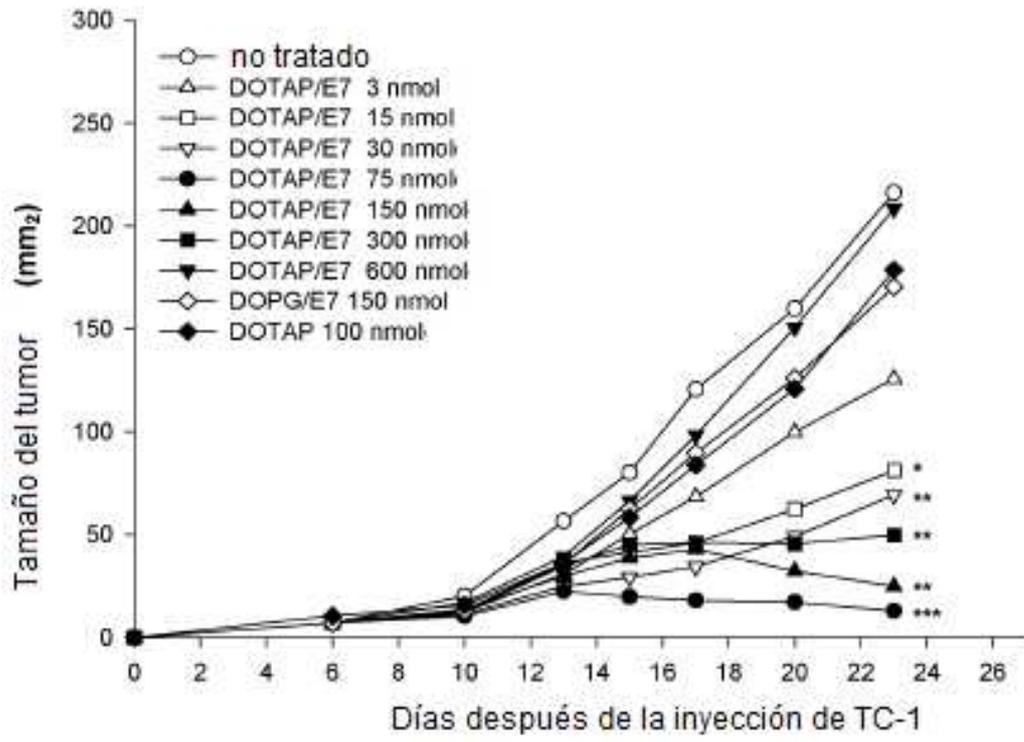


Figura 6

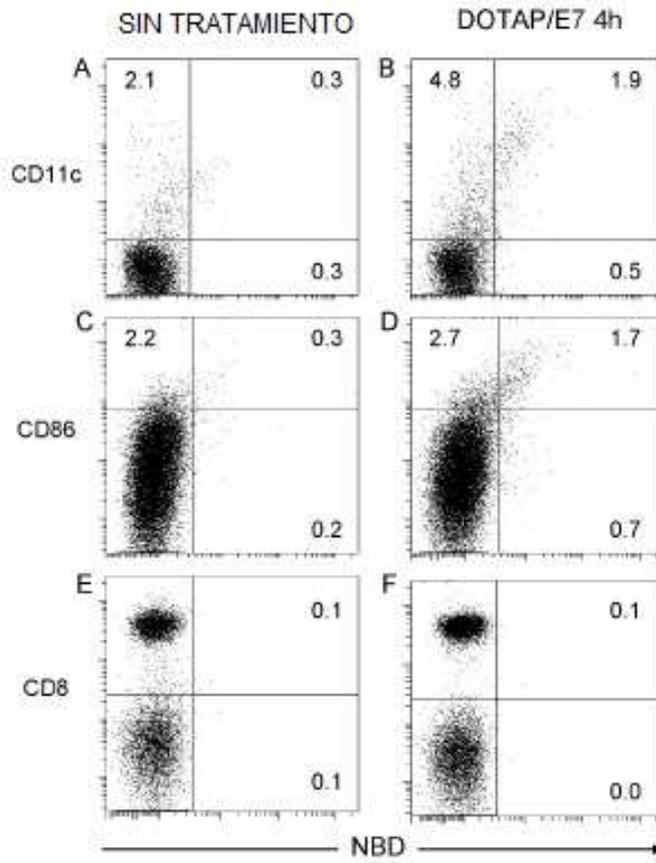


Figura 7

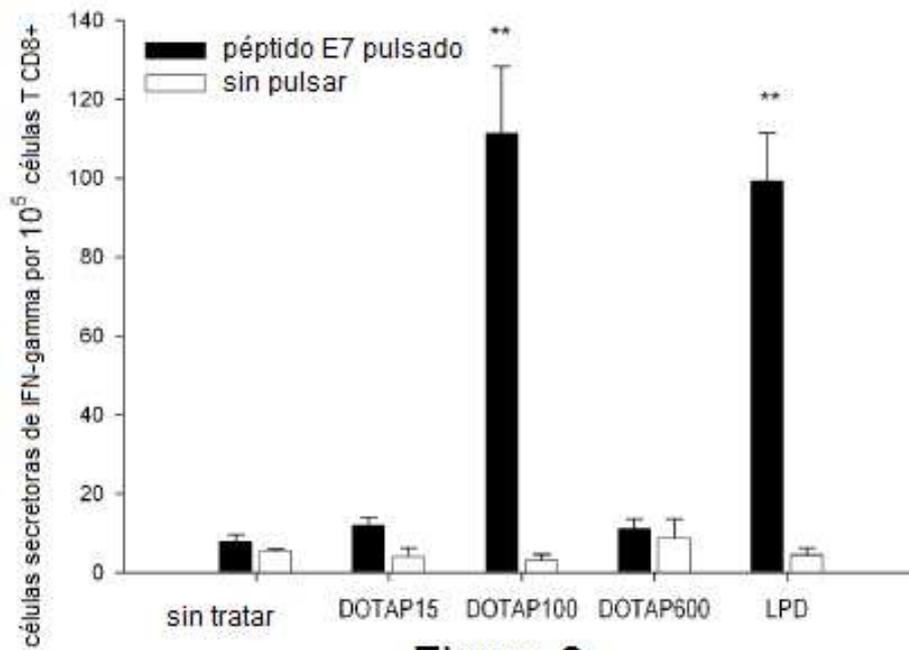


Figura 8

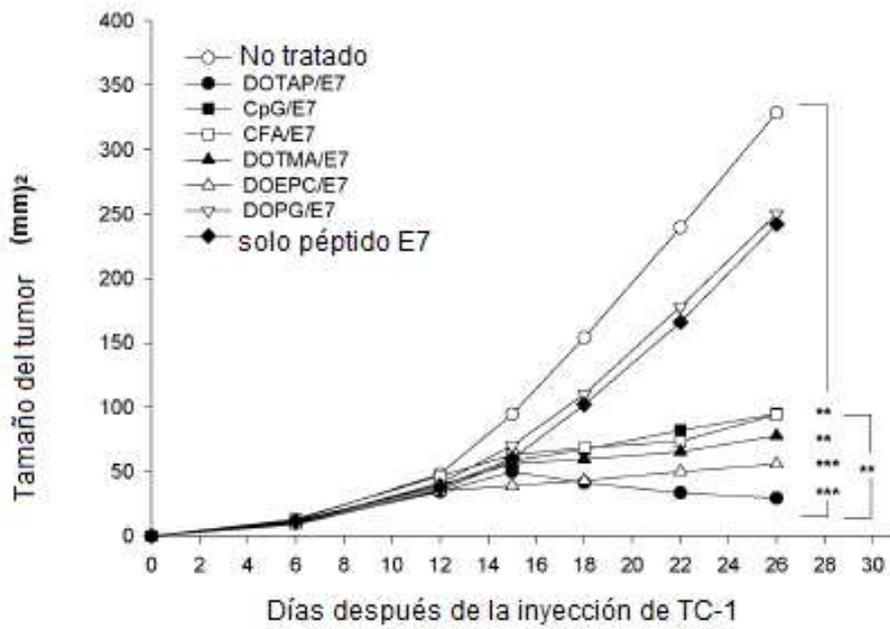


Figura 9

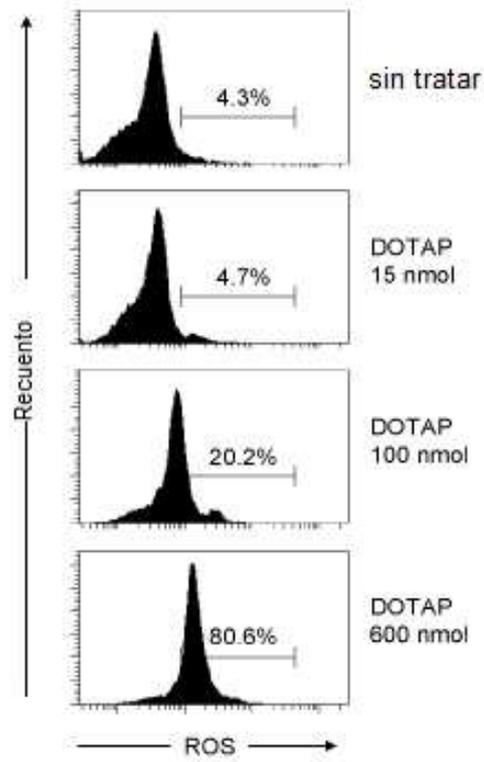


FIG. 10A

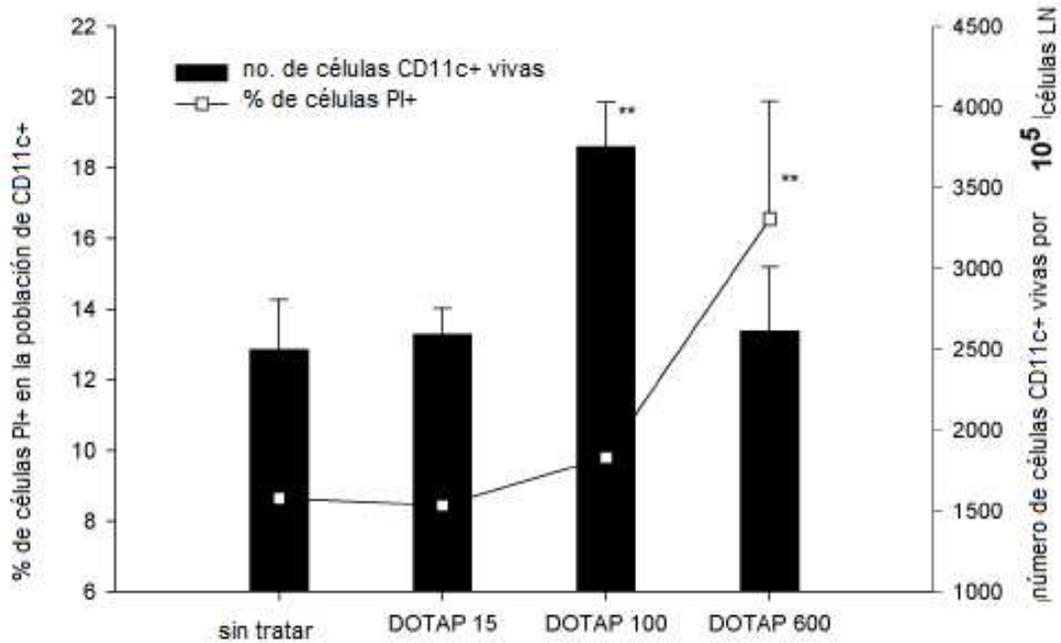


Figura 10B

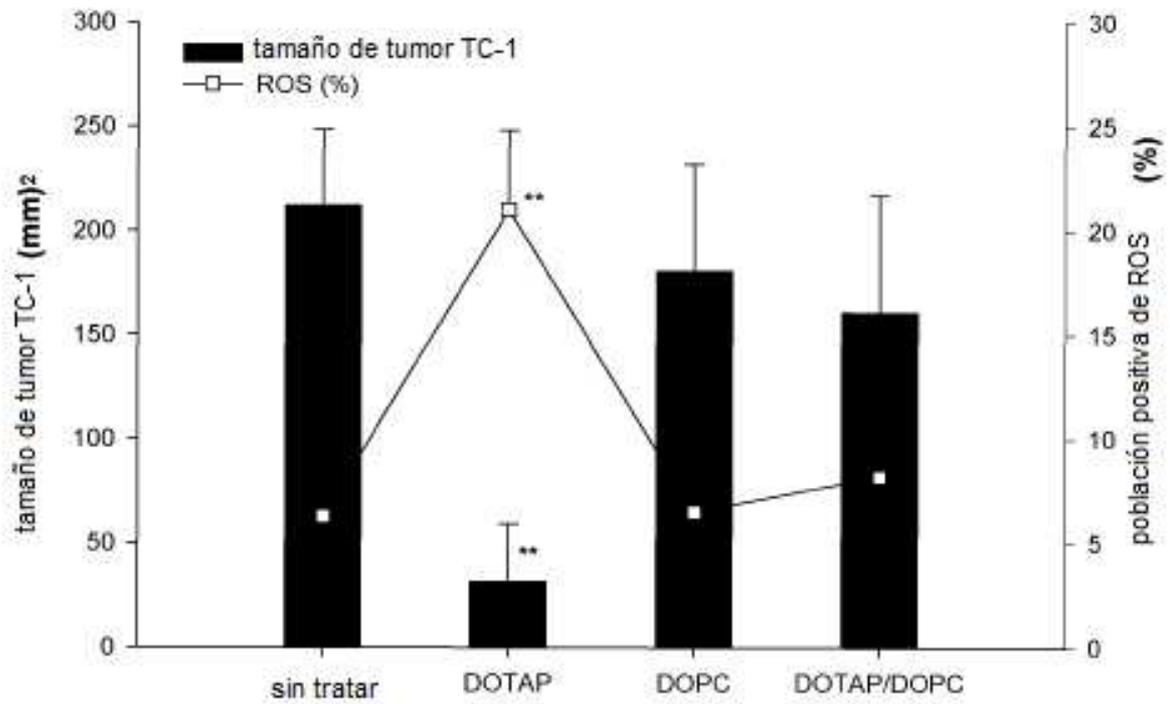


Figura 10C

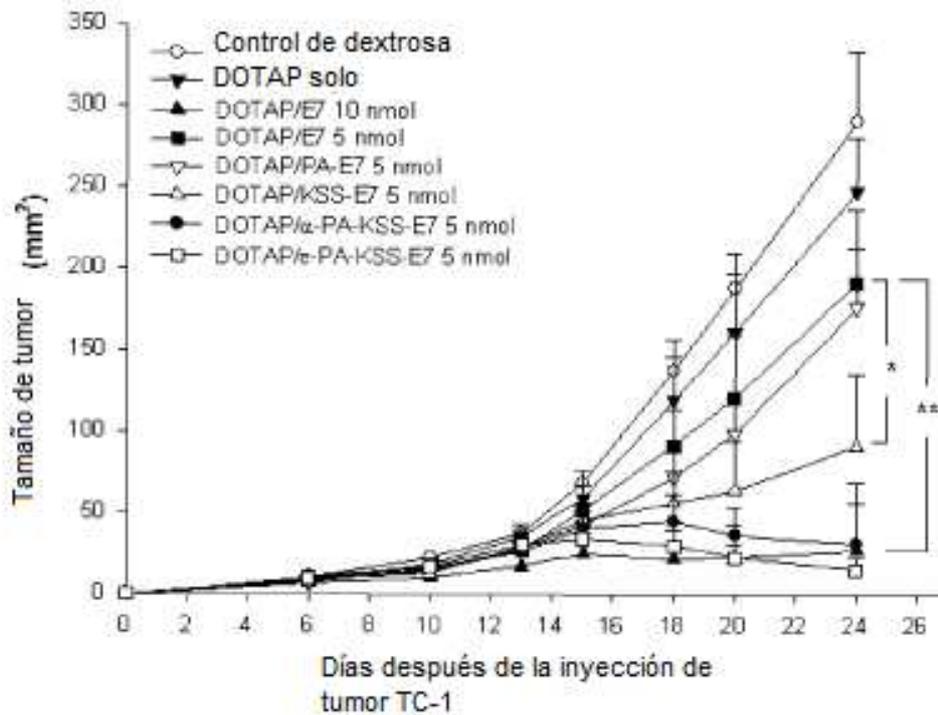


Figura 11

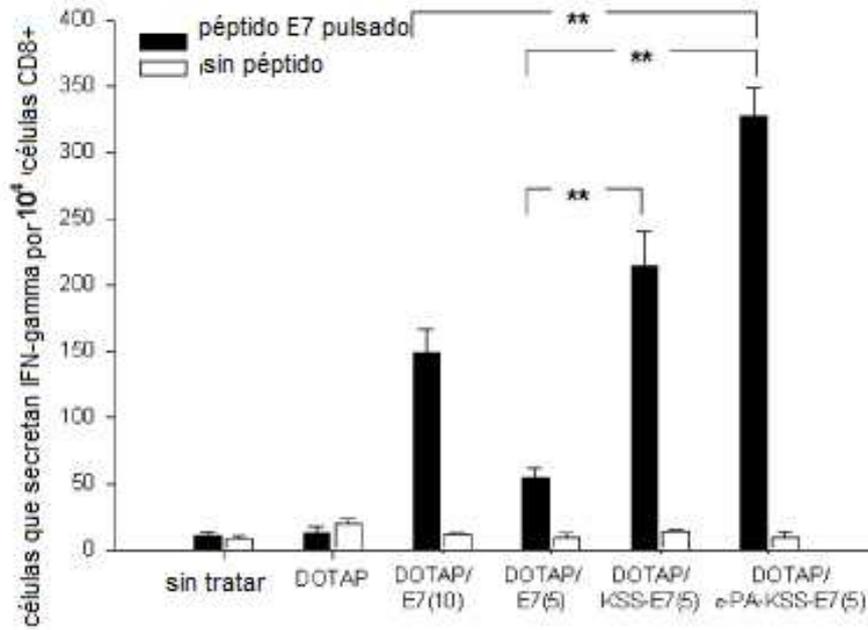


Figura 12

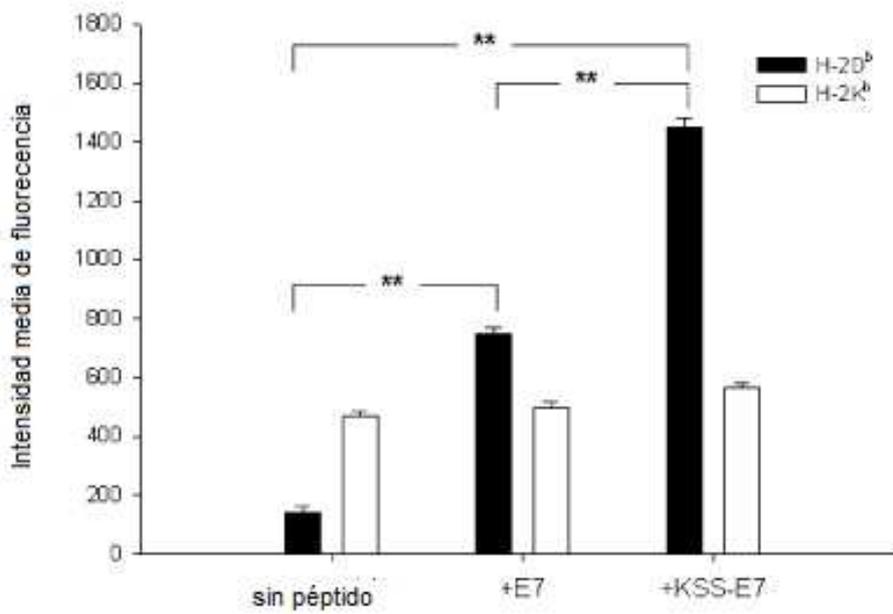


Figura 13

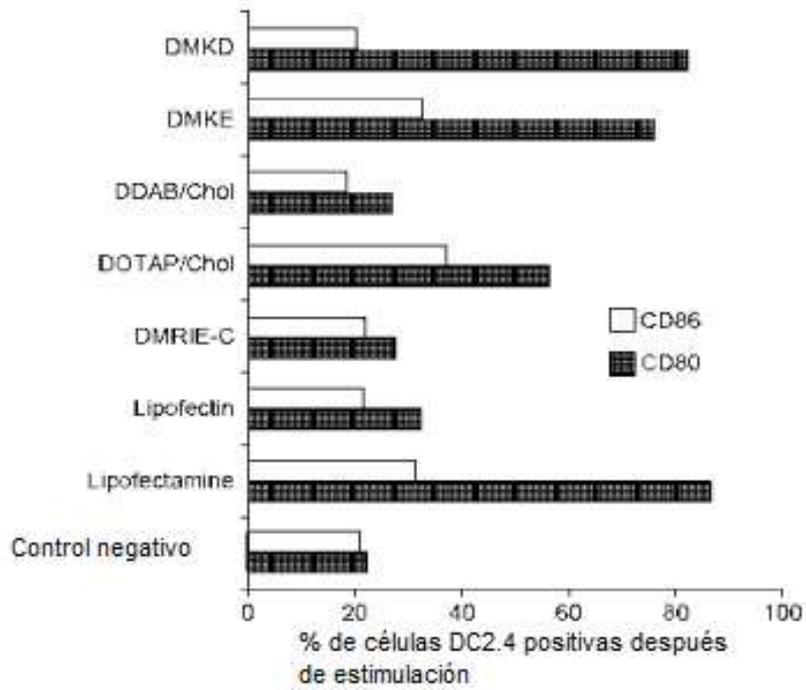


Figura 14A

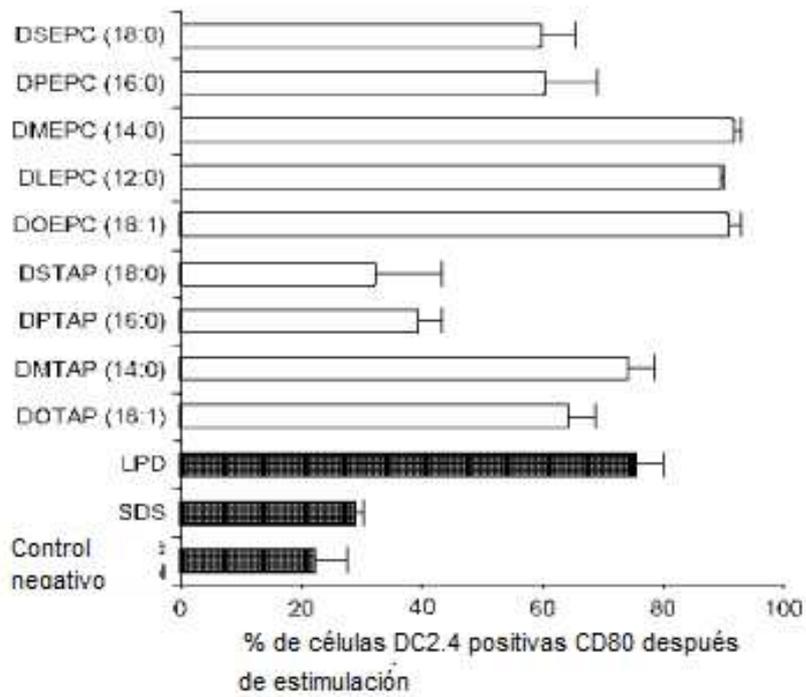


Figura 14B

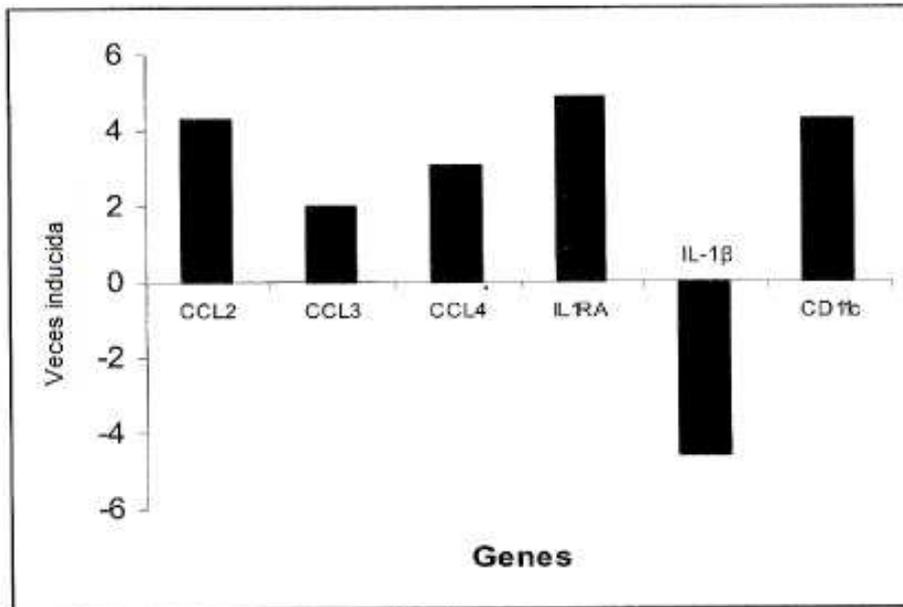


Figura 15A

Activación de quimiocinas por lípidos catiónicos

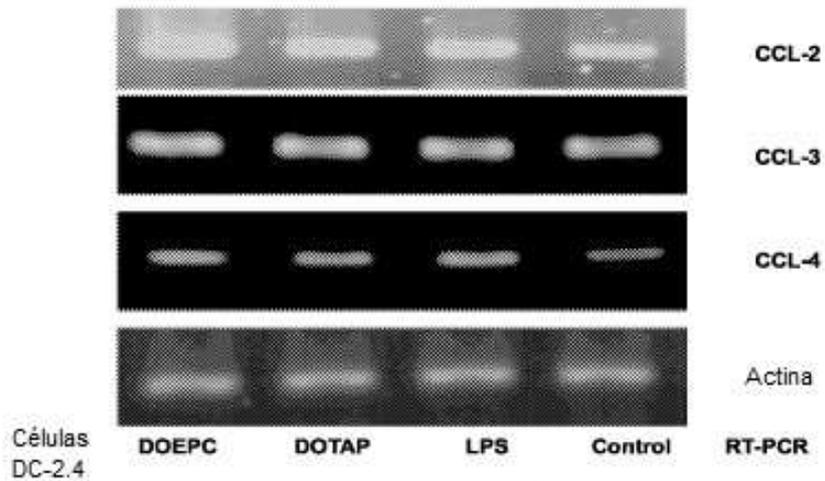


Figura 15B

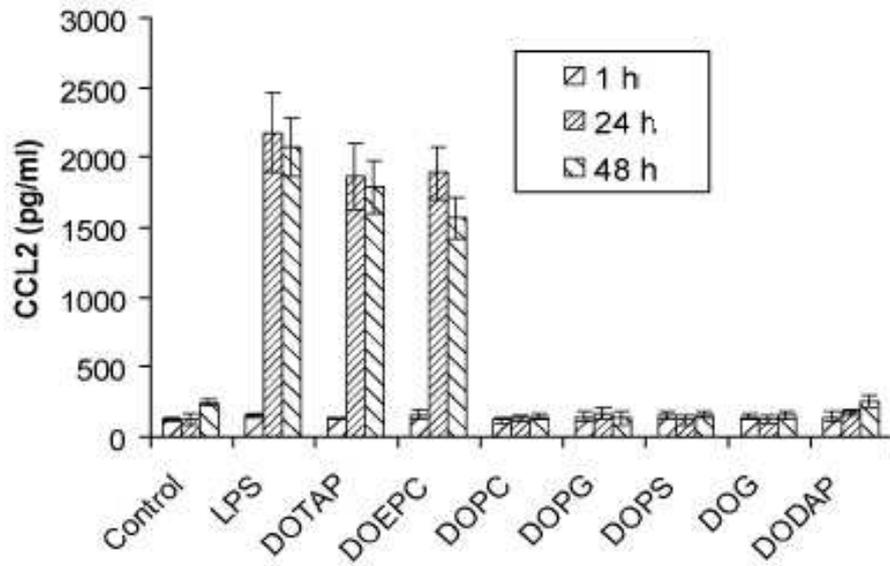


Figura 16

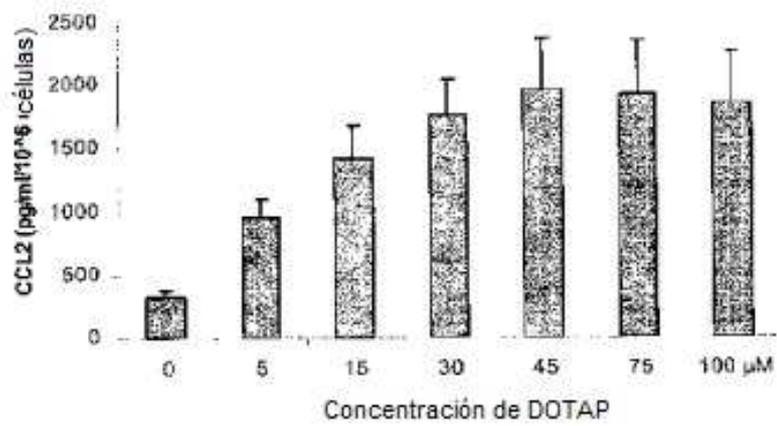


Figura 17

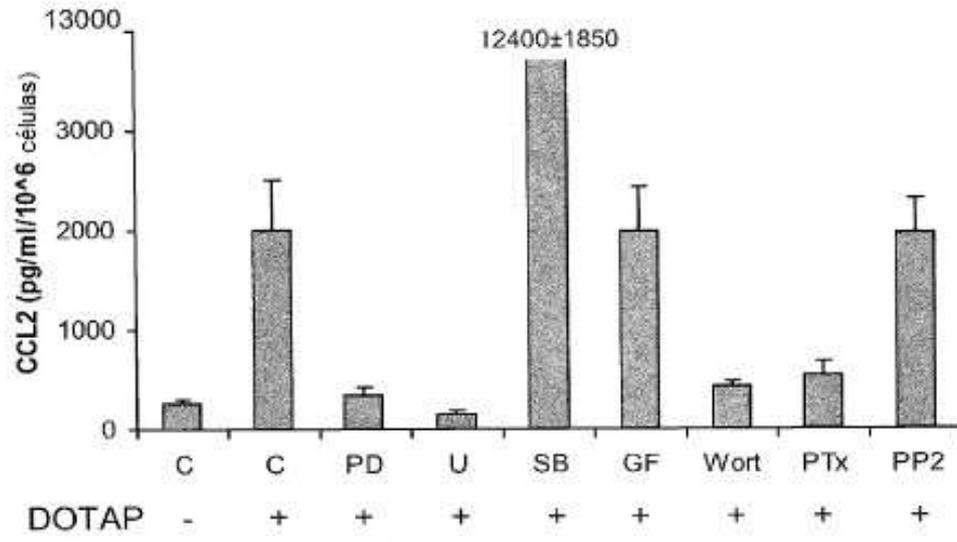


Figura 18

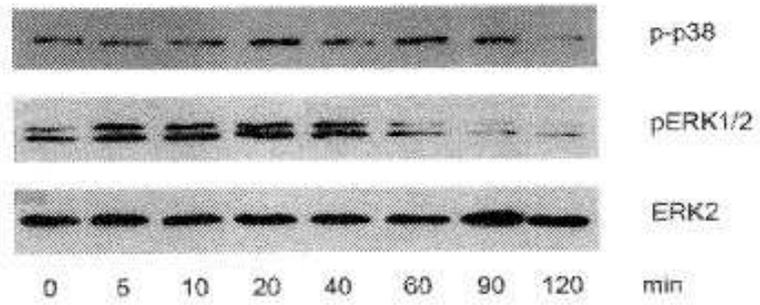


Figura 19A

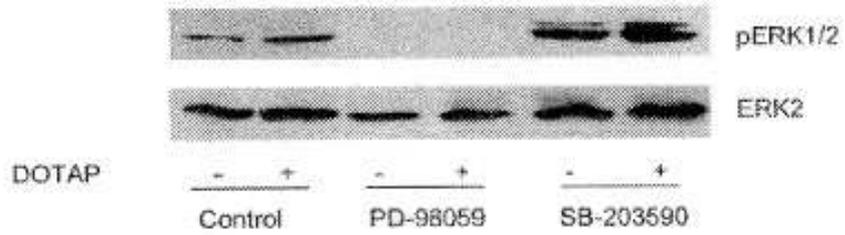


Figura 19B

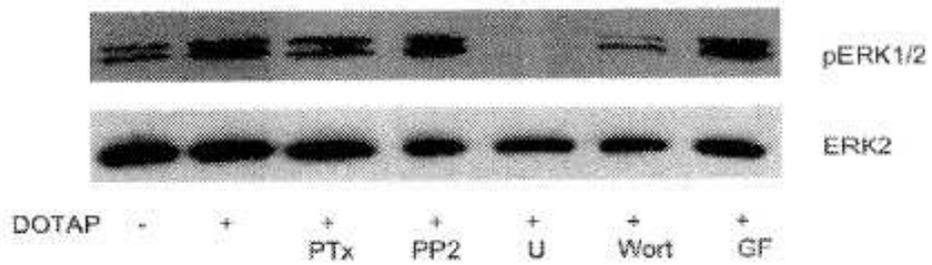


Figura 19C

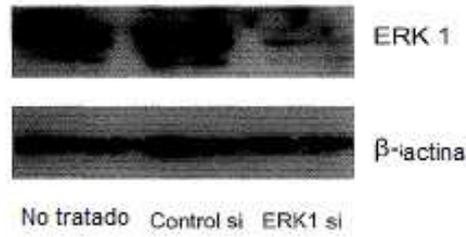


Figura 20A

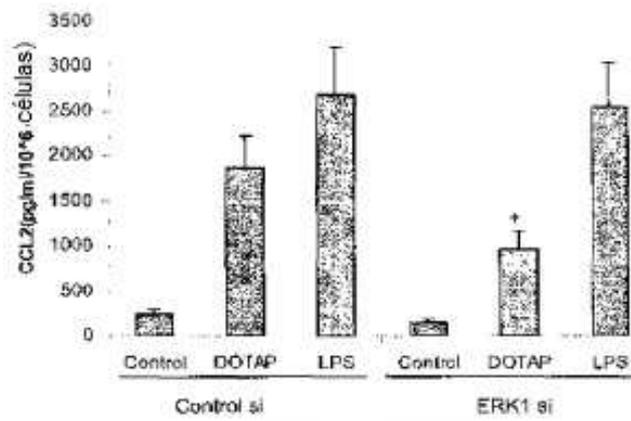


Figura 20B

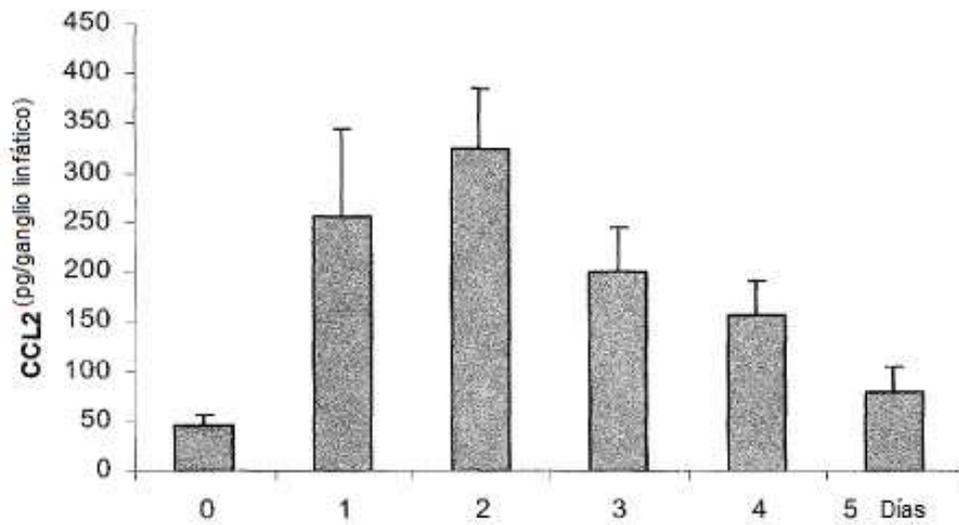


Figura 21A

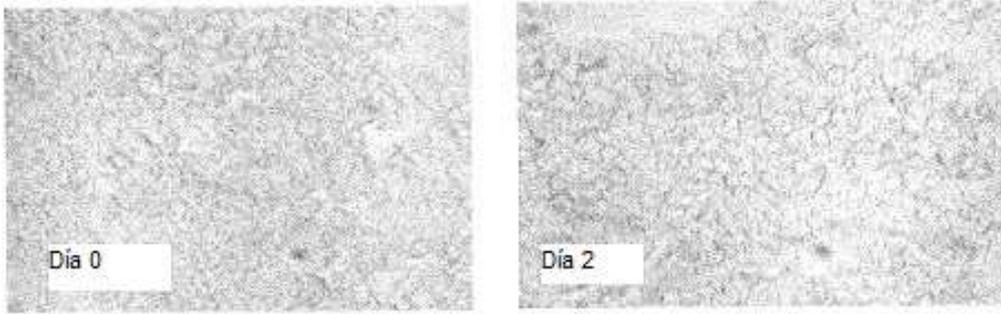


Figura 21B

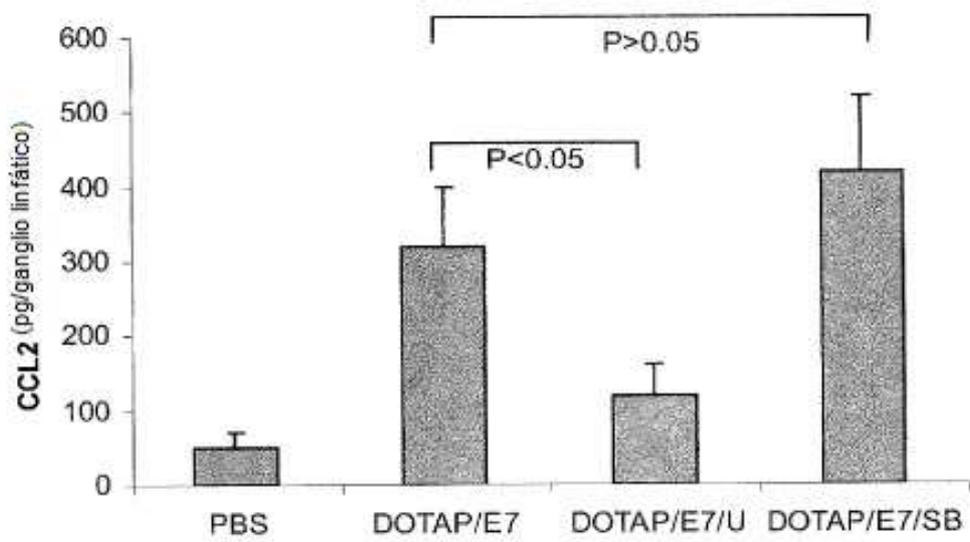


Figura 22A

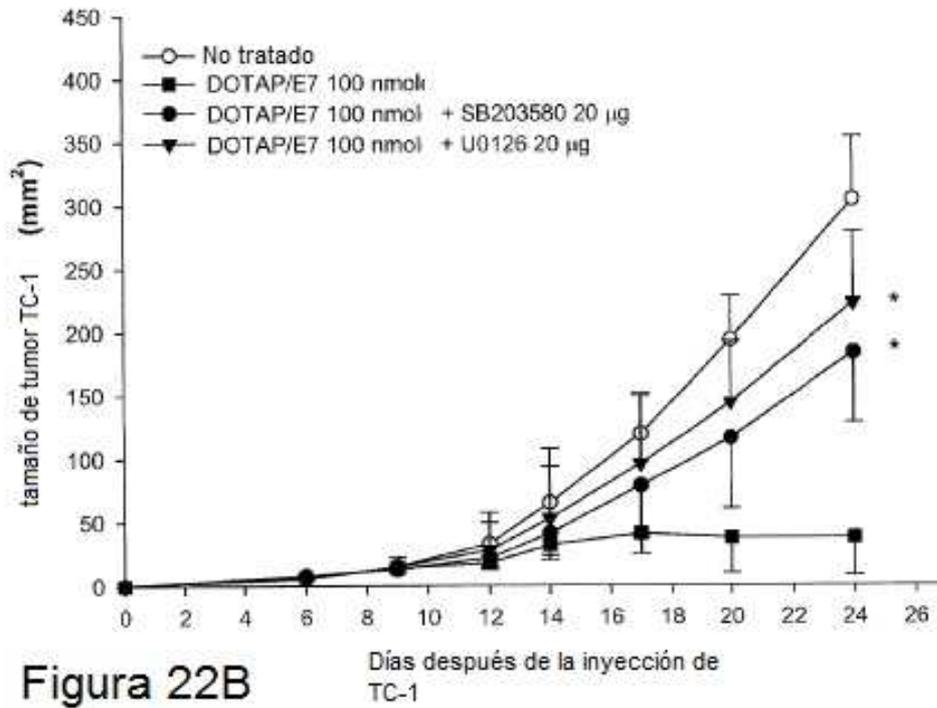


Figura 22B

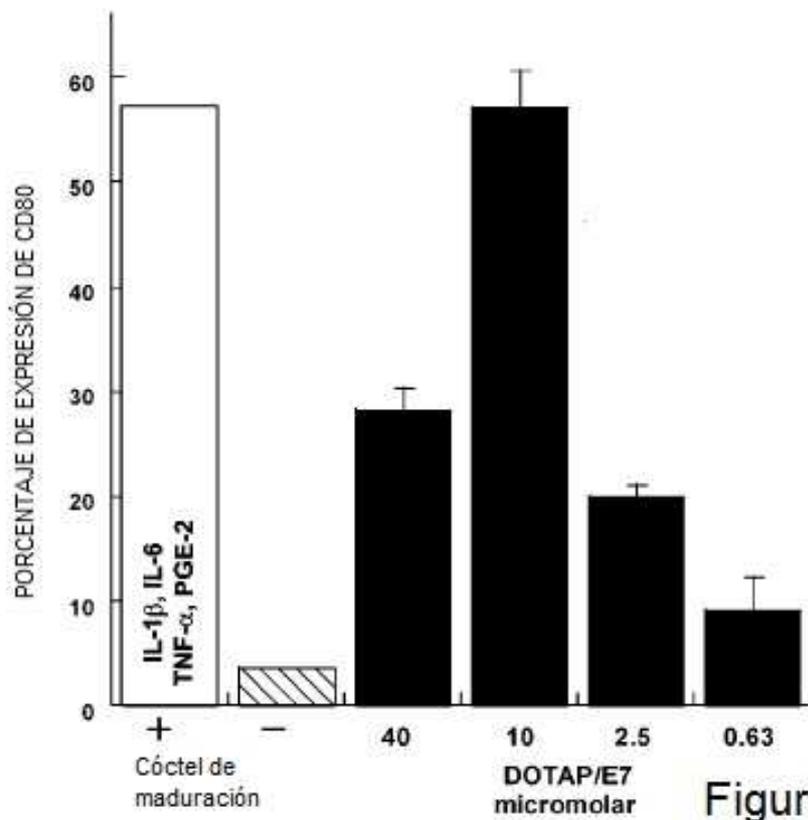


Figura 23A

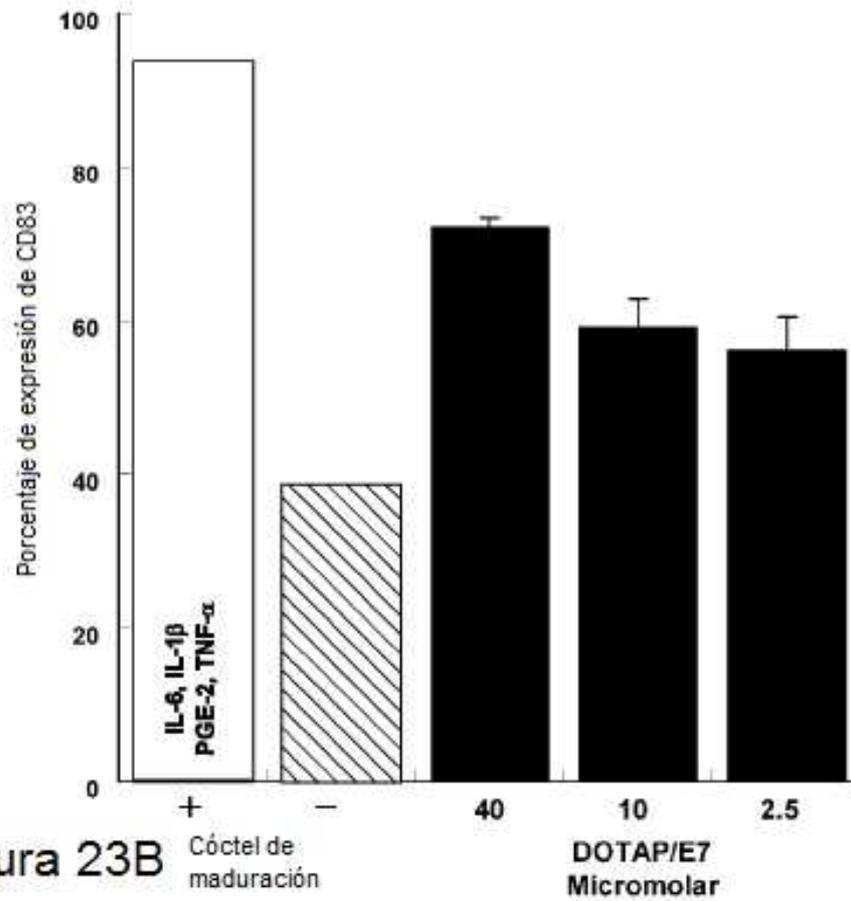


Figura 23B

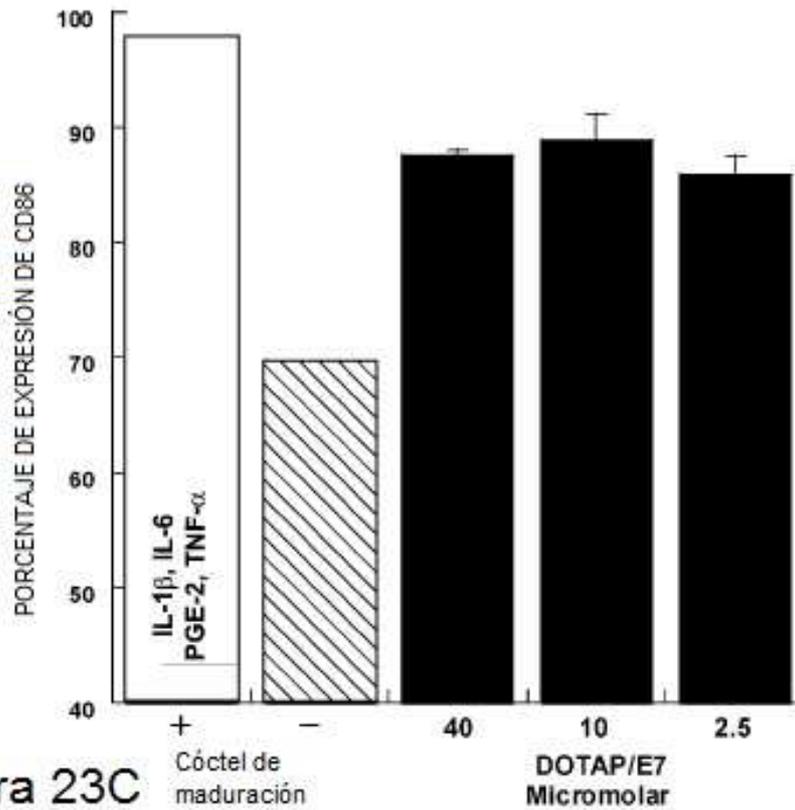


Figura 23C

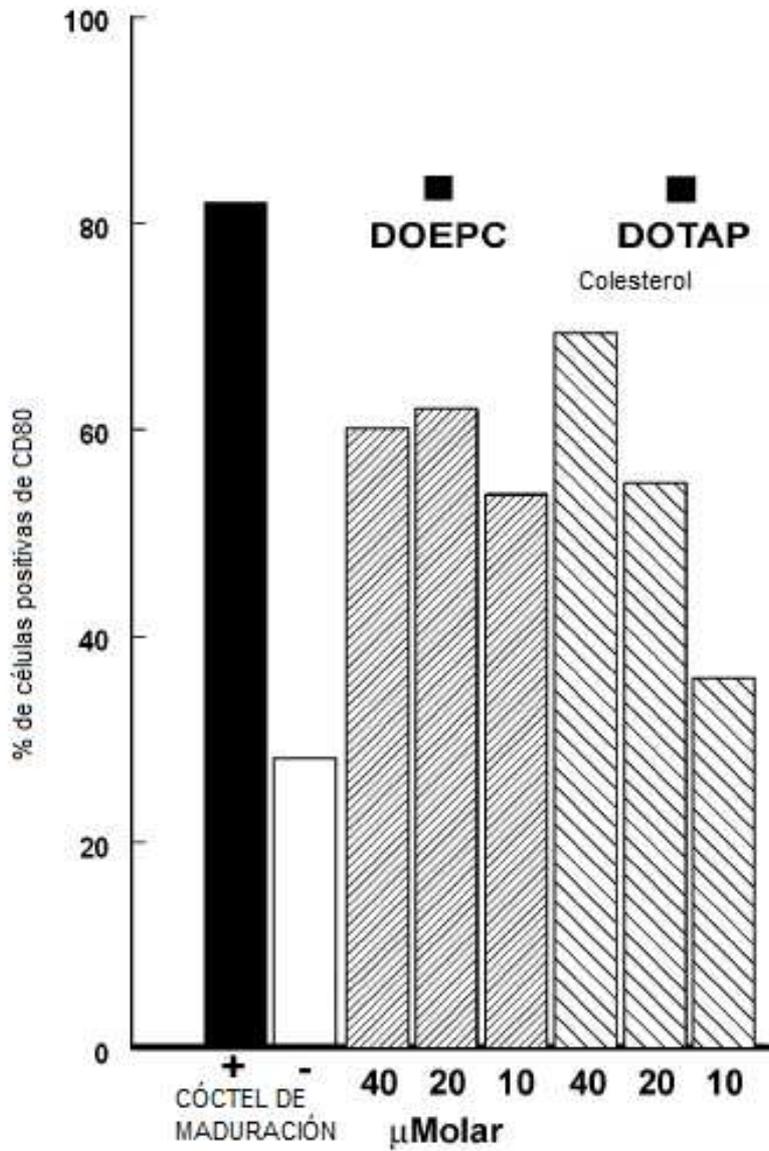


Figura 23D

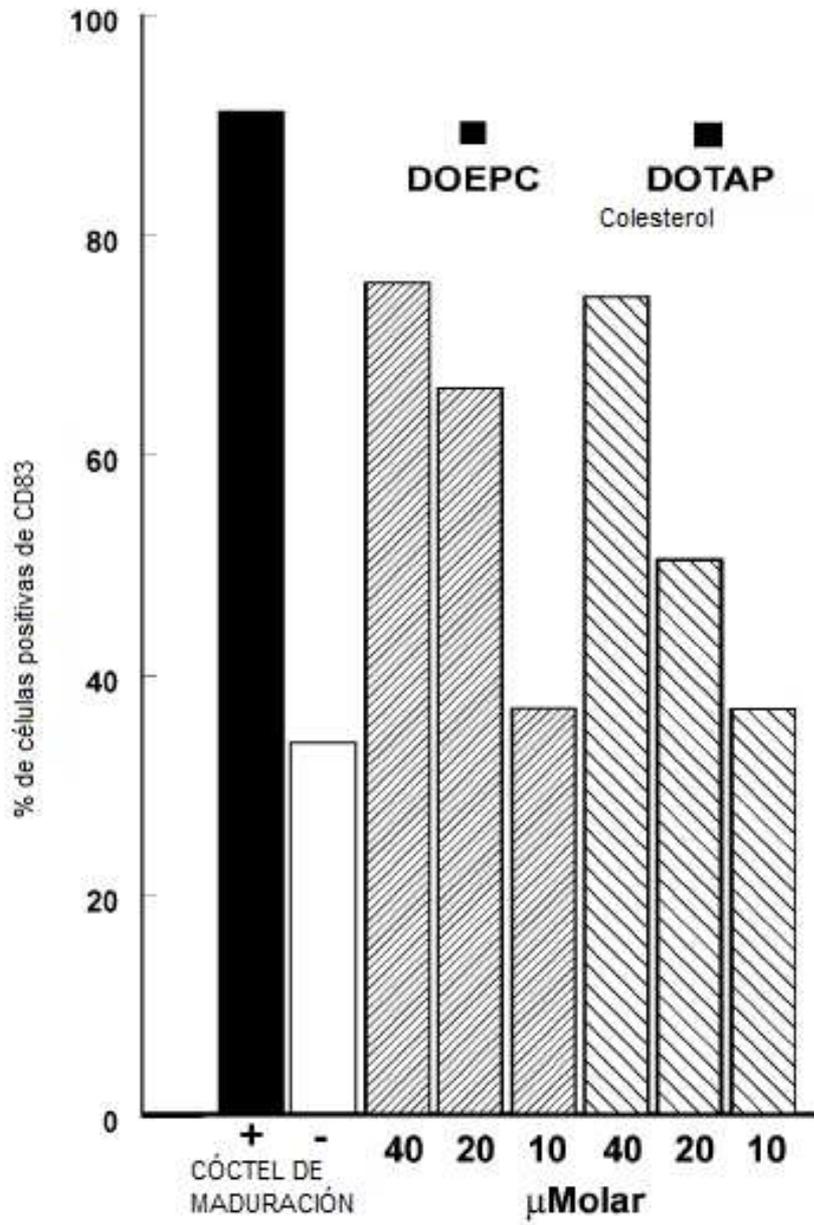


Figura 23E

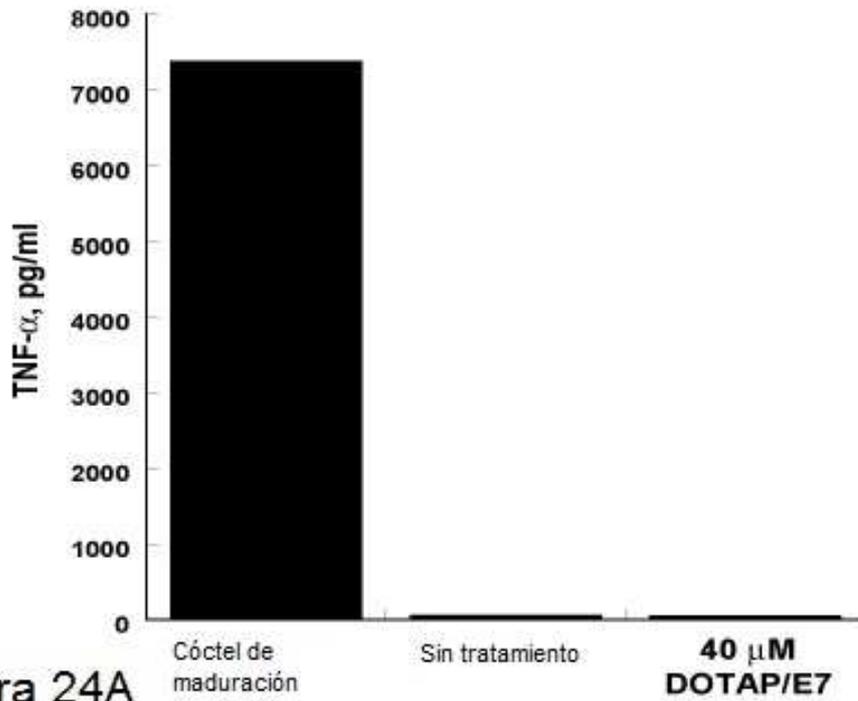


Figura 24A

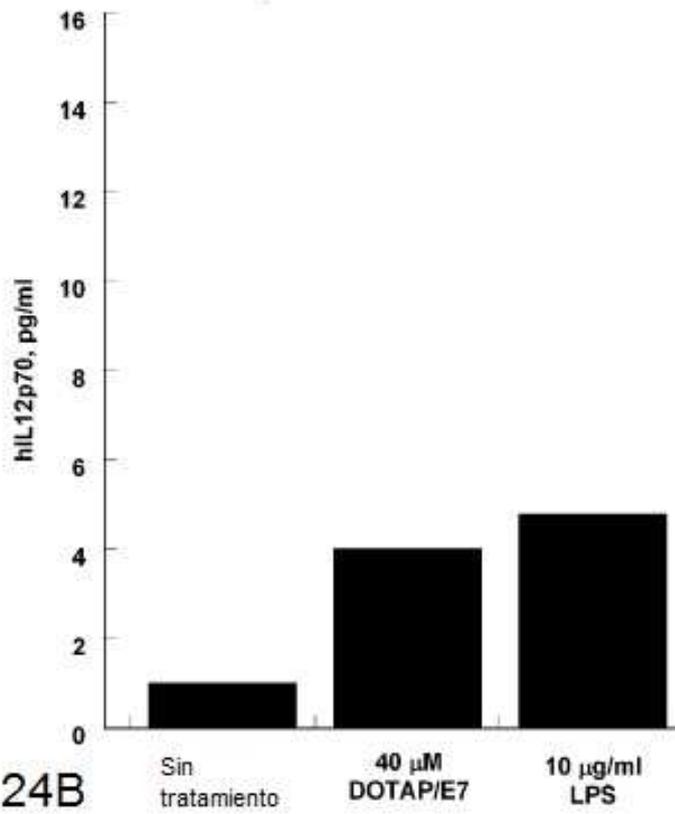


Figura 24B

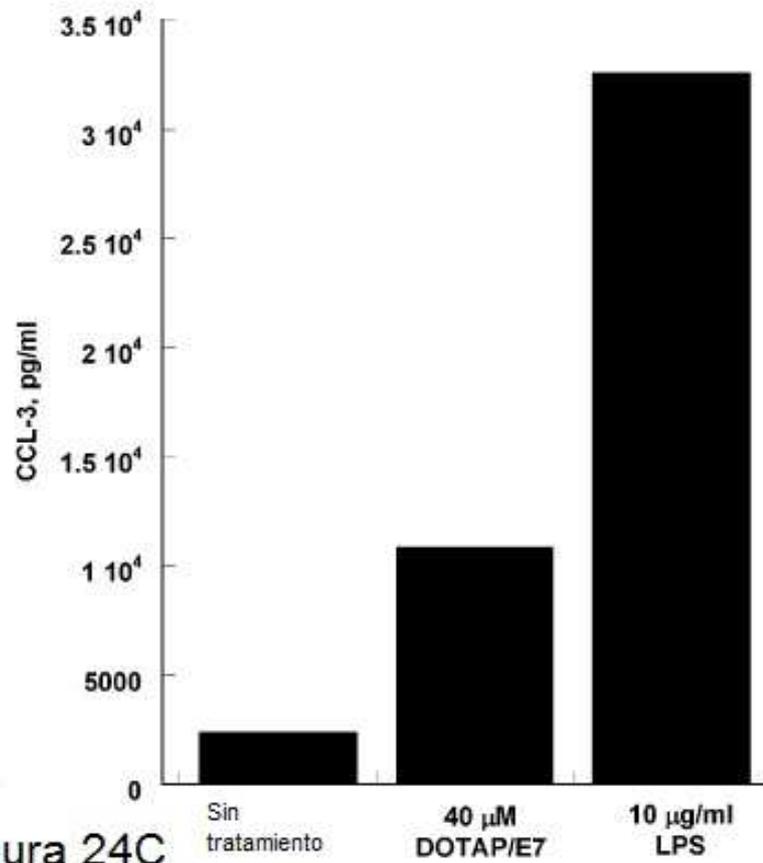


Figura 24C

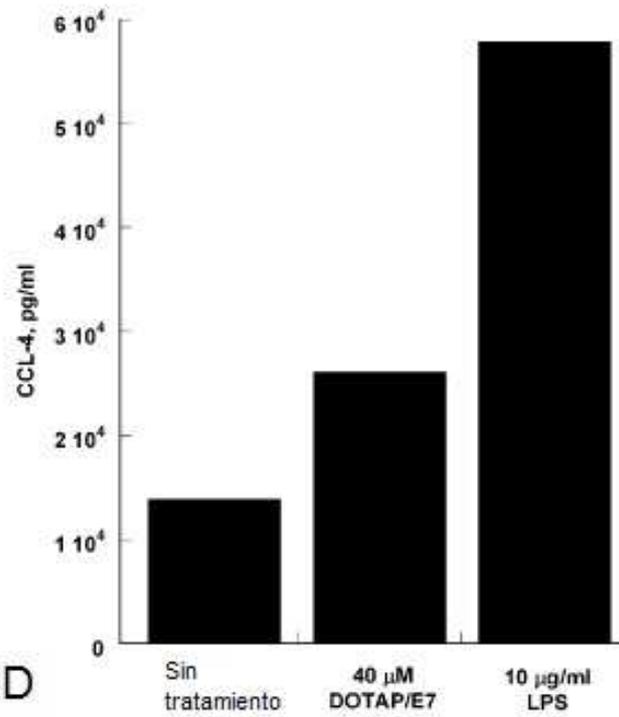


Figura 24D

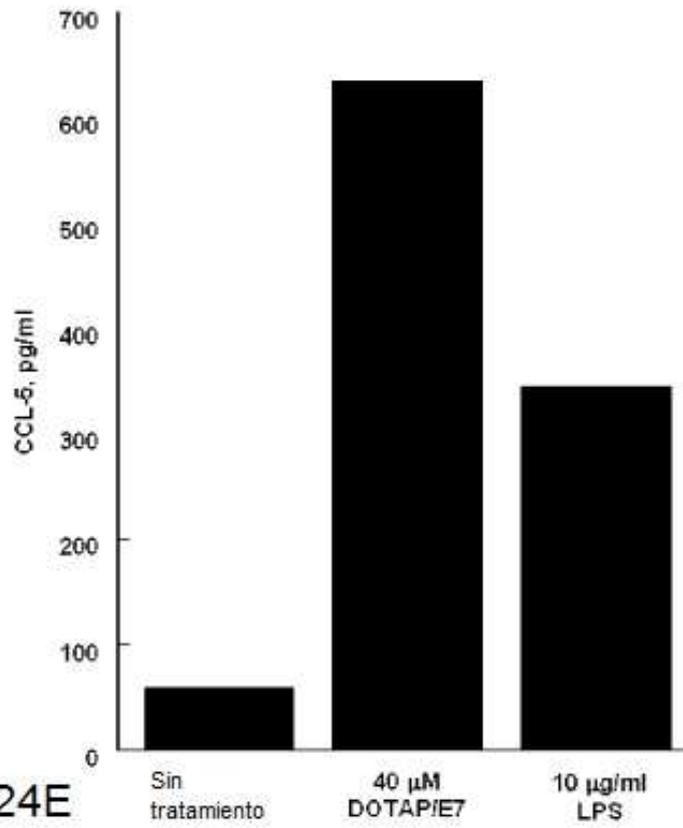


Figura 24E

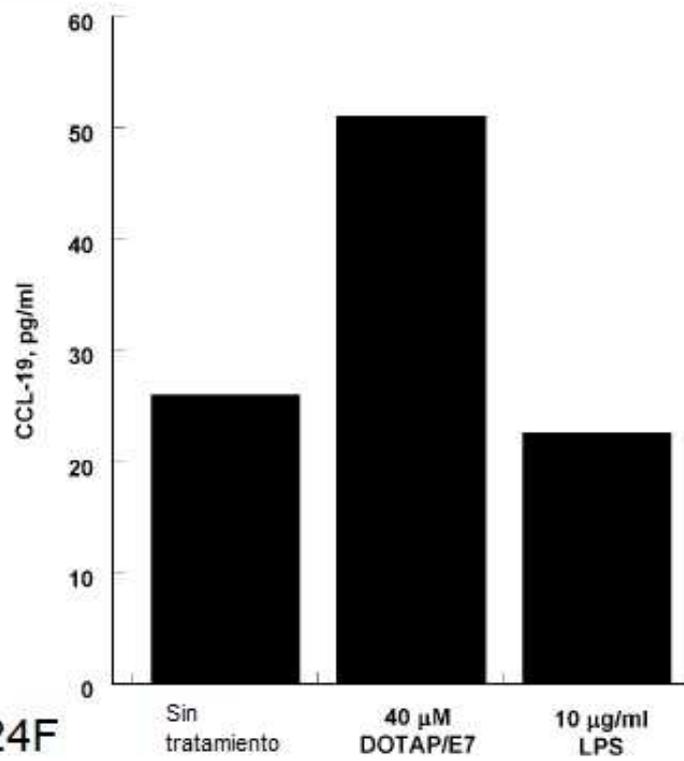


Figura 24F

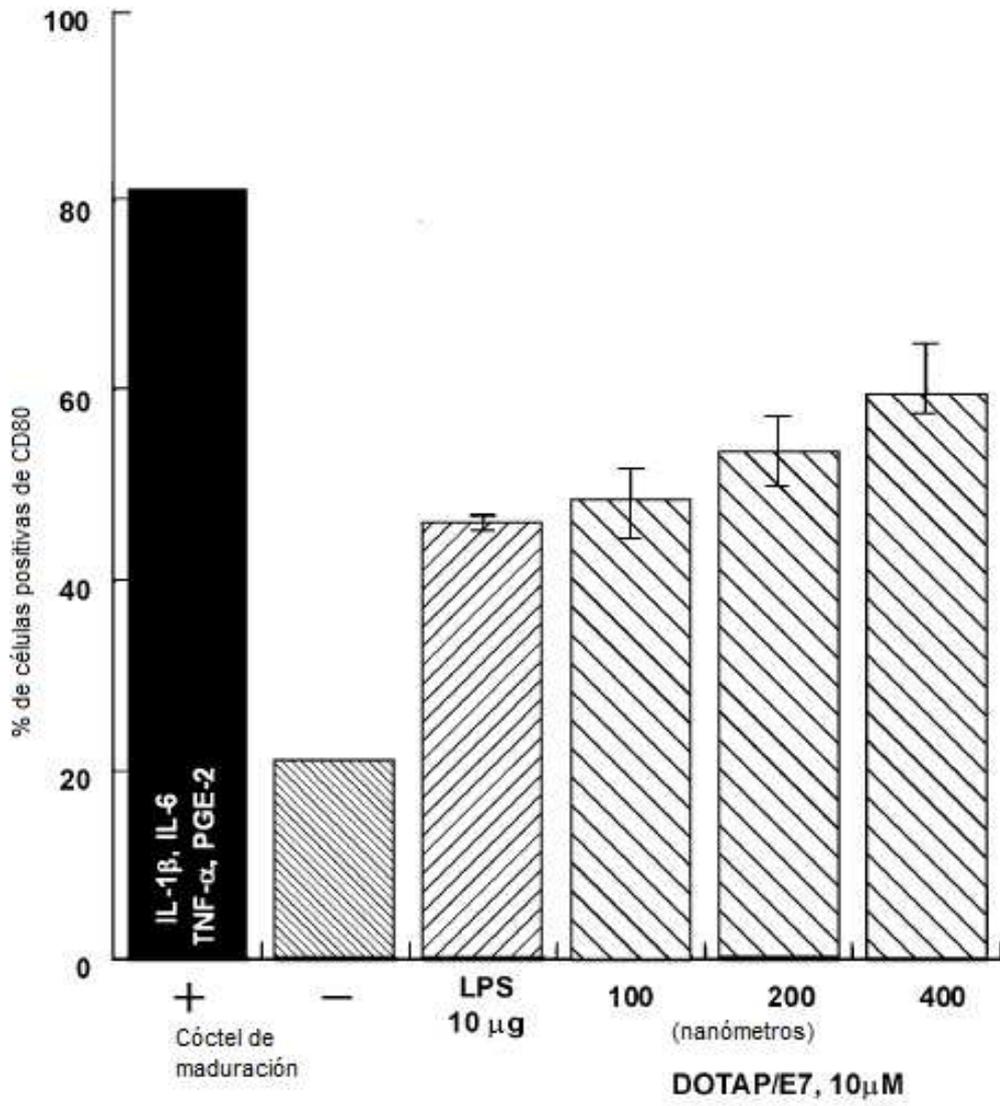


Figura 25A

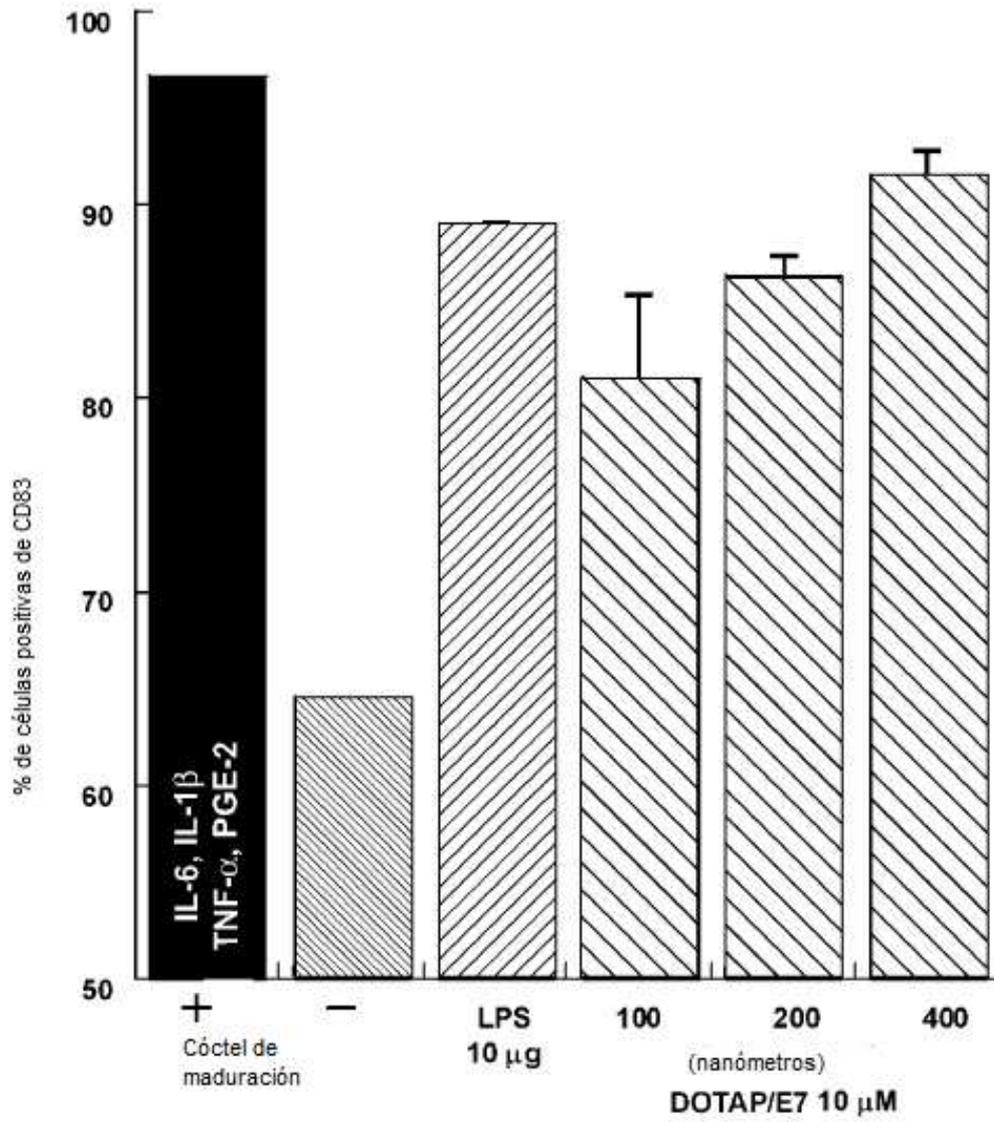


Figura 25B