

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 505**

51 Int. Cl.:

A61K 31/685 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2009** **PCT/US2009/040500**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009** **WO09129227**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2009** **E 09733034 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 2276495**

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

30 Prioridad:

17.04.2008 US 45837

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

13.05.2019

73 Titular/es:

PDS BIOTECHNOLOGY CORPORATION (100.0%)
500 Industrial Drive, Suite A
Lawrenceburg, IN 47906-47025, US

72 Inventor/es:

VASIEVICH, ELIZABETH, ANN;
CHEN, WEIHSU;
TONEY, KENYA;
CONN, GREGORY;
BEDU-ADDO, FRANK y
HUANG, LEAF

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 712 505 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 enantiómeros de lípidos catiónicos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a la estimulación de una respuesta inmunitaria, y más particularmente a la utilización de R-DOTAP en la estimulación de respuestas inmunitarias.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta sección pretende introducir al lector en varios aspectos de la técnica que pueden estar relacionados con diversos aspectos de la presente invención, que se describen y/o reivindican a continuación. Esta descripción se cree que es útil para proporcionar al lector información sobre antecedentes para facilitar una mejor comprensión de los diversos aspectos de la presente invención. En consecuencia, se debe entender que estas afirmaciones han de ser leídas desde este punto de vista, y no como admisiones de la técnica anterior.

El desarrollo de inmunoterapias eficaces y seguras para uso humano sigue siendo una necesidad médica urgente para pacientes en todo el mundo. Con el fin de obtener respuestas inmunitarias apropiadas, se pueden utilizar modificadores inmunológicos ("inmunomodificadores") que mejoran, dirigen o promueven 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 células presentadoras de antígeno ("APC") del sistema inmunitario y/o el antígeno es débilmente inmunogénico. Por lo tanto, las inmunoterapias que liberan eficazmente antígenos a APC y también estimulan el sistema inmunitario para responder al antígeno son necesarias, los inmunomodificadores tienen el potencial de funcionar como tales en inmunoterapia. Tales inmunoterapias pueden tener estos y otros beneficios. Por ejemplo, cuando se incluye como parte de una vacuna terapéutica, un inmunomodificador debería al menos (1) mejorar la liberación y/o procesamiento de antígeno en 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 respuestas inmunitarias al antígeno de la 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 para una vacuna efectiva [Vogel, F.R. *Improving vaccine performance with adjuvants*. Clin Infect Dis 30 Supl. 3: S266 (2000)], (4) aumentar la vida media biológica o inmunológica del antígeno de la vacuna, y (5) superar la tolerancia inmunitaria a 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)].

Actualmente, la clase principal de agentes utilizados para aumentar la eficacia de antígenos, tales como antígenos de péptidos o proteínas, en la obtención de una respuesta inmunitaria son adyuvantes, tales como emulsiones de agua-en-aceite, alumbre y otros productos químicos que potencian respuestas del antígeno; sin embargo, estos adyuvantes no son inmunomodificadores, tal como se describe anteriormente, ya que 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 tales adyuvantes están disponibles para su uso en animales y algunos de ellos han sido probados en ensayos clínicos. Además de los adyuvantes tradicionales, tales como las sales de aluminio, se están comercializando productos, tales como virosomas de la gripe [Gtuck, R., y Walti, E. 2000. Biophysical validation of Epaxal Borna, 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 immunological responses to human immunodeficiency virus (HIV) type ISF3 gp120 subunit vaccine combined with MF59 adjuvant with or without mummy I tripeptide dipalmitoyl phosphatidylethanolamine in non-HIV-infected human volunteers. J Infect Dis 170: 1288 (1994)], que tienen efectos inmunitarios intrínsecos. 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 ensayos clínicos sobre vacunas contra VHS y 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 aumentar las respuestas de células T. Por lo tanto, se necesitan nuevos procedimientos para estimular respuestas inmunitarias mediadas por células.

Además, como se mencionó anteriormente, algunos antígenos son estimuladores débiles de una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, además de coadministrar antígeno con sustancias que estimulan respuestas inmunitarias, tal como se describe 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 acoplado antígenos débilmente inmunogénicos a estos tipos de compuestos puede no ser suficiente para provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria resultante puede dirigirse a epítopos inmunogénicos en el compuesto acoplado y no en el antígeno débil, o el antígeno acoplado puede no liberarse de manera eficiente a APC del sistema inmunitaria. Por lo tanto, se necesitan procedimientos adicionales para estimular respuestas inmunitarias a antígenos que son débilmente inmunogénicos.

El documento WO2008/116078 describe el uso de lípidos catiónicos quirales, ópticamente activos, que bajo ciertas condiciones de dosis y composición actúan como una nueva clase de inmunoestimulantes, para (1) presentar o liberar de manera efectiva un antígeno al sistema inmunitario y (2) estimular el sistema inmunitario para responder al antígeno.

El documento US2006/008472 da a conocer composiciones de liberación de antígenos que pueden contener un lípido catiónico y procedimientos de uso de las mismas para prevenir o para tratar cánceres y otras enfermedades infecciosas. En particular, este documento proporciona un sistema de liberación de vacuna de lípidos-protamina-ADN (LPD) y procedimientos de uso de dicho sistema de liberación de vacuna de LPD para la prevención y tratamiento del cáncer y otras enfermedades infecciosas.

El documento US2008/014254 da a conocer el cloruro de DOTAP enantioméricamente puro y modificaciones cristalinas estables de cloruro de (2R, S)-DOTAP, (2S)-DOTAP y (2R)-DOTAP, un procedimiento para la preparación de estas modificaciones y el uso del mismo como constituyente para la preparación de medicamentos. Este documento también describe composiciones farmacéuticas que pueden, por ejemplo, estar en forma de liposomas, lipoplexos, microemulsiones y nanopartículas e incluyen, por ejemplo, un compuesto activo del grupo de los péptidos, nucleótidos, vacunas o agentes citostáticos.

El documento US6419931 describe composiciones para inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos a un antígeno de interés en un mamífero. Dichas composiciones comprenden un péptido que induce una respuesta CTL al antígeno y un péptido que induce una respuesta HTL, donde el péptido que induce HTL está lipidado.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a R-DOTAP para usar de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones.

Ciertos aspectos de ejemplo de la invención se exponen a continuación.

Esta descripción se refiere a la quiralidad de lípidos catiónicos y el uso de los enantiómeros R y S de lípidos catiónicos, que bajo ciertas condiciones de dosis y composición actúan como una nueva clase de inmunoestimulantes, para (1) presentar y liberar de manera efectiva un antígeno al sistema inmunológico y (2) estimular el sistema inmunitario para responder al antígeno.

Los liposomas se han utilizado ampliamente para la administración de fármacos de peso molecular pequeño, ADN plásmido, oligonucleótidos, proteínas y péptidos. Las vacunas que utilizan vehículos liposomales 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 solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 12/049.957, asignada al cesionario de la presente solicitud, describe inmunoterapias basadas en lípidos simples, pero eficaces, que incluyen un complejo de lípido catiónico/antígeno, que tiene dos moléculas, un lípido catiónico y un antígeno, y los efectos de la dosis de lípido sobre la respuesta inmunitaria resultante. Los resultados descritos demuestran que el liposoma catiónico formando un complejo con un antígeno sirve para estimular las respuestas inmunitarias e iniciar la interacción de las células dendríticas (una APC) con células T.

En la descripción, los estudios adicionales realizados con los dos enantiómeros de un lípido catiónico seleccionado han conducido al descubrimiento de que existen diferencias en la capacidad de los enantiómeros R y S de los lípidos catiónicos para actuar como potentes activadores inmunitarios en diversas condiciones. En combinación con un antígeno, el complejo lípido catiónico/antígeno que contiene el enantiómero R, en diversas condiciones de dosis (incluyendo las condiciones de dosis baja), induce fuertes respuestas inmunitarias específicas para el antígeno formulado en el complejo y da lugar a la regresión del tumor. Los complejos que consisten en S-DOTAP y el antígeno, sin embargo, fueron capaces de inducir la regresión del tumor solamente de forma limitada, y no a todas las dosis a las que el R-DOTAP fue efectivo. Sin embargo, ambos enantiómeros de DOTAP son igualmente eficaces en la inducción de la maduración y activación de células dendríticas, que es la primera etapa en la inducción de una respuesta inmunitaria celular.

Por lo tanto, un aspecto de la descripción proporciona una composición de al menos un enantiómero de un lípido catiónico en una dosis suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Otro aspecto de la descripción proporciona un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto mediante la administración de un enantiómero específico o una mezcla de enantiómeros de un lípido catiónico al

sujeto.

Otro aspecto de la descripción proporciona una composición de un enantiómero R o S de un lípido catiónico en una dosis suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Aspectos adicionales de la descripción implican la adición de al menos un antígeno al enantiómero R o S para formar un complejo de lípido catiónico/antígeno en cuyo caso la respuesta inmunitaria es específica de antígeno.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Varias características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor cuando se lea la siguiente descripción detallada con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Las **figuras 1A y 1B** representan la quiralidad de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonino propano ("DOTAP").

La **figura 2** es un gráfico que representa la activación de células dendríticas humanas que dan lugar a la expresión de la molécula coestimuladora CD 80 por R-DOTAP, S-DOTAP y la mezcla racémica RS-DOTAP.

La **figura 3** es un gráfico que representa la activación de células dendríticas humanas que dan lugar a la expresión de la molécula coestimuladora CD 83 por R-DOTAP, S-DOTAP y la mezcla racémica RS-DOTAP.

La **figura 4** es un gráfico que representa la activación de células dendríticas humanas que dan lugar a la expresión de la molécula coestimuladora CD 86 por R-DOTAP, S-DOTAP y la mezcla racémica RS-DOTAP.

La **figura 5** es un gráfico que representa la estimulación de células dendríticas humanas que dan lugar a la producción de la quimiocina CCL-3 por R- DOTAP, S-DOTAP y la mezcla racémica RS-DOTAP.

La **figura 6** es un gráfico que representa la estimulación de células dendríticas humanas que dan lugar a la producción de la quimiocina CCL-4 por R- DOTAP, S-DOTAP y la mezcla racémica RS-DOTAP.

La **figura 7** es un gráfico que representa la estimulación de células dendríticas humanas que dan lugar a la producción de la quimiocina CCL-5 por R- DOTAP, S-DOTAP y la mezcla racémica RS-DOTAP.

La **figura 8** es un gráfico que representa la estimulación de células dendríticas humanas que dan lugar a la producción de la quimiocina CCL-19 por R- DOTAP, S-DOTAP y la mezcla racémica RS-DOTAP.

La **figura 9** es un gráfico que representa la estimulación de células dendríticas humanas que dan lugar a la producción de la citocina IL-2 por R- DOTAP, S-DOTAP y la mezcla racémica RS-DOTAP.

La **figura 10** es un gráfico que representa la estimulación de células dendríticas humanas que dan lugar a la producción de la citocina IL-8 por R- DOTAP, S-DOTAP y la mezcla racémica RS-DOTAP.

La **figura 11** es un gráfico que representa la estimulación de células dendríticas humanas que dan lugar a la producción de la citocina IL-12 por R- DOTAP, S-DOTAP y la mezcla racémica RS-DOTAP.

La **figura 12** es un gráfico que demuestra el efecto antitumoral in vivo de varias dosis de un complejo de lípido catiónico/antígeno basado en el tamaño del tumor y el tiempo después de la inyección.

La **figura 13** es un gráfico que demuestra el efecto de la dosis de S-DOTAP sobre la eficacia antitumoral in vivo del complejo lípido catiónico/antígeno.

La **figura 14** es un gráfico que demuestra el efecto de la dosis de R-DOTAP sobre la eficacia antitumoral in vivo del complejo lípido catiónico/antígeno.

La **figura 15** es un gráfico que representa los efectos de respuesta a dosis de lípidos de la mezcla racémica de DOTAP, R-DOTAP y S-DOTAP sobre la respuesta inmunitaria antitumoral in vivo del complejo de lípido catiónico/antígeno con dosis de antígeno de 20 µg. El efecto de la dosis de antígeno también se demuestra con la mezcla racémica de DOTAP. R-DOTAP en comparación con S-DOTAP: * p < 0,05, ** p < 0,01, n = 5-6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a R-DOTAP para usar de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones.

A continuación, se describirán una o más realizaciones específicas de la presente invención. En un esfuerzo por proporcionar una descripción concisa de estas realizaciones, todas las características de una implementación real pueden no describirse en la memoria. Debe tenerse en cuenta que en el desarrollo de cualquiera de dichas implementaciones reales, deben tomarse numerosas decisiones específicas de la implementación para lograr los objetivos específicos de los inventores, que pueden variar de una implementación a otra. Además, se debe entender que dicho esfuerzo de desarrollo podría ser complejo y largo en el tiempo, pero, no obstante, sería una tarea rutinaria para los expertos que obtengan beneficio de esta descripción.

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

Un aspecto de la descripción proporciona un enantiómero de un lípido catiónico para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero para prevenir o tratar una enfermedad. Los lípidos quirales individuales pueden funcionar de manera independiente como inmunomoduladores, de una manera dependiente de la dosis, tal como para la producción de quimiocinas y/o citocinas, mediante la activación de diversos componentes de la vía de señalización de MAP quinasas. El intervalo de dosis que induce eficazmente una respuesta inmunitaria se observa que difiere

entre los enantiómeros R y S y también dentro de diversas especies de mamíferos. Por ejemplo, en la especie de roedores, el enantiómero R de DOTAP atenúa eficazmente el crecimiento del tumor sobre un intervalo de aproximadamente 30 nmol a aproximadamente 400 nmol. En cambio, el enantiómero S de DOTAP es eficaz sobre este mismo intervalo de dosis en la misma especie de roedor, aunque menos que el enantiómero R. En otro aspecto, el lípido catiónico quiral puede estar asociado con antígenos o medicamentos para la presentación a células del sistema inmunitario estimulando al mismo tiempo una respuesta inmunitaria específica de antígeno fuerte. En algunos aspectos de la descripción, el antígeno es un lipopéptido.

La patente de Estados Unidos No. 7.303.881 describe que se mostró que varios lípidos catiónicos complejados con antígenos asociados con la enfermedad estimulaban una respuesta inmunitaria profiláctica que prevenía la enfermedad específica (por ejemplo, cáncer positivo en VPH) y también una respuesta inmunitaria terapéutica que mató las células que expresaban el antígeno en particular y dio lugar a un tratamiento eficaz de la enfermedad. Actualmente, se realizaron estudios para comprender mejor los efectos de la quiralidad en la capacidad inmunoestimulante de lípidos catiónicos mediante la utilización de los enantiómeros R y S de DOTAP. (Los enantiómeros R y S de DOTAP se muestran en las Figuras 1A y 1B). Estos estudios han llevado al descubrimiento de que enantiómeros individuales de lípidos catiónicos pueden funcionar independientemente como inmunomoduladores para estimular una respuesta inmunitaria con (o sin) antígenos. Además, cuando los enantiómeros de lípidos catiónicos se complejan con un antígeno, se genera una respuesta inmunitaria específica de antígeno. La extensión de la respuesta inmunitaria específica de la enfermedad difiere significativamente entre los enantiómeros R y S del lípido catiónico.

En otro aspecto, el lípido catiónico quiral, a una dosis suficiente para estimular una respuesta inmunitaria, se administra en combinación con un antígeno o antígenos. En este caso, la combinación de 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, 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.

Los lípidos catiónicos quirales de la descripción 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 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.

Otro aspecto de la descripción se refiere además a un procedimiento para la producción de estos complejos, en el que el procedimiento puede incluir opcionalmente la etapa de purificar estas formulaciones del exceso de componentes individuales.

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.

El "antígeno" opcional que se puede incluir con los complejos de lípidos catiónicos de la descripción 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 lípido o polímero aniónico seguido por lípido catiónico quiral. El uso de este proceso permite la liberación de fármacos cargados positivamente o neutros a las células por los complejos de la descripción.

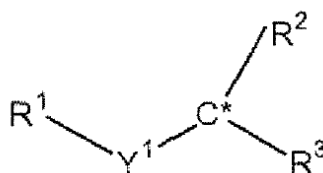
Un aspecto de la descripción implica el uso de los complejos de lípidos catiónicos quirales para activar células dendríticas y también estimular la producción de quimiocinas y citocinas. Las quimiocinas y citocinas son importantes reguladores de las respuestas inmunitarias. Las quimiocinas se identificaron 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 inmunitarias 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 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- γ ("IFN- γ "). Esto se puede explicar por una interacción bidireccional positiva entre los sistemas de CCL2 y IFN- γ . 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 descripción son CCL-2, CCL-3, y CCL-4. Ejemplos de citocinas que pueden ser estimuladas por los complejos de lípidos catiónicos de la descripción son IL-2, IL-8, IL-12 e IFN- γ . Los inventores contemplan que los complejos de lípidos catiónicos de la descripción pueden estimular citocinas y quimiocinas, además de las descritas en esta memoria.

LÍPIDOS

Los complejos de lípidos catiónicos quirales de la descripción pueden formar liposomas que están opcionalmente mezclados con antígeno y pueden contener lípidos catiónicos quirales solos o lípidos catiónicos quirales en combinación con lípidos neutros. Especies de lípidos catiónicos quirales adecuados incluyen, pero no se limitan a: 3- β [(¹N-(³-diguandino espermidina)carbamoil] colesterol (BGSC); 3- β [N,N-diguandinoetil-aminoetano)carbamoil]colesterol (BGTC); N,N¹N²N³ tetrametil-tetrapalmitilespermina (Cellfectin); N-t-butil-N'-tetradecil-3-tetradecil-aminopropion-amidina (CLONfectin); bromuro de dimetildiodeciloil amonio (DDAB); bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxi-etilamonio (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-1-dialcoxi)alquil-N,N,N-trisustituido amonio; 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetilamonio)butanol-sn-glicerol (DOBT) o butanoato de colesteril (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 de Estados Unidos. No. 5.283.185, yoduro de colesteril-3 β -carboxil-amido-etilenetrimetilamonio, yoduro de carboxilato de 1-dimetilamino-3-trimetilamonio-DL-2-propil-colesterilo, colesteril-3-O-carboxiamidoetilenamina, yoduro de colesteril-3 β -oxisuccinamido-etilnetrimetilamonio, yoduro de 1-dimetilamino-3-trimetilamonio-DL-2-propil-colesteril-3 β -oxisuccinato, yoduro de etil-colesteril-3 β -oxisuccinato de 2-(2-trimetilamonio)-etilmetilamino, 3 β -N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil colesterol (DC-Chol), y 3 β -N-(polietilenimina)-carbamoilcolesteril; 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-dimiristil-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-miristil-3-trimetilamonio propano (DMTAP); y dodecilsulfato de sodio (SDS). La descripción contempla el uso de variantes estructurales y derivados de los lípidos catiónicos descritos en esta solicitud.

Ciertos aspectos de la descripción incluyen lípidos catiónicos quirales no esteroideos que tienen una estructura representada por la siguiente fórmula:



en el que R¹ es un grupo amonio cuaternario, Y¹ se elige entre una cadena de hidrocarburo, un éster, una cetona, y un péptido, R² y R³ 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.

En una realización, los lípidos catiónicos quirales de la descripción 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 descripción 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 descripción. Por ejemplo, los liposomas que comprenden dos especies de lípidos catiónicos, lisil-fosfatidiletanolamina y éster de β -alanil colesterol, se han descrito para ciertas aplicaciones de administración de fármacos [Brunette, E. et al., Nucl. Acids Res., 20: 1.151 (1.992)].

Se debe entender, además, que en la consideración de liposomas catiónicos quirales adecuados para su uso en la invención y opcionalmente mezclados con el antígeno, los procedimientos de la descripción 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.

Por lo tanto, los complejos de la descripción pueden contener otros lípidos, además de los lípidos catiónicos quirales. Estos lípidos incluyen liso lípidos de los cuales la 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.

Los complejos de lípidos catiónicos quirales de la descripción 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 descripción 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 CHEMS (hemisuccinato de colesterilo), NGPE (N-glutaril fosfatidil etanolamina), fosfatidil glicerol y ácido fosfatídico o un análogo de fosfolípido similar.

Los procedimientos para producir los liposomas a utilizar en la producción de los complejos de liberación de fármacos que comprenden lípidos de la descripción 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 Estados Unidos. No. 5.283.185. Tales procedimientos incluyen la extrusión por congelación-descongelación y sonicación. Los liposomas unilamelares (menos de aproximadamente 200 nm de diámetro promedio) y los liposomas multilamelares (mayor de aproximadamente 300 nm de diámetro promedio) se pueden utilizar como componentes de partida para producir los complejos de esta descripción.

En los liposomas catiónicos utilizados para producir los complejos de lípidos catiónicos de esta descripción, el lípido catiónico quiral 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 quiral y un lípido neutro, en proporciones entre aproximadamente 2:8 y aproximadamente 6:4.

Se entiende, además, que los complejos de la descripción pueden contener lípidos modificados, proteínas, policaciones o ligandos de receptores que funcionan como un factor de reconocimiento que dirige el complejo a un tejido o tipo de célula particular. Ejemplos de factores de reconocimiento incluyen asialoglicoproteína, insulina, lipoproteína de baja densidad (LDL), folato 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.

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 descripción se miden 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 el Ejemplo. 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. Aunque es posible administrar el lípido catiónico quiral 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 quirales de la descripción pueden comprender los complejos de lípidos catiónicos en un tampón estéril fisiológicamente compatible, 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 3,0 a

aproximadamente 8,0). Los complejos de lípidos catiónicos quirales se pueden administrar en forma de aerosoles o soluciones líquidas para administración intratumoral, intraarterial, intravenosa, intratraqueal, intraperitoneal, subcutánea e intramuscular.

Las formulaciones de la descripción pueden incorporar cualquier estabilizador conocido en la técnica. Estabilizadores ilustrativos son el colesterol y otros esteroides que pueden ayudar a dar rigidez a la bicapa del liposoma y evitar la disgregación o desestabilización de la bicapa. También agentes, tales como polietilenglicol, polisacáridos y monosacáridos, 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.

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, tales como poliésteres, poliaminoácidos, metilcelulosa, polivinilo, poli(ácido láctico), e hidrogel 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 vida media de los liposomas y emulsiones.

Cuando se requieren preparaciones orales, los lípidos catiónicos quirales 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.

La administración del lípido catiónico quiral de la descripción 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.

Las formulaciones de la descripción, tanto para uso veterinario como para uso humano, comprenden un lípido catiónico quiral solo como se describe anteriormente, como una mezcla de enantiómeros R y S, 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

En una realización, el lípido catiónico quiral se administra sin agentes adicionales con el fin de potenciar o disminuir varias respuestas inmunitarias, incluyendo la producción de otros moduladores inmunitarios, y para reforzar la respuesta inmunitaria en la lucha contra la enfermedad. En otra realización, el lípido catiónico quiral 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.

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 principal de histocompatibilidad ("MHC"). Los antígenos asociados a tumores incluyen autoantígenos, 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. En el presente documento se proporcionan realizaciones más específicas.

Un "antígeno microbiano", tal como se usa en el presente documento, es un antígeno de un microorganismo e incluye 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 (del 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 de origen 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 de polisacárido. En el presente documento se proporcionan realizaciones más específicas. 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, la mutación de secuencias de aminoácidos de péptido o proteína, la mutación de 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.

También son útiles en las composiciones y procedimientos de la descripción 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.

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 contra un tumor o cáncer de la descripción comprenden además al menos un epítipo de al menos un antígeno asociado a tumor. En otra realización preferida, las vacunas contra tumor o cáncer de la descripción 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 descripción pueden ser inherentemente inmunogénicos o no inmunogénicos, o ligeramente inmunogénicos. Como se demuestra en el presente documento, los autoantígenos 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 inmunitaria contra dichos antígenos. Los antígenos de ejemplo incluyen antígenos sintéticos, recombinantes, exógenos u homólogos, y los materiales antigénicos pueden incluir proteínas, péptidos, polipéptidos, lipoproteínas, lipopéptidos, lípidos, glicolípidos, hidratos de carbono, ARN y ADN. Los ejemplos de tales vacunas incluyen aquellas para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinoma de intestino, o cualquier otro tipo de cáncer conocido en la técnica 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 encapsularlo en el liposoma. De este modo, los complejos de lípidos catiónicos quirales de la descripción 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 antígenos asociados a tumores adecuados para uso en la descripción incluyen moléculas de origen natural 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.

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-ESO1, 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 lisados 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.

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.

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 subtipo 16 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.

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, tal como se describe en Cohen et al, Cancer Res., 54: 1.055 (1.994)), purificando parcialmente los antígenos, mediante tecnología recombinante, o mediante 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.

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 descripción. 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, PTLT en individuos inmunosuprimidos), HTLV (leucemia de células T adulta), virus del papiloma humano oncogénicos tipos 16, 18, 33, 45 (cáncer de cuello uterino 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.

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 descripción comprenden además al menos un epítipo de al menos un antígeno microbiano. Los patógenos que pueden ser objetivo de las vacunas en cuestión incluyen virus, bacterias, parásitos y hongos. En otra realización, las vacunas de patógenos de la descripción comprenden además una pluralidad de epítipos de uno o más antígenos microbianos.

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 antígenos sintéticos, recombinantes, exógenos u homólogos, y los materiales antigénicos pueden incluir proteínas, péptidos, polipéptidos, lipoproteínas, lipopéptidos, lípidos, glicolípidos, hidratos de carbono, ARN y ADN. Los patógenos virales de ejemplo incluyen los virus que infectan a mamíferos, y más particularmente los seres humanos. Los ejemplos de virus incluyen: Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tal como el VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, tales como el VIH-LP; Picornaviridae (por ejemplo, virus de la poliomielitis, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Cocksackie 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 bunga, flebovirus y virus Nairo); Arenaviridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus, y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus de polio); 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 espongiformes, 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 = transmitido internamente; clase 2 = transmitido por vía parenteral (es decir, la hepatitis C); Norwalk y virus relacionados, y astrovirus).

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 especies de *Pasteurella*, especies de estafilococos, y especies de estreptococos. Las bacterias gram negativas incluyen *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen: *Helicobacter pylori*, *Borella burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Micobacterias* sps (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracelular*, *M. kansasii*, *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* patogénica, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

Los polipéptidos de patógenos bacterianos que pueden ser útiles como fuentes de antígenos microbianos en las presentes composiciones incluyen 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 *Edwardsiella 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 mediante cualquier otro medio conocido en la técnica.

Los ejemplos de patógenos adicionales incluyen los hongos que infectan a mamíferos, y más particularmente los seres humanos. Los ejemplos de hongos incluyen: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis* y *Candida albicans*. Los 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 los antígenos de superficie de *Ichthyophthirius*.

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 C. G. A. Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983). Además del tratamiento de enfermedades humanas infecciosas y patógenos humanos, las composiciones y procedimientos de la descripción 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 Compendiums, Inc., 1995; ver también el documento WO 02/069369.

Los patógenos no humanos de ejemplo incluyen 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 ("FIV"), y virus de la anemia infecciosa equina ("EIAV"), 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").

En algunas realizaciones, "tratamiento", "tratar" y "que trata", tal como se usan 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.

Los antígenos microbianos se pueden preparar mediante 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, mediante la purificación parcial de los antígenos, o, alternativamente, mediante tecnología recombinante o mediante 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.

Con el fin de mejorar la incorporación del antígeno en las vesículas de lípidos catiónicos quirales y también para mejorar la liberación a las células del sistema inmunitario, el antígeno se puede conjugar a una cadena de lípidos con el fin de mejorar su solubilidad en las cadenas de ácidos hidrófobos de los lípidos catiónicos, mientras se mantienen las propiedades antigénicas de la molécula. El antígeno lipídado puede ser una lipoproteína, o un lipopéptido, y combinaciones de los mismos. El antígeno lipídado puede tener un enlazador conjugado entre el lípido y el antígeno, tal como, por ejemplo, una α o ϵ -palmitoil lisina N-terminal, puede estar conectado a antígeno a través de un dipéptido Ser-Ser enlazador. La solicitud de Estados Unidos No. 12/049.957 da a conocer que el complejo de lipopéptido DOTAP/E7 exhibió respuestas in vivo mejoradas de linfocitos T CD8⁺ específicas de antígeno funcionales en comparación con la formulación de DOTAP/E7, y por lo tanto, proporcionó una eficacia antitumoral superior.

La presente invención se entenderá adicionalmente en vista del siguiente ejemplo.

Ejemplo

ESTIMULACIÓN EFICAZ DEL SISTEMA INMUNITARIO MEDIANTE ENANTIÓMEROS DE LÍPIDOS CATIÓNICOS

1. Líneas celulares y péptidos

Las células TC-1 son células endoteliales de pulmón de ratón C57BL/6 que han sido transformadas con los oncogenes E6 y E7 de VPH16 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 (aminoácidos 11 a 20, YMLDLQPETT [SEQ. ID. NO. 1]) se sintetizó por Universidad de Pittsburgh. Facultad de Síntesis de Péptidos mediante síntesis en estado sólido utilizando un sintetizador de péptidos modelo 200 de Advanced ChemTech y se purificó mediante HPLC.

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

Los enantiómeros de DOTAP fueron suministrados por Merck AG (Eprova), Suiza.

Todos los otros lípidos se adquirieron de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Se prepararon pequeños liposomas de DOTAP unilamelares mediante hidratación de película delgada seguido de extrusión. El lípido, en cloroformo, se secó como una capa delgada 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 (dichos tampones son bien conocidos para los expertos en la técnica) que contiene el péptido E7 hasta una concentración final de 0,7 mg de lípidos y 0,1 mg de E7 por ml (proporción molar = 11:1). La dispersión de lípidos se extruyó secuencialmente a través de membranas de policarbonato con tamaño de poro de 0,4, 0,2 y 0,1 μ 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 R-DOTAP/E7, S-DOTAP/E7 o RS-DOTAP/E7 se separó mediante un dispositivo de filtrado centrífugo Microcon® (Millipore, Bedford, MA) y la concentración de péptido no unido se midió mediante el kit de ensayo de proteínas Micro BCA™ (Pierce, Rockford, IL). La eficiencia de la asociación de péptido se determinó como el porcentaje de péptido no unido. También se pueden utilizar otros procedimientos usados en la preparación general de liposomas que son bien conocidos para los expertos en la técnica.

3. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. Se utilizaron pruebas t de Student de dos colas para evaluar la significación estadística de las diferencias en los promedios. La significación se fijó en $p < 0,05$.

4. Enantiómeros R y S individuales de los complejos de lípido catiónico/E7 activan las células dendríticas humanas de manera similar a la mezcla racémica de DOTAP.

Los liposomas catiónicos se prepararon como se ha descrito 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 (SEC. ID. NO. 1)]. El péptido se sintetizó por la Universidad de Pittsburgh, Instituto de Medicina Molecular, Pittsburgh, PA, se obtuvieron células dendríticas humanas de HLA-A2 humano de Lonza (de Walkersville, MD). Se descongelaron crioviales congelados 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 CO₂ a una densidad de emplacado inicial de 125.000 células/cm² en 2 ml de medio en placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos. Las células se cultivaron durante 3 días en cultivo y aparecieron como una mezcla de células adherentes y redondeadas mediante examen microscópico.

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-β"), interleucina 6 ("IL-6") y TNF-α a 10 ng/ml, y la prostaglandina E2 ("PGE-2") a 10 µg/ml (control positivo para la activación), sin tratamiento (control de activación negativo), y S-DOTAP/E7 a concentraciones finales de 2,5, 10 y 40 micromolar, y R-DOTAP/E7 a concentraciones finales de 2,5, 10 y 40 micromolar. Las células dendríticas tratadas se mantuvieron en cultivo durante 24 horas y se recogieron para la tinción de marcador de superficie celular y análisis por citometría de flujo. Las células recogidas se contaron mediante hemocitómetro y se añadieron secuencialmente 10 µl de los siguientes conjugados de anticuerpos a cada muestra para marcar marcadores de superficie: CD80-FITC, CD83-APC, y CD86-PE (BD Biosciences). Las células marcadas de superficie se analizaron posteriormente mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo BD FACS Caliber y se monitorizaron las moléculas marcadoras de células dendríticas coestimuladoras CD80, CD83 y CD86 que se producen tras la activación. Como se ve en las figuras 2, 3 y 4, las células dendríticas humanas primarias tratadas con ambos enantiómeros del complejo de lípido catiónico/E7 sobreregularon la expresión de los tres marcadores coestimuladores de la activación de células dendríticas evaluadas y necesarias para la presentación exitosa de antígenos a células T, de manera similar a lo observado con la mezcla racémica (RS-DOTAP) del lípido catiónico y descrito en la solicitud de Estados Unidos N° 12/049.957, asignada al cesionario de la presente solicitud.

5. Complejos de lípido catiónico/E7 que consisten en enantiómeros R y S individuales exhiben diferentes potencias en la activación de células dendríticas humanas para inducir la producción de quimiocinas y citocinas

Se trataron células dendríticas HLA-A2 humanas (Lonza, Walkersville, MD) y se cultivaron en cultivo tal como se ha descrito anteriormente. En el día 3, las células fueron tratadas con complejo DOTAP/E7 40 micromolar 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 1300 rpm en una microcentrífuga durante 5 minutos para sedimentar las células dendríticas no unidas. Los sobrenadantes se extrajeron y se trataron con 10 microlitros por ml del grupo I de cóctel inhibidor de proteasas Calbiochem (La Jolla, CA) (N° de Cat. 539131) y se almacenaron congelados antes del análisis. Las muestras se analizaron para la expresión de quimiocinas y citosinas mediante el ensayo ELISA Searchlight Protein Arrays Multiplex [Pierce Biotechnology (Woburn, MA)].

Se evaluó la producción de quimiocinas seleccionadas conocidas por ser esenciales en la respuesta inmunitaria celular, CCL3, CCL4, CCL5 y CCL19, y se evaluó la producción de IL-2, IL-8 e IL-12 (Figuras 5-11, que ilustran la capacidad de R-DOTAP/E7 y S-DOTAP/E7 para inducir la producción de CCL3, CCL4, CCL5, CCL-19, IL-2, IL-8 e IL-12). Las figuras ilustran que el complejo DOTAP/E7 que contiene los enantiómeros individuales de DOTAP induce la producción de citocinas y quimiocinas por las células dendríticas humanas. Ambos enantiómeros sin embargo activan el sistema inmunitario en diferentes grados con el enantiómero R que exhibe una mayor potencia.

6. Cinética de crecimiento de tumores VPH-positivos TC-1 en ratones tratados con composiciones DOTAP/E7 en dosis variables de mezclas racémicas de DOTAP.

En la Figura 12, los ratones fueron inyectados por vía subcutánea con células TC-1 en el día 0 con el fin de inducir el crecimiento de tumores VPH-positivos. Las composiciones DOTAP/E7 estaban comprendidas de mezclas racémicas de DOTAP. Los ratones recibieron composiciones DOTAP/E7 que contenían 10 µg de péptido E7 por vía subcutánea en el lado opuesto del abdomen en el día 6. La concentración de lípido DOTAP en el complejo varió de 3 a 600 nmol (3, 15, 30, 75, 150, 300, y 600 nmol). Las dosis baja de DOTAP (15 nmol) mostró un efecto parcial de 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 alta dosis de DOTAP (600 nmol) no mostraron actividad antitumoral, lo que confirma que los liposomas con DOTAP en una dosis alta podrían haber inducido una regulación negativa a la respuesta inmunitaria. Además, los liposomas con DOTAP a la dosis de 100 nmol, pero sin péptido E7, no mostraron inhibición significativa del crecimiento del tumor, lo que indica que el efecto antitumoral era específico de antígeno. Además, los liposomas de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (DOPG), un lípido aniónico, administrado a la dosis de 150 nmol con antígeno no consiguieron inhibir significativamente el crecimiento del tumor.

7. Cinética de crecimiento de tumores VPH-positivos TC-1 en ratones tratados con composiciones R-

DOTAP/E7 y S-DOTAP/E7 en dosis variables de R y S DOTAP.

En las figuras 13 y 14, los ratones fueron inyectados por vía subcutánea con células TC-1 en el día 0 con el fin de inducir el crecimiento de tumores VPH-positivos. Los ratones recibieron composiciones de R-DOTAP/S7 y S-DOTAP/E7 que contienen 20 µg de péptido E7 por vía subcutánea en el lado opuesto del abdomen en el día 6. Las concentraciones de lípidos R o S-DOTAP en el complejo variaron de 3 a 600 nmol (3, 15, 30, 75, 100, 125, 150, 300, y 600 nmol). A diferencia de la mezcla racémica de DOTAP (Figura 12), los complejos de S-DOTAP no mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento del tumor y no se observó regresión tumoral (Figura 13). Sin embargo, se observó un efecto de respuesta a dosis, y las dosis de S-DOTAP de 600 nmol indujeron el crecimiento del tumor más lento ($P < 0,05$) en comparación con el control sin tratar en el día 23. Con referencia a la Figura 14, el efecto antitumoral de los complejos que contienen R-DOTAP y antígeno era similar al efecto observado en la mezcla racémica (Figura 12). Dosis de 75-150 nmol de R-DOTAP mostraron un efecto de inhibición parcial del tumor ($P < 0,001$) en comparación con el control sin tratar en el día 23, mientras que R-DOTAP a 300 nmol exhibió la eficacia regresión tumoral más significativa ($P < 0,0001$). Una vez más, los ratones que recibieron una alta dosis de R-DOTAP (600 nmol) no mostraron actividad antitumoral significativa, lo que confirma que los liposomas con R-DOTAP a una dosis alta podrían haber inducido una regulación negativa a la respuesta inmunitaria. El péptido E7 solo no mostró ninguna inhibición del crecimiento del tumor (no se muestra). La Figura 15 muestra las curvas de dosis-respuesta de los lípidos para la eficacia de regresión tumoral de los diversos complejos de lípidos catiónicos/antígeno E7 DOTAP, S-DOTAP, y R-DOTAP a 20 µg de antígeno y DOTAP a 10 µg de antígeno.

8. Inducción de la proliferación de células T por las composiciones de S-DOTAP y R-DOTAP.

Hemos demostrado previamente que en la solicitud provisional de Estados Unidos Nº 60/983.799, asignada al cesionario de la presente solicitud, que DOTAP/E7 interactúa directamente con linfocitos T humanos, conduce a la expansión clonal y la activación de células T. Esos estudios examinaron la capacidad de mezclas racémicas de DOTAP para estimular la expansión clonal de células T. En esos estudios, los linfocitos humanos enriquecidos obtenidos de un donante sano HLA-A2⁺ fueron estimulados directamente por medio, DOTAP solo, péptido solo o DOTAP/HE7. La estimulación se repitió tres veces con un intervalo de 7 días. Tres días después de la tercera estimulación, los linfocitos tratados con DOTAP o DOTAP/E7 mostraron una amplia expansión de colonias de células T en cultivo en contraste con ninguna expansión clonal en medio de control. Las células T expandidas también demostraron una actividad CTL significativa.

En estos estudios, la activación de células T mediada por DOTAP se confirmó adicionalmente mediante la fosforilación de ERK en las células T, también se observó la expresión inducida por DOTAP de la molécula coestimuladora, CD86 en linfocitos T humanos. Esos resultados sugirieron que DOTAP tiene un impacto directo en la activación de células T a través de una proliferación celular mediada por MAP quinasas.

En los presentes estudios, se investigó la inducción de la proliferación de células T humanas por la enantiómeros R y S de DOTAP y se confirmó mediante el uso de las células T purificadas obtenidas de Lonza, MA. R-DOTAP indujo más proliferación de células T de S-DOTAP y fue similar en actividad a la mezcla racémica de DOTAP.

DISCUSIÓN

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 inmunitarias específicas de antígeno en el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 7.303.881 da a conocer que los liposomas compuestos por lípidos catiónicos activan las células dendríticas, tal como se demuestra por la estimulación por los lípidos catiónicos de la expresión de moléculas coestimuladoras CD80/CD86 en células dendríticas DC2.4 (Figura 14A y 14B). Tal como se muestra en la figura 14A de la Patente de Estados Unidos No. 7.303.881, 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 policationico trifluoroacetato de 2,3-dioleilo-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N, N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA) y el lípido neutro dioleoil 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 las células DC2.4.

Tal como se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos Nº 7.303.881, la capacidad de diferentes lípidos catiónicos para estimular la expresión de CD 80 en células DC 2.4 variaba. Tanto la cabeza hidrofílica como la cola lipofílica de los lípidos tienen un efecto significativo en esta capacidad. Por ejemplo, los lípidos DXEPC con los grupos de cabeza etil fosfocolina (EPC) parecen, en general, ser más potentes que los lípidos DXTAP con un grupo de cabeza 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-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DOEPC-18:1)) parecen ser más potentes que aquellos con cadenas acilo más largas (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DPEPC-16:0)) o saturadas (1,2-distearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DSEPC- 16:0)) cadenas de acilo. Sin embargo, estos datos, demostraron que varios lípidos catiónicos eran capaces de estimular la activación

de células dendríticas. Los estudios descritos en la solicitud de Estados Unidos N° 12/049.957 destacan el mecanismo por el que los lípidos catiónicos actúan como inmunoestimulantes.

Los datos de los estudios mencionados anteriormente han conducido a la observación de que los lípidos catiónicos no son sólo vehículos de reconocimiento y liberación eficientes para antígenos a APC del sistema inmunitario, sino también funcionan como potentes adyuvantes bajo intervalos de composición de baja dosis para influir directamente en la función del sistema inmunitario a través de la activación de vías de señalización dependientes de MAP quinasas con la producción resultante de moléculas reguladoras del sistema inmunitario, incluyendo citocinas y quimiocinas. Se ha demostrado un efecto dosis-respuesta claro de lípido catiónico en las capacidades inmunoestimulantes de las formulaciones. Se demostró que tras recibir el complejo de lípido/antígeno, las partículas fueron captadas principalmente por células dendríticas, las principales células presentadoras de antígeno profesionales. La iniciación de la activación de células dendríticas y la migración a los ganglios linfáticos de drenaje facilitan respuestas inmunitarias contra tumores TC-1 específicos de antígeno, tal como se ha demostrado. Se generaron linfocitos T CD8⁺ funcionales en ratones después de recibir una inyección de DOTAP/E7 y los tamaños tumorales disminuyeron y exhibieron un aumento de la apoptosis, debido a la creciente cantidad de células T infiltrantes en el microambiente tumoral. La curva de dosis-respuesta del lípido catiónico con forma de campana resultante (la actividad disminuye por encima y por debajo de la dosis óptima) demostró actividad a dosis muy bajas, lo que indica que la actividad de los lípidos catiónicos como adyuvantes o inmunoestimulantes es tan potente que la CE₅₀ es tan baja como aproximadamente 15 nmol por inyección. Las altas dosis de lípidos catiónicos eliminan la actividad inmunoestimulante. También se ha demostrado que cuando se incorpora un antígeno, tal como, por ejemplo, ovalbúmina, en los liposomas catiónicos y se administra en una única inyección subcutánea, se producen anticuerpos eficaces contra el antígeno. Los liposomas catiónicos también pueden inducir la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD83 y activar las células dendríticas humanas. Es evidente que en las composiciones de dosis óptimas, los lípidos catiónicos y los complejos de lípido catiónico/antígeno, además de la liberación eficaz a las células dendríticas, son potentes activadores del sistema inmunitario y proporcionan inmunoterapias simples, seguras y muy eficientes útiles en la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Basado en la comprensión del mecanismo de la inmunoestimulación, se realizaron estudios adicionales para evaluar el efecto de la quiralidad en lípidos catiónicos y la capacidad inmunoestimulante de lípidos catiónicos. Para este efecto, se utilizaron enantiómeros R y S sintetizados puros de DOTAP y se compararon con la mezcla racémica comúnmente utilizada. Ambos enantiómeros R y S de DOTAP demostraron poseer capacidad similar a DOTAP racémico con respecto a la activación y la maduración de las células dendríticas. Los tres lípidos indujeron a las células dendríticas para expresar las moléculas coestimuladoras CD 80 CD 83 y CD 86.

Una característica importante de un inmunoestimulante capaz de inducir respuestas inmunitarias celulares a la enfermedad es su capacidad para inducir la producción de quimiocinas y citocinas críticas. Tal como se describe en el Ejemplo, se observaron diferencias significativas entre los enantiómeros R y S de DOTAP en su capacidad para inducir la producción de quimiocinas y citocinas. Se observó que R-DOTAP era un activador inmunitario más potente que el S-DOTAP. En todos los casos, la potencia de R-DOTAP fue equivalente o superior a la de la mezcla racémica de DOTAP.

Con el fin de determinar si la potencia in vitro en la inducción de citocinas se traduciría en una eficacia terapéutica in vivo, se evaluaron tres formulaciones, R-DOTAP/E7, S-DOTAP/E7 y DOTAP/E7 (mezcla racémica) por su capacidad para erradicar tumores positivos VPH-E7 en ratones portadores de tumores. Cada formulación se evaluó a dosis múltiples de lípidos. Tal como se ha demostrado en las Figuras 12-15, ambas formulaciones que contienen R-DOTAP y DOTAP exhibieron una respuesta a la dosis de lípidos en forma de campana con una fuerte actividad específica de E7 que conduce a la regresión del tumor dentro de intervalos de dosis óptimos específicos. Las formulaciones que contienen S-DOTAP no indujeron la regresión del tumor bajo ninguna condición observada, aunque formulaciones con alto contenido en lípidos ralentizó el crecimiento del tumor.

Por tanto, es evidente que el enantiómero R de DOTAP es responsable para la mayoría del efecto adyuvante observado de DOTAP. Sin embargo, ambos enantiómeros son potentes activadores de células dendríticas que conducen a la maduración.

Los estudios descritos anteriormente identifican composiciones y aplicaciones únicas específicas de lípidos catiónicos que consisten en lípidos quirales o mezclas de lípidos quirales, que pueden ser explotadas para desarrollar inmunoterapias simples, rentables y muy necesarias para varias enfermedades debilitantes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. R-DOTAP para utilizar en la estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto para prevenir o tratar una enfermedad, en el que la respuesta inmunitaria se induce mediante la activación de la vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos ("MAP") en células del sistema inmunitario del sujeto.
2. R-DOTAP para utilizar, según la reivindicación 1, en el que la respuesta inmunitaria estimula la producción de citocinas y quimiocinas en el sujeto.
- 10 3. R-DOTAP para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el R-DOTAP se asocia con uno o más antígenos para formar un complejo de lípido catiónico/antígeno.
- 15 4. R-DOTAP para utilizar, según la reivindicación 3, en el que las quimiocinas se seleccionan del grupo que consiste en CCL-3 y CCL-4.
5. R-DOTAP para utilizar, según la reivindicación 3, en el que las citocinas se seleccionan del grupo que consiste en IL-2, IL-8 e IL-12.
- 20 6. R-DOTAP para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la enfermedad es cáncer.
7. R-DOTAP para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la enfermedad es una enfermedad infecciosa.
- 25 8. R-DOTAP para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el R-DOTAP se asocia con una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de un antígeno.
9. R-DOTAP para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que dicho uno o más antígenos incluyen un antígeno conjugado a una cadena de lípidos.

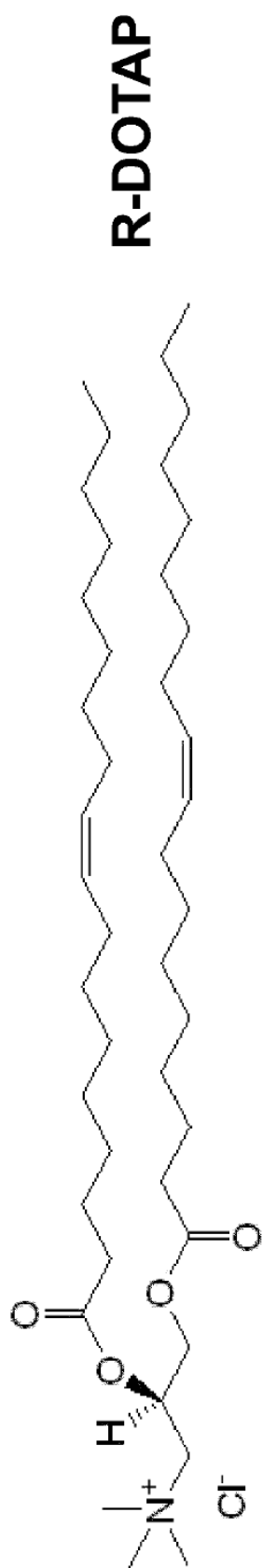


Fig. 1A

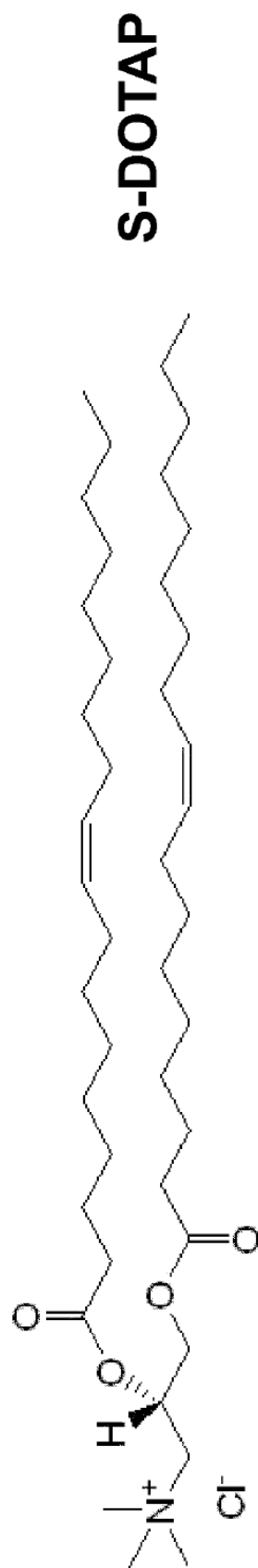


Fig. 1B

Fig. 2

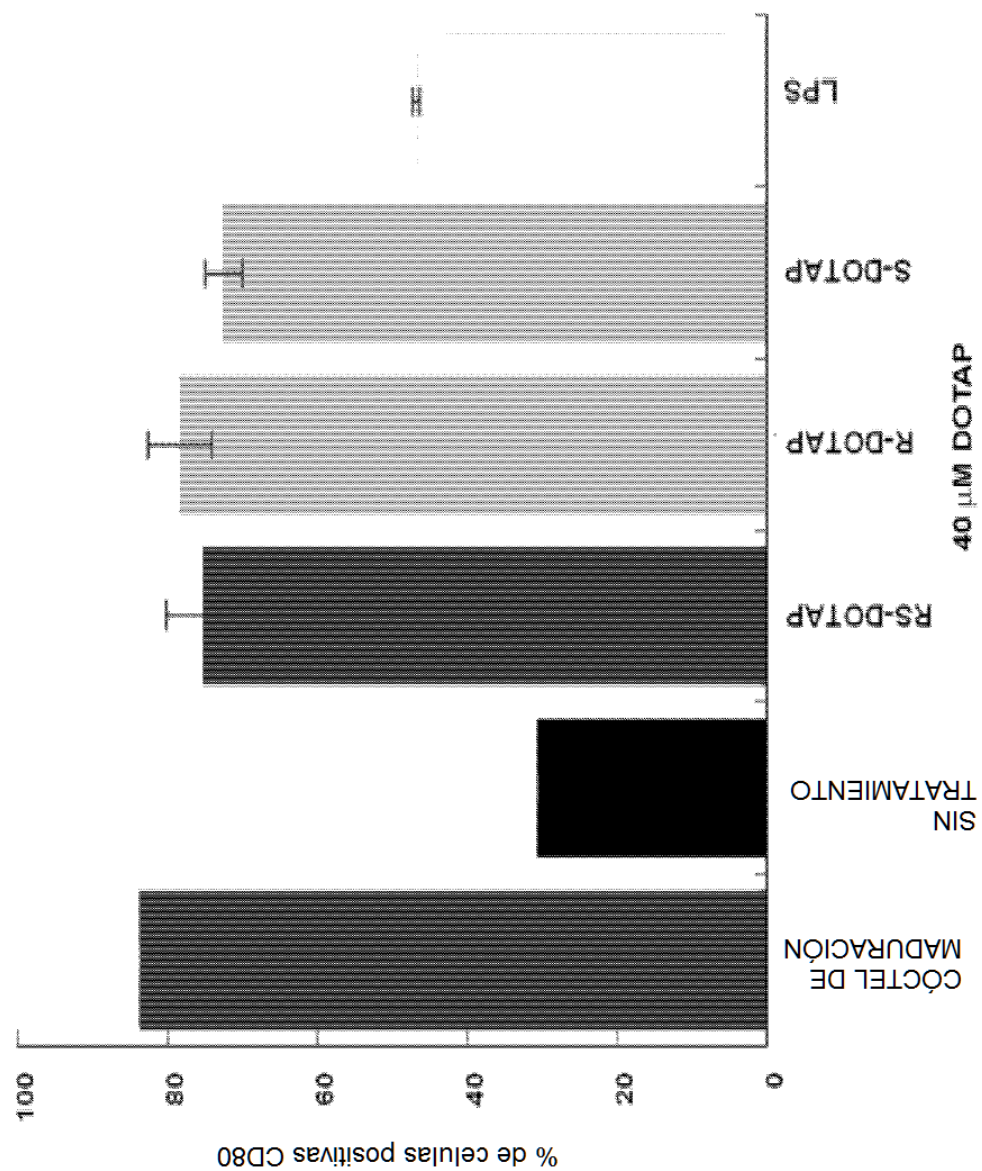


Fig. 3

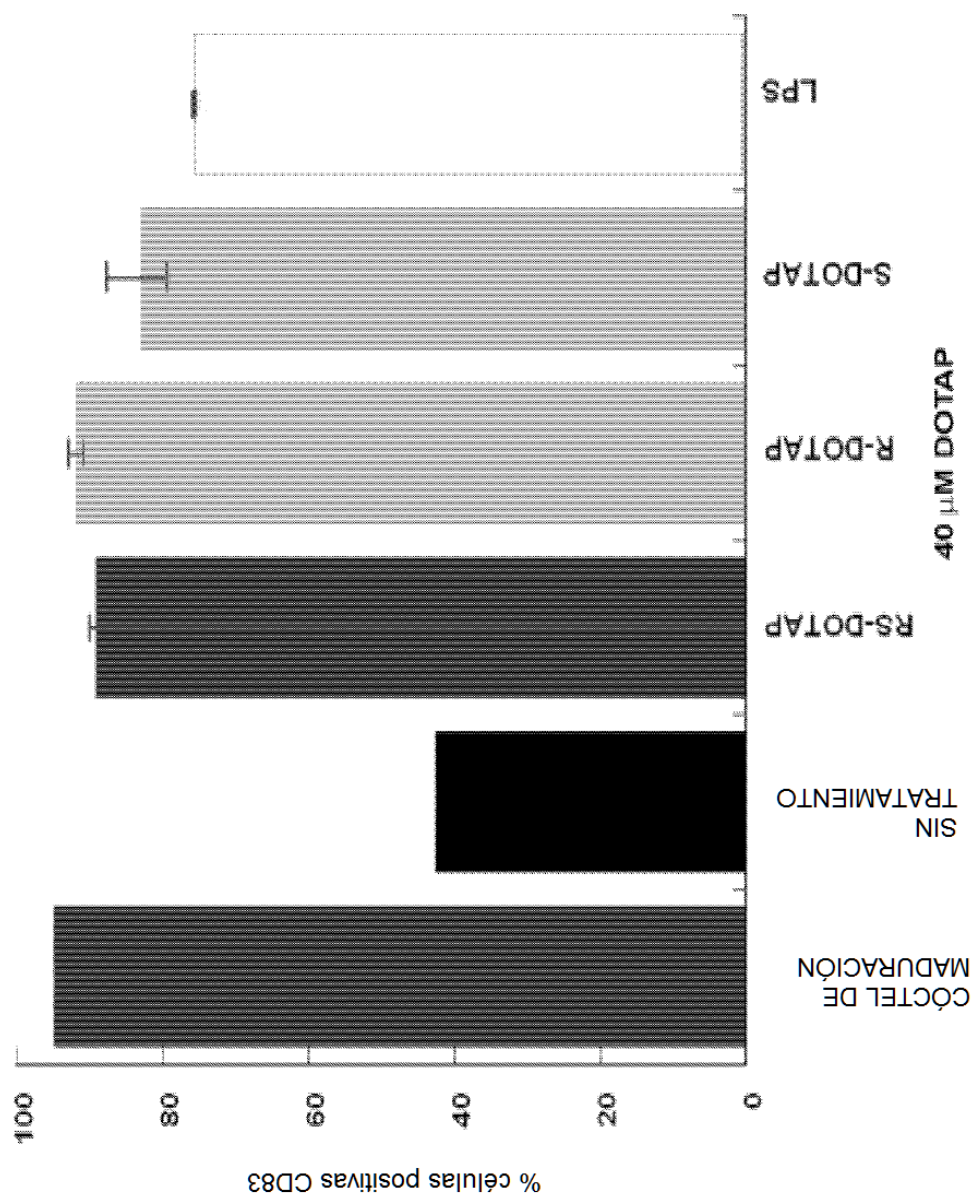


Fig. 4

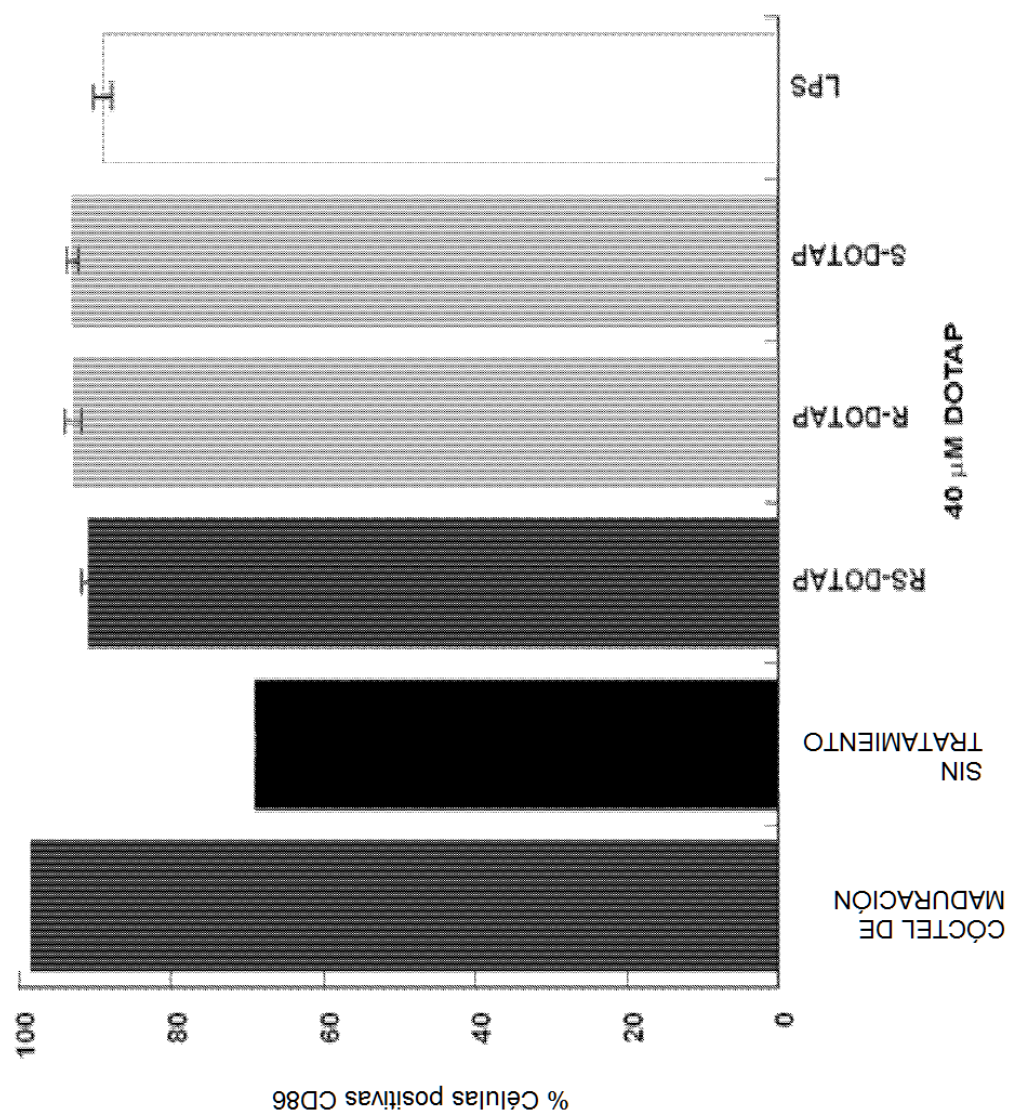


Fig. 5

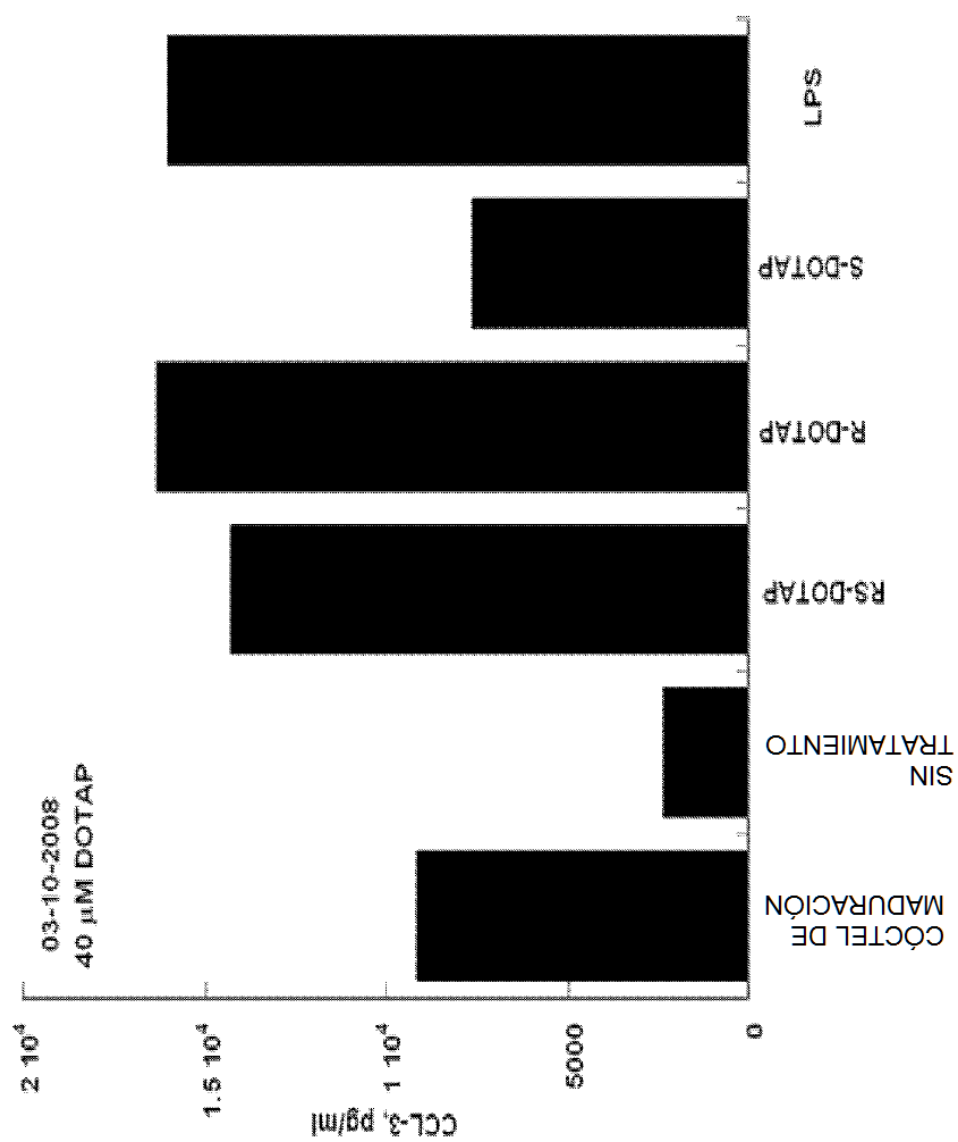


Fig. 6

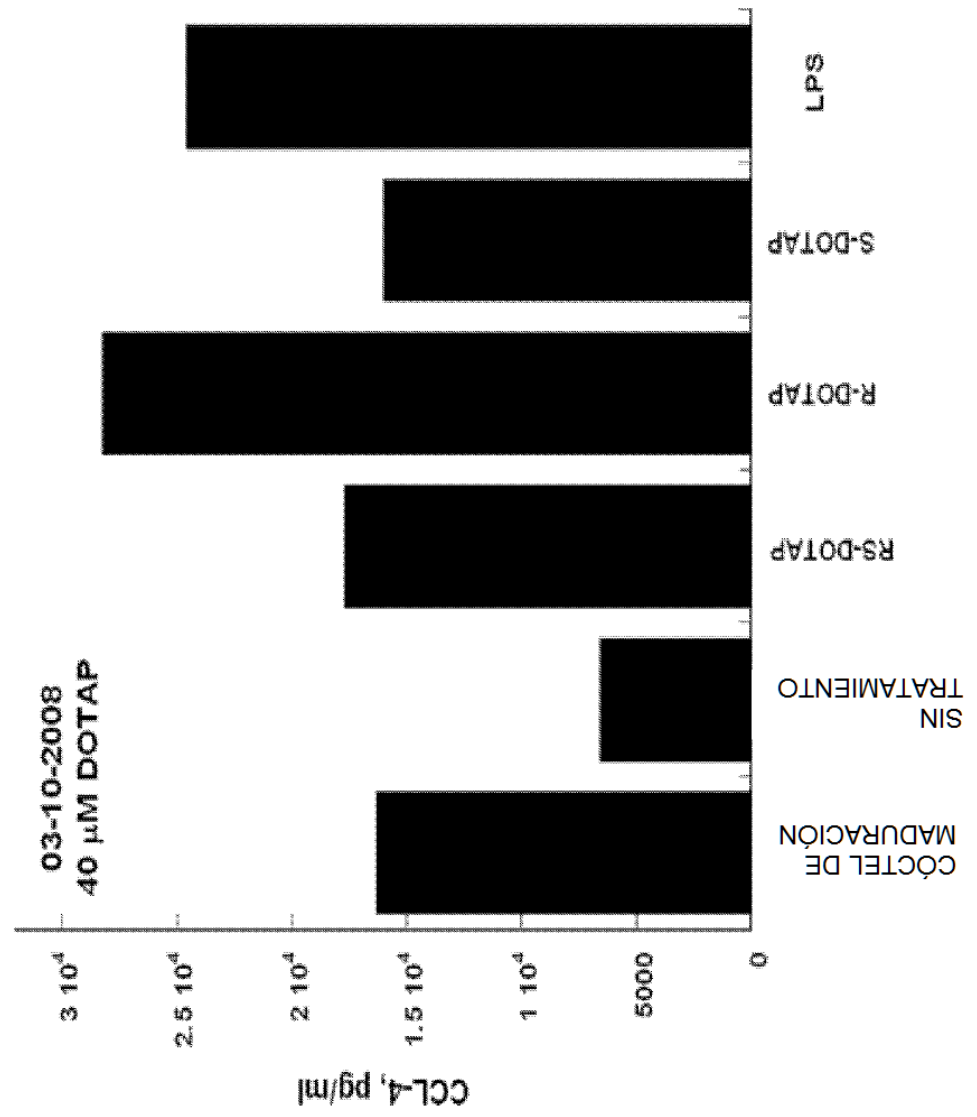


Fig. 7

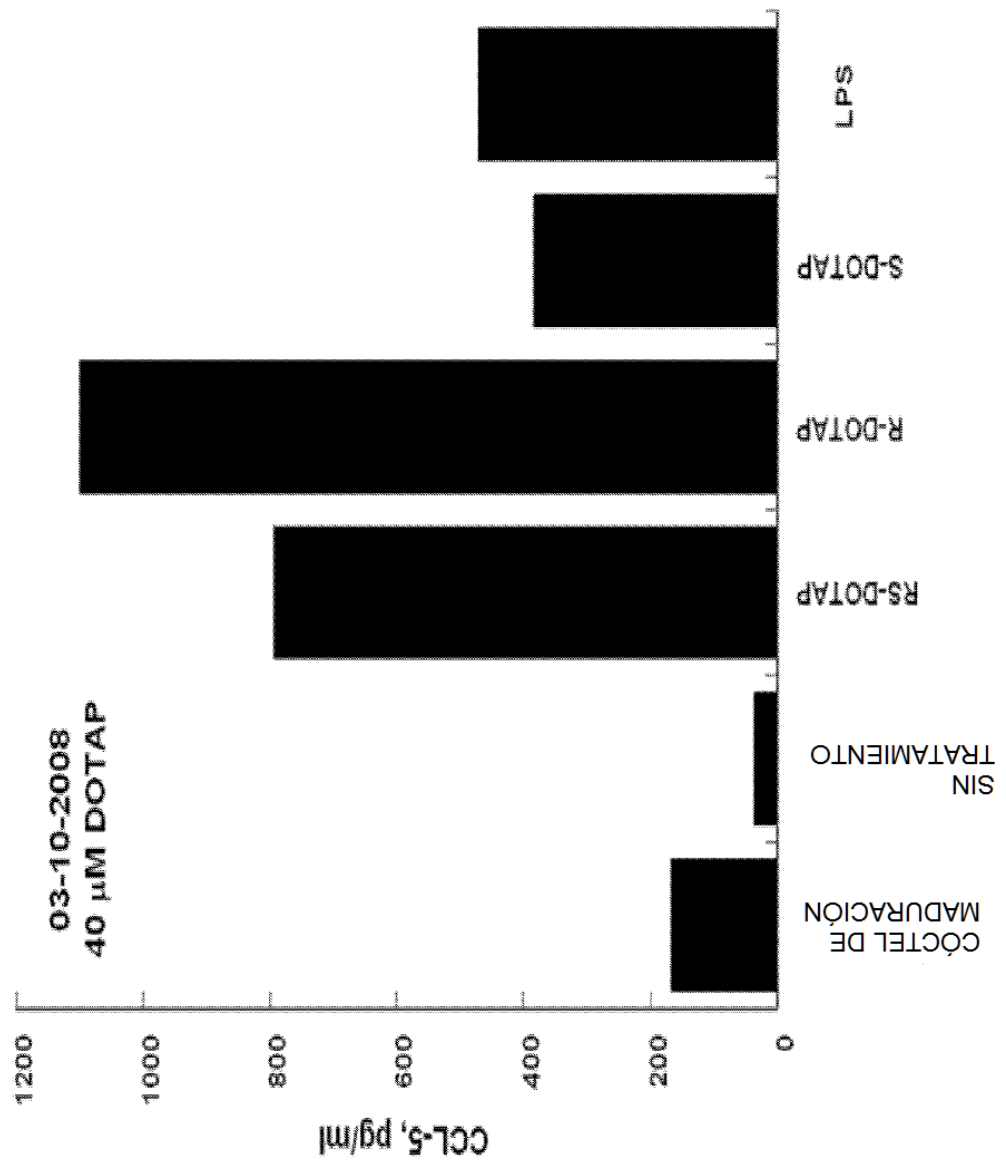


Fig. 8

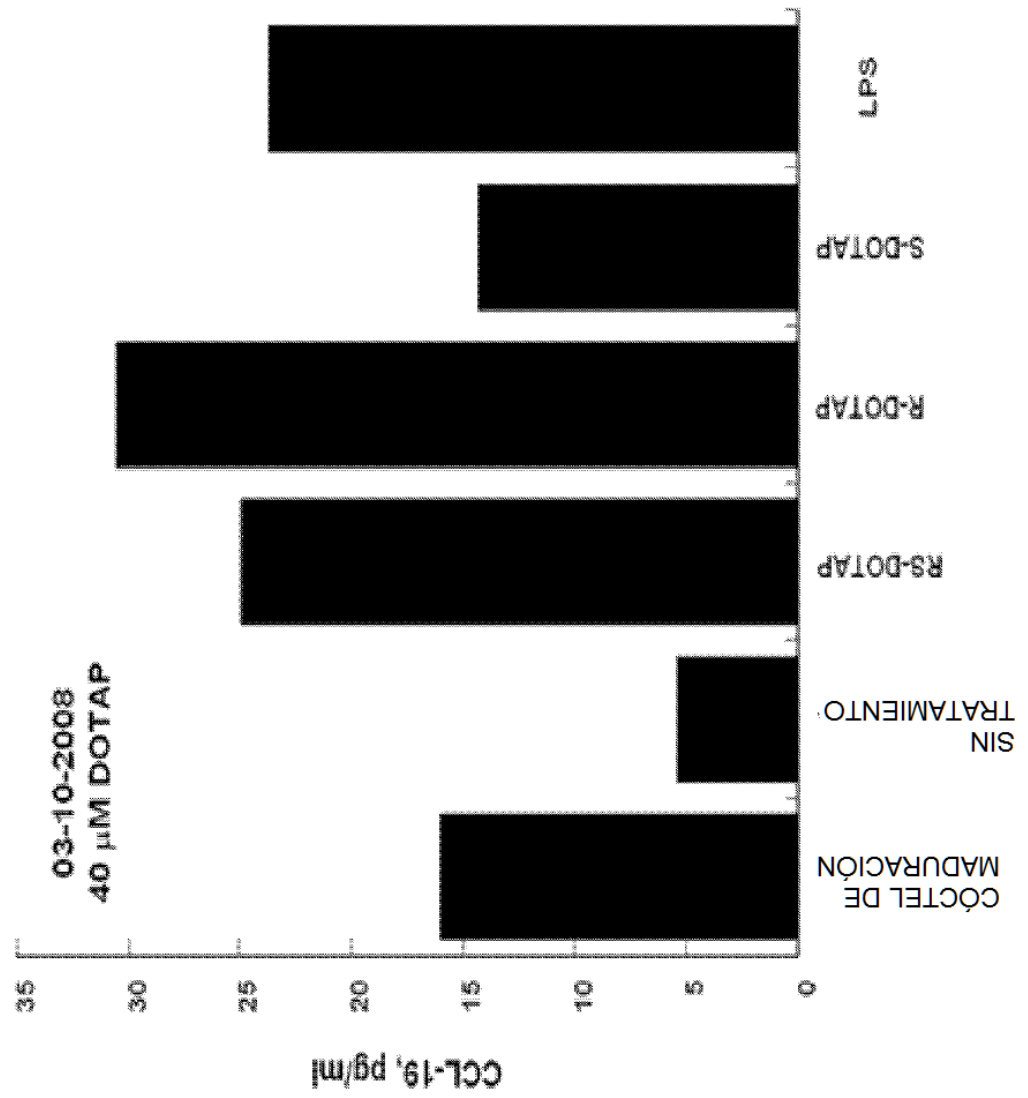


Fig. 9

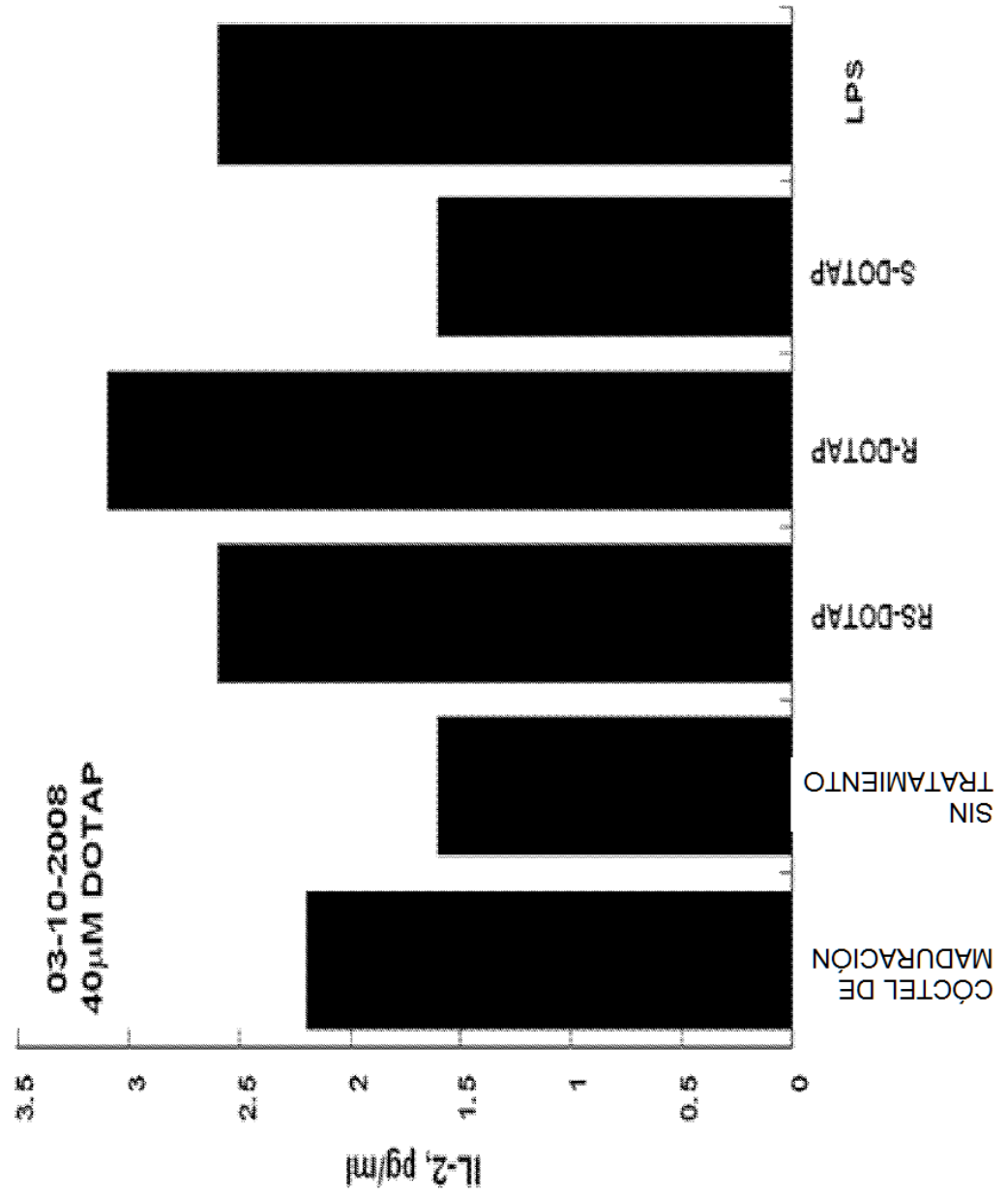


Fig. 10

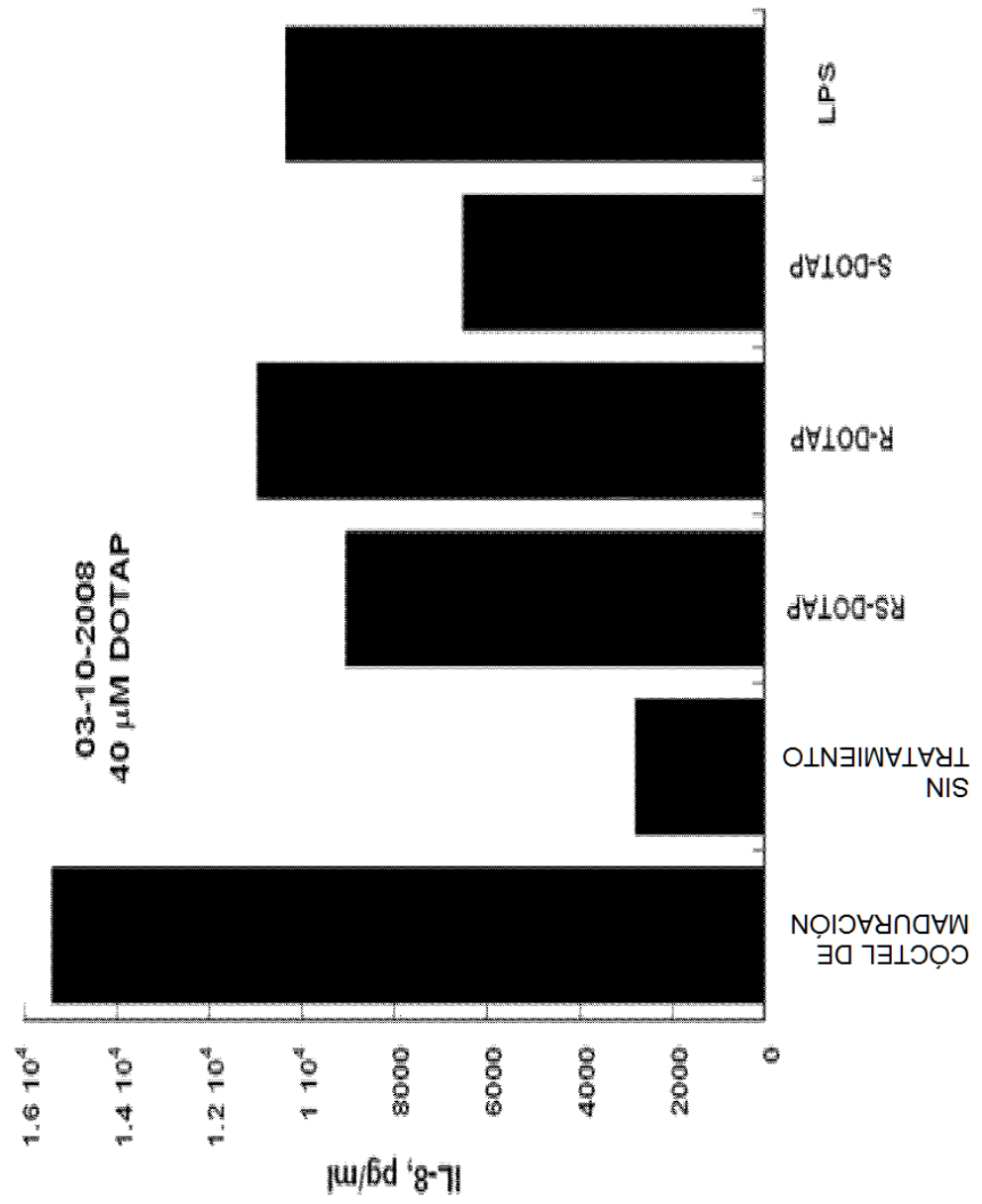


Fig. 11

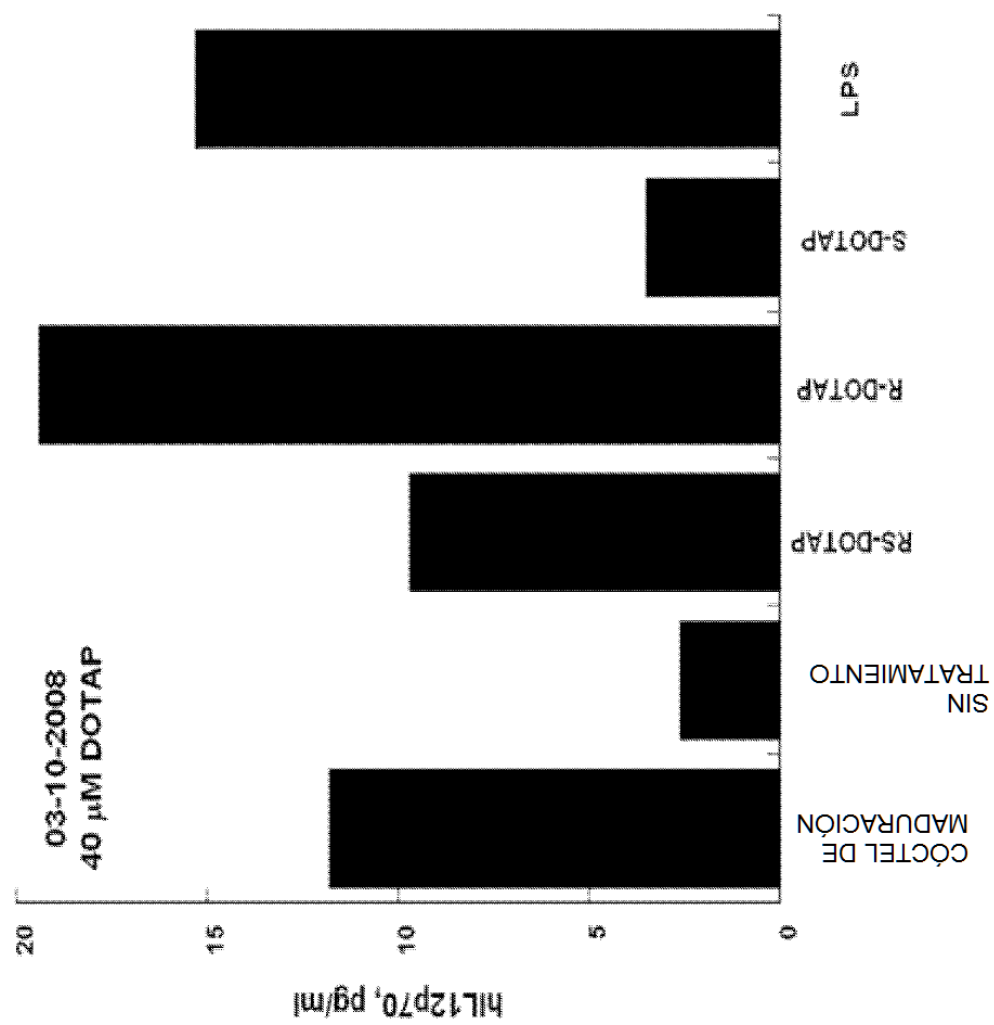


Fig. 12

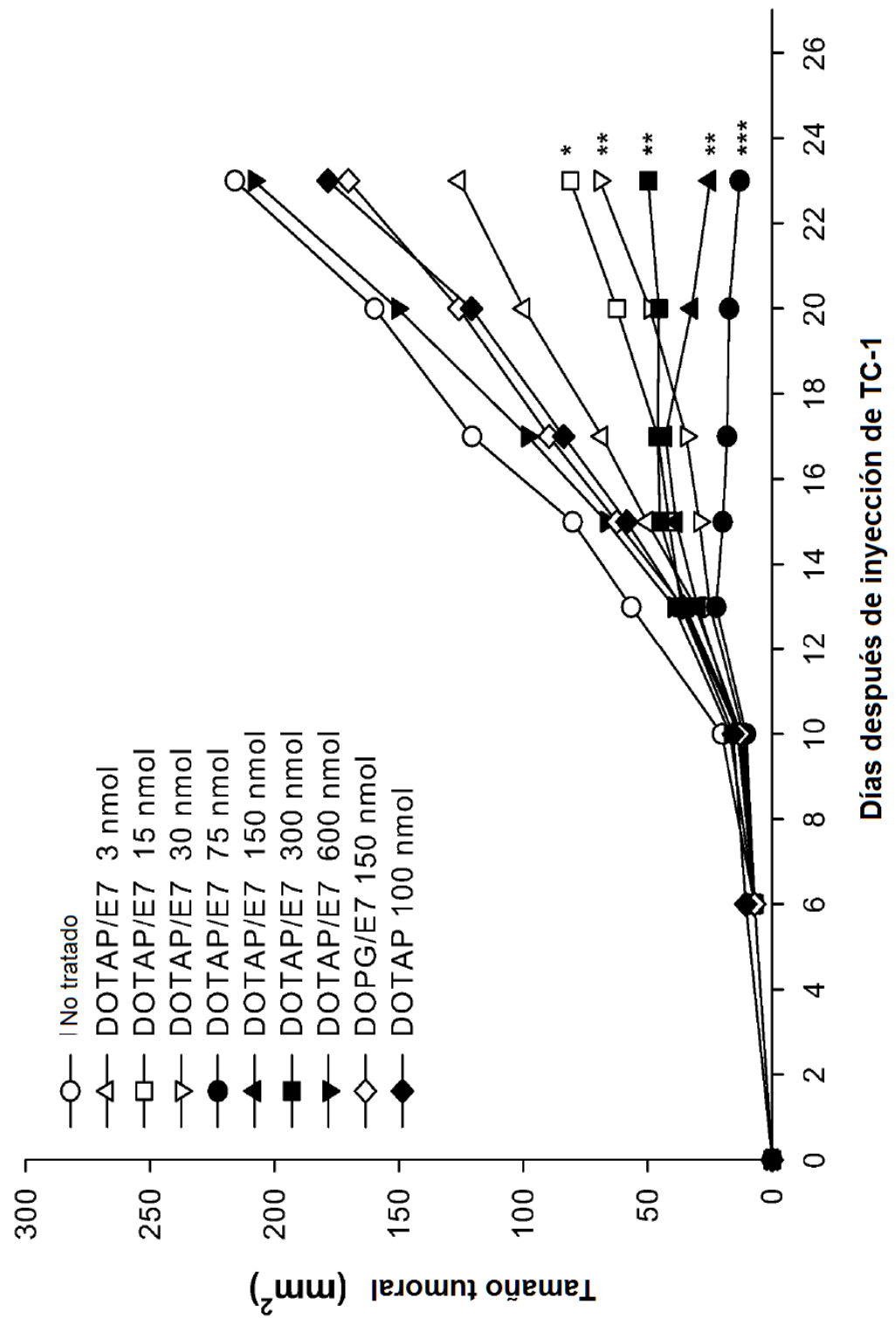


Fig. 13

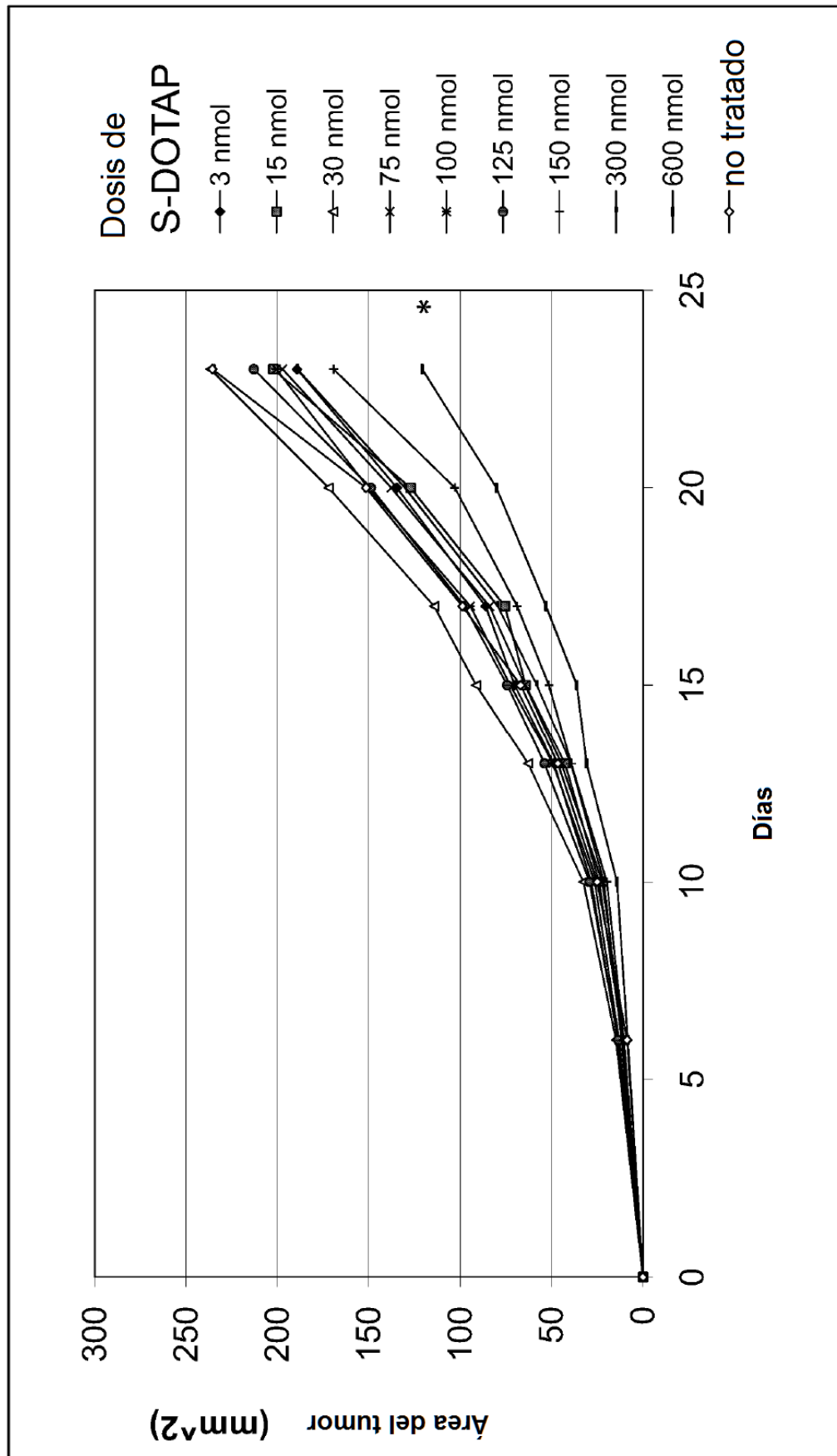


Fig. 14

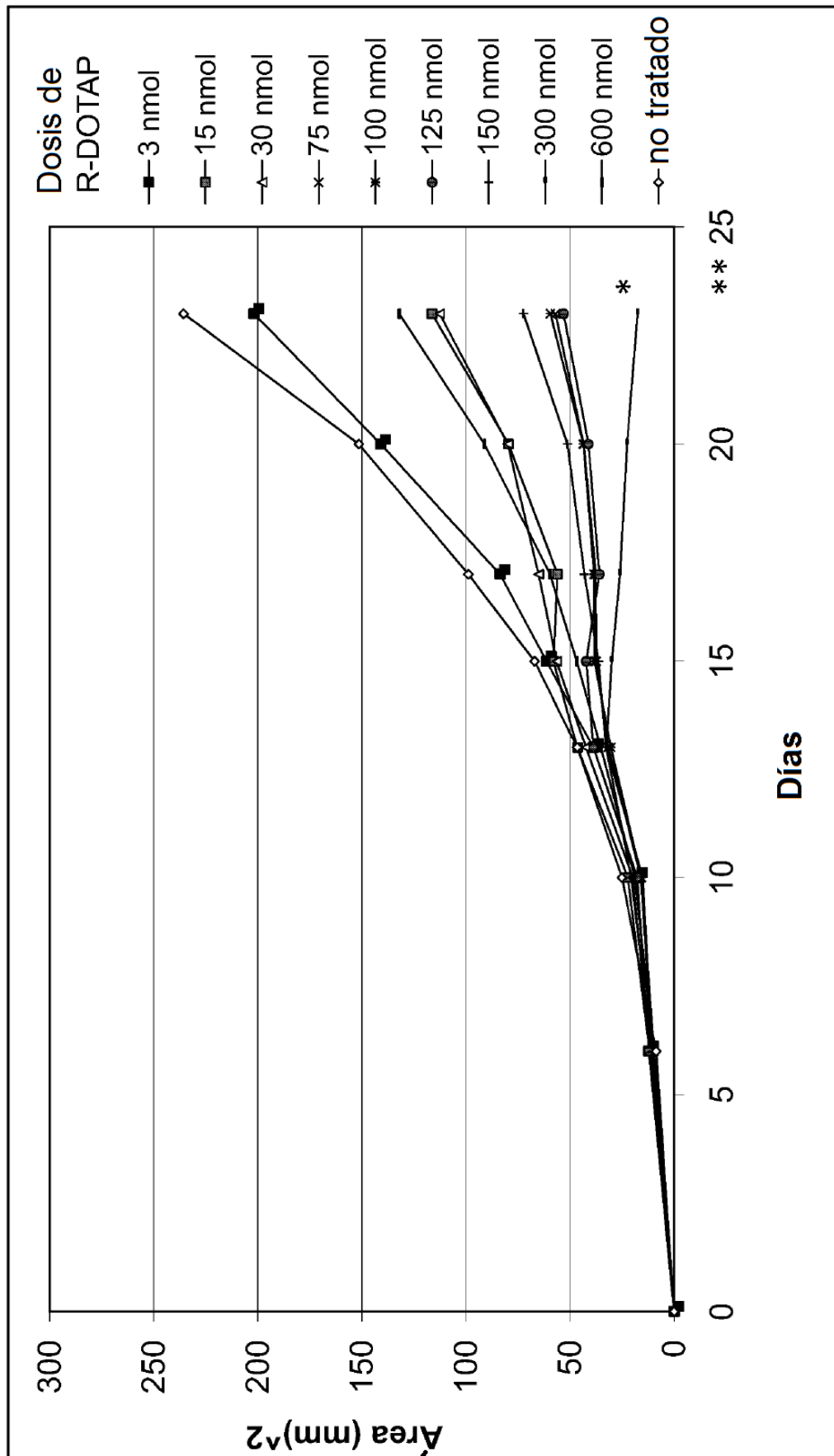


Fig. 15

