

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2007.10.25	(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE COIMBRA REITORIA PAÇO DAS ESCOLAS 3004-531 COIMBRA PT
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.05.15	(72) Inventor(es): MAURO GIACCA IT ANA CRISTINA DA SILVA FILIPE PT SÉRGIO PAULO DE MAGALHÃES SIMÕES PT MARIA DA CONCEIÇÃO MONTEIRO PEDROSO DE LIMA PT
(45) Data e BPI da concessão: /	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **NANO-TRANSPORTADORES DE BASE LIPÍDICA PARA ENTREGA DIRECCIONADA DE VECTORES VIRAIS E PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO ESTÁ RELACIONADA COM NANOPARTÍCULAS TRANSPORTADORAS DE MATERIAL GENÉTICO, PARTICULARMENTE NA FORMA DE VÍRUS RECOMBINANTES (VECTORES VIRAIS), COMPOSTAS POR VESÍCULAS LIPÍDICAS, CONTENDO LÍPIDOS NEUTROS E/OU NEUTROS E NEGATIVOS, UM VECTOR VIRAL E UM LIGANDO RESPONSÁVEL PELO DIRECCIONAMENTO DAS NANOPARTÍCULAS PARA AS CÉLULAS ALVO QUE O VECTOR VIRAL IRÁ TRANSDUZIR, POR FORMA A GARANTIR UMA ENTREGA ESPECÍFICA DE GENES A CÉLULAS ALVO, BEM COMO O SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO. O PROCESSO DE OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS INCLUI BASICAMENTE TRÊS ETAPAS: 1) ASSOCIAÇÃO DOS VECTORES VIRAIS ÀS VESÍCULAS LIPÍDICAS; 2) CONJUGAÇÃO DE UM POLÍMERO HIDROFÍLICO À SUPERFÍCIES DAS NANOVESÍCULAS; 3) CONJUGAÇÃO DE UM LIGANDO À EXTREMIDADE DISTAL DO POLÍMERO HIDROFÍLICO. DESTA FORMA A INVENÇÃO APRESENTA CARACTERÍSTICAS ADEQUADAS PARA ENTREGA DE GENES A UM CONJUNTO ESPECÍFICO DE CÉLULAS APÓS ADMINISTRAÇÃO, NOMEADAMENTE INTRAVENOSA, INDEPENDENTEMENTE DO TROPISMO NORMAL DO VECTOR ASSOCIADO AOS LIPOSSOMAS, PERMITINDO O TRATAMENTO DE PATOLOGIAS EM QUE AS CÉLULAS ALVO DA TERAPIA NÃO ESTEJAM DIRECTAMENTE ACESSÍVEIS A UMA APLICAÇÃO LOCAL E MINIMIZANDO OS EFEITOS SECUNDÁRIOS CONSEQUENTES DA INTERACÇÃO NÃO ESPECÍFICA DOS VECTORES VIRAIS COM OUTRAS CÉLULAS, ASSIM COMO A RESPOSTA IMUNITÁRIA INATA DESENCADEADA CONTRA ESTES VECTORES, APLICANDO-SE, POR ISSO, NA ÁREA FARMACÊUTICA.

RESUMO

"NANO-TRANSPORTADORES DE BASE LIPÍDICA PARA ENTREGA DIRECCIONADA DE VECTORES VIRAIS E PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO"

A presente invenção está relacionada com nanopartículas transportadoras de material genético, particularmente na forma de vírus recombinantes (vectores virais), compostas por vesículas lipídicas, contendo lípidos neutros e/ou neutros e negativos, um vector viral e um ligando responsável pelo direccionamento das nanopartículas para as células alvo que o vector viral irá transduzir, por forma a garantir uma entrega específica de genes a células alvo, bem como o seu processo de obtenção.

O processo de obtenção das nanopartículas inclui basicamente três etapas: 1) associação dos vectores virais às vesículas lipídicas; 2) conjugação de um polímero hidrofílico à superfícies das nanovesículas; 3) conjugação de um ligando à extremidade distal do polímero hidrofílico.

Desta forma a invenção apresenta características adequadas para entrega de genes a um conjunto específico de células após administração, nomeadamente intravenosa, independentemente do tropismo normal do vector associado aos lipossomas, permitindo o tratamento de patologias em que as células alvo da terapia não estejam directamente acessíveis a uma aplicação local e minimizando os efeitos secundários consequentes da interacção não específica dos vectores virais com outras células, assim como a resposta imunitária inata desencadeada contra estes vectores, aplicando-se, por isso, na área farmacêutica.

DESCRIÇÃO

"NANO-TRANSPORTADORES DE BASE LIPÍDICA PARA ENTREGA DIRECCIONADA DE VECTORES VIRAIS E PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO"

Domínio Técnico da Invenção

A presente invenção insere-se na área da biotecnologia farmacêutica, nomeadamente na área da terapia génica. A invenção diz respeito a métodos de preparação de nanopartículas transportadoras de material genético de base lipídica, com aplicação para a entrega específica e selectiva de genes a células alvo, envolvidas em patologias. Mais especificamente consiste em nanopartículas de composição lipídica, transportando vectores adenovirais, direccionadas para células alvo e destinadas ao tratamento de patologias.

Estes nano-transportadores são utilizadas numa composição farmacêutica caracterizadas por conterem um veículo farmacêuticamente aceitável e podendo incluir outros compostos, como por exemplo não limitativo agentes lisosomotrópicos, conservantes, estabilizantes coloidais peptídeos com propriedades fusogénicas e sinais de localização nuclear.

Antecedentes da Invenção

A terapia génica constitui uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de uma grande variedade de patologias, incluindo deficiências hereditárias, como a fibrose cística, ou adquiridas, tais como o cancro e doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. O grande número de ensaios clínicos a decorrer, envolvendo protocolos de terapia génica, enfatiza o seu interesse.

Neste contexto a entrega eficiente e específica de genes a células alvo são considerados aspectos críticos para o sucesso das referidas abordagens terapêuticas. Desse modo, a escolha de um sistema de transporte adequado, para transferência do gene desejado de um modo seguro e eficiente, é de importância crucial.

O interesse suscitado pela área da terapia génica levou ao desenvolvimento de várias estratégias para entrega de genes. De um modo geral, os vectores utilizados para esse fim podem classificar-se em vectores do tipo viral ou vectores não virais. Dentro do segundo grupo, os mais representativos são os sistemas compostos por lipossomas catiónicos e ADN plasmídico (lipoplexos). Apesar da sua relativa segurança, a eficiência de transfecção que caracteriza estes sistemas, é baixa ou inexistente em vários tipos celulares, verificando-se toxicidade para doses elevadas de lipossomas catiónicos. Para além dos problemas referidos, os lipoplexos apresentam características inadequadas para utilização intravenosa. Assim a carga positiva dos lípidos catiónicos, promove não só a interacção inespecífica com macromoléculas de carga negativa existentes na circulação sanguínea (ex. Proteínas), levando à destabilização dos referidos lipoplexos, mas também com células¹ sanguíneas e/ou do endotélio vascular. Esta característica resulta não só em transdução não produtiva, como também em efeitos secundários causados pela expressão do transgene noutras células que não as células alvo. Estas características representam restrições ao sucesso da sua aplicação e, por esse motivo, estes sistemas ainda estão longe de constituírem alternativas viáveis em terapia génica.

O documento *US6133243* divulga a utilização de ADN plasmídico associado a lipossomas catiónicos para tratamento de doenças e relaciona-se com métodos de tratamento de cancro por administração de um complexo de ADN adenoviral/lipossoma a animais portadores de tumores. Por oposição, as nanopartículas alvo da presente invenção não apresentam na sua composição lípidos catiónicos, comumente utilizados por facilitarem a interacção com as células, para além do que se encontram associadas a vectores virais e não directamente ao ADN do vírus, conforme descrito no documento *US6133243*. Adicionalmente, as nanopartículas descritas no âmbito desta patente apresentam um sistema de direccionamento (constituído por um polímero hidrófilo e um ligando), o que permite a interacção com as células de um modo específico, em vez da interacção inespecífica mediada pelos lipossomas catiónicos.

O documento *WO1999025320* divulga a utilização de ADN viral complexado com lipossomas catiónicos para tratamento de doenças, em que o sistema desenvolvido facilita a transferência do gene. No sistema descrito o ADN não está preferencialmente contido numa partícula viral.

Os principais aspectos técnicos inovadores da patente em avaliação são semelhantes aos referidos para o documento *US6133243*.

Os documentos "*Crystal et al., 1994*"², "*Bellon et al., 1997*"³, "*Gahery-Segard et al., 1997*"⁴, "*Tursz et al., 1996*"⁵, "*Welsh et al., 1994*"⁶, "*Zuckerman et al., 1999*"⁷, "*Channon et al., 1996*"⁸, "*Whitlock et al., 2004*"⁹ e "*Lamfers et al., 2001*"¹⁰ divulgam a utilização de vectores adenovirais para transferência de genes e consequente

transdução para uma grande variedade de células. Por este facto, a utilização destes vectores têm-se demonstrado de grande interesse.

Nos documentos referidos os vectores adenovirais são utilizados sem qualquer tipo de modificação, enquanto que as nanopartículas que apresentámos tiveram como base a associação dos referidos vectores a nanovesículas lipídicas e posterior direccionamento.

Outras vantagens atribuídas aos vectores adenovirais incluem a possibilidade de poderem ser produzidos com títulos muito elevados, de permitirem a clonagem de fragmentos de ADN de elevado tamanho, assim como a sua expressão regulada¹¹.

Actualmente, são duas as principais limitações associadas a estes vectores quando se considera a sua administração intra-venosa, visando a entrega de genes direccionada a determinado tipo celular. Uma dessas limitações é o tropismo para outras células, em detrimento das células alvo, o que é em parte devido à dispersão da expressão dos receptores celulares utilizados por estes vectores para reconhecimento e entrada nas células. Esta característica resulta não só em transdução não produtiva, como também em efeitos secundários causados pela expressão do transgene noutras células que não as células alvo. Com efeito, após administração num modelo murínico, mais de 90% dos vectores localizam-se no fígado. As células de Kupffer, os macrófagos predominantes no fígado, reconhecem e internalizam vectores adenovirais, o que conduz a uma eliminação rápida destes. Este aspecto está relacionado com a outra limitação dos vectores adenovirais: a imunogenicidade (*"Brody et al., 1994"*¹², *"Jooss et al.,*

1998"¹³, "Kaplan et al., 1996"¹⁴, "Schagen et al., 2004"¹⁵, "Christ et al., 1997"¹⁶ e "Bessis et al., 2004"¹⁷).

Assim, a administração de doses elevadas destes vectores induz toxicidade como consequência da activação da resposta imunitária inata, a qual envolve a indução de citocinas tais como a IL6 e a IL 8, como resultado da exposição directa das proteínas da cápside viral a monócitos e macrófagos, ou pela exposição de antigénios virais expressos à superfície das células infectadas.

Por outro lado a resposta imunitária adaptativa, é responsável pela neutralização do vector, antes deste atingir as células alvo ("Gahery-Segard et al., 1997"¹⁸, "Yang et al., 1995"¹⁹, "Wohlfart, 1988"²⁰ e "Toogood et al., 1992"²¹. Mesmo que os anticorpos estejam ausentes na primeira administração ("Bessis et al., 2004"¹⁷) podem desenvolver-se rapidamente após exposição dos vectores virais, impedindo a viabilidade de administrações subsequentes. Neste contexto, importa referir que a maioria da população humana já teve contacto com adenovírus e portanto possui imunidade humoral contra estes vectores²².

Uma das estratégias desenvolvidas por outros investigadores para circunscrever alguns dos problemas referidos, baseia-se na eliminação das interacções anteriormente referidas por associação dos vectores virais a lipossomas catiónicos.

Os documentos "Steel JC et al., 2005"²², "Mizuno M, Yoshida Jj., 1998"²³, "Yotnda P et al., 2002"²⁴, "Mizuno M et al., 2002"²⁵, "Steel JC et al., 2007"²⁶, "Steel JC et al., 2004"²⁷ e "Lee et al., 2000"²⁸ divulgam a utilização da associação de vectores adenovirais a lipossomas catiónicos,

demonstrando que os lipossomas catiónicos têm a capacidade de promover a transdução mediada pelos vectores adenovirais e de protegê-los de anticorpos preexistentes.

As nanopartículas descritas no presente pedido de invenção não apresentam na sua composição lípidos catiónicos, comumente utilizados por facilitarem a interacção electrostática com as células (de uma forma não específica). Adicionalmente, as nanopartículas descritas no âmbito desta patente apresentam um sistema de direccionamento (constituído por um polímero hidrófilo e um ligando), o que permite a interacção com as células de um modo específico, em vez da interacção inespecífica mediada pelos lipossomas catiónicos. Adicionalmente, o processo de preparação das nanopartículas inclui um passo de separação dos vectores virais não associados aos lipossomas, ao contrário dos sistemas apresentados.

O documento US6110490 divulga a utilização de membranas com multi ou bi-camadas, contendo pelo menos uma lipopoliamina, e partículas de adenovírus.

As principais diferenças em relação à patente US6110490 e às nanopartículas que desenvolvemos são semelhantes às referidas no parágrafo anterior, com a excepção do direccionamento. Contudo, no exemplo de direccionamento referido pelos autores da referida patente, o ligando é associado directamente à membrana do lipossoma, enquanto que na invenção em avaliação apresentamos um sistema de direccionamento que inclui um polímero hidrófilo, e em que o ligando é acoplado covalentemente ao polímero, permitindo o afastamento da nanovesícula, com inequívocas vantagens em termos de especificidade de interacção com as células alvo,

ao mesmo tempo que confere maiores tempos de circulação às nanopartículas.

Contudo, apesar das vantagens referidas, no que respeita à utilização de misturas de lipossomas catiónicos e vírus, as desvantagens associadas a sistemas catiónicos previamente referidas inviabilizam a administração intravenosa das referidas formulações.

A presente invenção, sendo realizada com lipossomas neutros e/ou neutros e negativos, e contendo um sistema para aumento do tempo de circulação assim como direccionamento activo para células alvo, permite ultrapassar os problemas existentes no estado da arte.

Assim, nesta invenção utiliza-se uma composição de lipossomas diferente das anteriores, na medida em que, no que respeita à composição lipídica dos lipossomas, foram utilizados lípidos neutros e/ou lípidos neutros e negativos, ao contrário das formulações habituais que contém na sua composição lípidos catiónicos e colesterol.

Adicionalmente, os métodos de preparação das composições constantes deste pedido de invenção também diferem dos divulgados no estado da técnica, uma vez que o filme lipídico foi preparado com lípidos não catiónicos e foi hidratado directamente com a solução contendo os vectores adenovirais, ao contrário da maioria dos sistemas apresentados em que os lipossomas são preparados previamente à sua complexação com as partículas virais ou com o ADN viral. O processo de extrusão das nanovesículas contendo vectores adenovirais, para redução e homogeneização do tamanho das partículas opõe-se aos

processos normalmente utilizados, em que a extrusão, quando realizada, é efectuada antes da associação dos vectores adenovirais. Nos sistemas previamente descritos não é efectuada a remoção de vectores virais não associados aos lipossomas. De acordo com o nosso conhecimento, o processo de purificação constituído por uma ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο é apresentada pela primeira vez para remoção de vectores virais livres de lipossomas associadas a vectores virais.

Em nenhum dos sistemas anteriormente referidos está descrita a preparação de nanopartículas direccionadas através da conjugação covalente de ligandos nem estão descritas as condições de acoplamento quer do polímero quer do ligando à superfície da nanopartícula. No âmbito da presente invenção, as condições de acoplamento foram optimizadas em função da manutenção da actividade biológica e viabilidade do vector viral.

Para além disso, o facto do método de preparação das composições incluir um passo que permite separar (purificar) os lipossomas dos vírus livres não associados a estes, permite diminuir a expressão não específica e a resposta inflamatória que seria mediada por esses vectores livres.

Descrição Geral da Invenção

A presente invenção está relacionada com composições para entrega direccionada de genes a células alvo, bem como o seu processo de obtenção.

1. Características das composições de nano-transportadores

Os nanotransportadores compreendem uma associação de vectores adenovirais e nanovesículas lipídicas, as quais contém na sua composição lípidos neutros, ou lípidos neutros e negativos. A selecção deste tipo de lípidos tem por objectivo minimizar as interacções não específicas do nanotransportador com os componentes do sangue (proteínas e células) e/ou com células endotéliais vasculares ou com células de outros órgãos.

A escolha dos lípidos DOPE e CHOL como lípidos adjuvantes deve-se às propriedades fusogénicas do DOPE, e à estabilização das vesículas lipídicas promovidas pelo CHOL, na presença de soro. O EPC utilizado também auxilia na estabilização das nanovesículas lipídicas e permite diminuir a quantidade parcial dos lípidos anteriormente referidos, os quais poderão apresentar tendência para interagir com moléculas do complemento *in vivo*. A molécula de PI foi utilizada sempre que se julgou necessário conferir aos lipossomas carga negativa.

As razões subjacentes à não utilização de lípidos catiónicos prendem-se com a diminuição de interacções entre estes e as proteínas sanguíneas ou com a superfície negativa das células, permitindo a posterior interacção e acumulação em células alvo, diminuindo os riscos de efeitos secundários após administração intravenosa.

As composições de nano-transportadores, para além de conterem as nanopartículas transportadoras, ainda contém um veículo farmacologicamente aceitável e também podem conter outros compostos facilitadores da sua função terapêutica e/ou transportadora. Por exemplo podem conter compostos com capacidade fusogénica incluídos nas membranas ou no

compartimento aquoso das nanopartículas, ou outros destabilizadores de membranas (como por exemplo proteínas ou peptídeos) que promovam ou facilitem a saída do veículo farmacêutico do endossoma e a sua entrega no espaço intracelular. Pode ainda conter sinais de localização nuclear que facilitem a entrada do ADN no núcleo celular, assim como compostos que inibam a degradação dos vectores virais pelo proteossoma. Pode também conter compostos proteicos, ou respectivos genes, que inibam a exposição de porções das proteínas virais ou do transgene à superfície celular, responsável pela eliminação dessas células por parte do sistema imunitário.

Os vectores adenovirais, abrangidos pela presente invenção, podem ser os normalmente utilizados e preparados a partir de técnicas correntes de engenharia genética, incluindo os diferentes serotipos, diferentes possibilidades de construção molecular e diferentes variantes morfológica e estrutural. Por exemplo o vector adenoviral com deleção do gene E1 é produzido em células e posteriormente purificado em tampão HEPES/sacarose pH 8,0 de acordo com o método convencional do gradiente duplo de cloreto de céσιο. Os vectores produzidos correspondem aos serotipos 2 e 5, podendo no entanto corresponder os outros serotipos, e inclui os genes da proteína terapêutica sob o controlo de promotores adequados, por exemplo do promotor do citomegalovírus (CMV). O vector adenoviral pode também ser manipulado geneticamente, no sentido de diminuir a sua imunogenicidade e de modular a sua capacidade de replicação *in vivo*.

A superfície das nanovesículas encontra-se modificada, através da inserção de moléculas de polímeros hidrófilos,

tais como o poli(etilenoglicol) (PEG). As vantagens da inclusão de polímeros hidrofílicos, à superfície da nanopartícula, acarretam várias vantagens: (i) aumento da estabilidade das nanopartículas; (ii) maiores tempos de circulação sanguínea após administração intravenosa (propriedades farmacocinéticas); e (iii) servir de âncora ao acoplamento covalente de ligandos. O polímero hidrofílico utilizado (PEG), permite o acoplamento do ligando por ligação covalente, funcionando como uma ponte entre o lipossoma e o ligando. O facto da ligação referida ser do tipo covalente, permite minimizar o risco de destabilização associado aos lipossomas mais comumente utilizados, em que a associação do ligando a estes ocorre por interacções electrostáticas. Para além do referido é de considerar que o afastamento do ligando da superfície do lipossoma, possibilitado pela molécula de PEG, permita evitar o impedimento estéreo da superfície dos lipossomas, facilitando a interacção entre o ligando e o respectivo receptor.

Os ligandos podem ser um peptídeo, uma proteína, um anticorpo monoclonal (ou qualquer outra variante como por exemplo um fragmento de anticorpo), um aptamero, ou qualquer outra molécula ou construção que resulte numa interacção específica com um receptor existente à superfície de células alvo. Os ligandos seleccionados devem ser caracterizados por estabelecerem ligação com as moléculas existentes nas células alvo de um modo selectivo e com elevada afinidade, sendo que essa ligação deve ser seguida de internalização, para que deste modo se consiga maximizar a entrega do veículo farmacêutico às células alvo. A título de exemplo, o ligando transferrina é um ligando natural que como tal não estimula o sistema

imunitário, enquanto que o anticorpo contra a E-selectina apresenta uma elevada afinidade e selectividade permitindo a entrega eficiente do ADN a células alvo. Entenda-se por selectividade a capacidade de reconhecer as células alvo na presença de outras células e de outros compostos, nomeadamente proteínas, e afinidade a força da ligação estabelecida entre o ligando das nanopartículas e a respectiva molécula expressa à superfície da célula alvo.

A invenção aqui apresentada permite adicionalmente mascarar os vectores adenovirais minimizando a resposta imunitária aguda desencadeada por este tipo de agentes biológicos, permitindo ainda protecção contra a neutralização mediada por anticorpos pré-existentes. No seu conjunto estas características tornam as nanopartículas, e as composições que as contém, adequadas para a administração intravenosa.

Simultaneamente, a possibilidade de modular o tamanho e a carga de superfície dos lipossomas permite controlar a sua estabilidade física, assim como a sua farmacocinética, permitindo a preparação de composições mais adequadas para administração intravenosa.

Por outro lado, o tamanho sub-micrométrico das partículas produzidas permite a circulação sanguínea sem riscos de obstrução de capilares de menor calibre e por períodos de tempo mais prolongados.

Adicionalmente, alterações no tamanho permitem modular a via de internalização celular^{29,30}. Por esse motivo, houve uma preocupação em produzir partículas de baixo tamanho. Os resultados de associação celular obtidos por microscopia confocal revelam que a fluorescência das células incubadas

com lipossomas direccionados de 400 nm, se concentra principalmente a nível da membrana celular, sem que ocorra internalização celular significativa das nanopartículas.

Uma vez que este perfil de associação poderá comprometer a eficiência da entrega de genes às células alvo optou-se pela utilização de lipossomas preparados por extrusão através de membranas de 200 nm de diâmetro de poro. As respectivas imagens de microscopia confocal demonstram que a fluorescência detectada neste caso, se deve não só à ligação dos imunolipossomas à membrana citoplasmática, mas também à internalização pelas células endoteliais, ao contrário do observado com os imunolipossomas de 400 nm.

Os resultados obtidos pela técnica PCS indicam que o tamanho dos imunolipossomas extrudidos através das membranas com diâmetro de poro de 200 nm é de 185,2 nm (+/- 9,4). Estes lipossomas apresentam o referido tamanho médio um mês após a sua preparação, o que consiste num indicador da estabilidade física das nanopartículas.

Deste modo, a utilização de lipossomas neutros ou de carga negativa permite evitar as interacções não específicas com proteínas negativas do soro e membranas celulares, o que aliado ao tamanho sub-micrométrico e à presença do polímero hidrofílico à superfície das partículas confere estabilidade biológica e longos tempos de circulação. Adicionalmente, o acoplamento do ligando, permite a entrega direccionada dos adenovírus recombinantes às células alvo.

2. Processo de obtenção das composições de nano-transportadores

2.1 - Associação de vectores virais a lipossomas neutros e negativos

Para a obtenção das referidas composições, de acordo com a presente invenção, preparou-se material de origem viral que foi encapsulado em nanovesículas lipídicas, através de um processo que envolve a hidratação de um filme lipídico.

Durante o processo de hidratação do filme lipídico, nem todos os vectores adenovirais ficam associados aos lipossomas. Nesse sentido, é importante que estes vírus sejam removidos para evitar a transdução não específica mediada por estes agentes.

Assim, após hidratação do filme lipídico e extrusão dos lipossomas resultantes, os rAd (adenovírus recombinantes) não associados aos lipossomas foram removidos por ultra-centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο.

2.1.1 - Caracterização

O método do cloreto de céσιο, originalmente desenvolvido para purificar adenovírus de resíduos das células onde estes foram produzidos, foi adaptado para purificação de lipossomas associados aos rAd.

A ultra-centrifugação de uma solução salina contendo rAd livres (não associados a lipossomas) originou 3,2% (+/- 4,1) de unidades infecciosas na fase de HBS (fase em que posteriormente se fará a recolha dos lipossomas), enquanto que 94,5 % (+/- 0,8) do número total de unidades infecciosas existentes no gradiente se encontra na interface entre as soluções de cloreto de céσιο com densidades de 1,41 e 1,27. Este resultado indica que o método referido é adequado para remover vectores adenovirais não encapsulados de uma

mistura contendo vectores livres e encapsulados em lipossomas.

A eficiência de encapsulação foi determinada pela técnica de PCR quantitativo em lipossomas contendo adenovirus do tipo 2, codificando a enzima β -galactosidase, sob o controlo do promotor do citomegalovirus (Ad₂pCMVLacZ).

Adicionalmente é possível recuperar as partículas virais não associadas aos lipossomas, por diálise, e reutilizá-los na preparação de novas nanopartículas.

2.2 - Inserção de um polímero hidrofílico à superfície das nanovesículas

Na superfície dos lipossomas encontra-se uma molécula de PEG mono ou bi-funcional. A utilização de moléculas de PEG bi-funcional, implicam a presença de amins primárias ou outros grupos reactivo na composição dos lipossomas, sendo que neste caso o acoplamento foi efectuado ao grupo amina do lípido DOPE.

O acoplamento das moléculas de PEG bi-funcional foi efectuado na presença de tampão de HEPES a pH 7,4, na presença de EDTA, uma vez que estas condições facilitam a reacção de acoplamento e permitem a protecção do outro grupo reactivo.

O excesso de PEG, não acoplado aos lipossomas, foi, neste caso, removido por cromatografia de exclusão molecular, utilizando um tampão de HEPES a pH 7,2, na presença de EDTA, uma vez que estas condições favorecem à posteriori, o acoplamento do ligando ao respectivo grupo reactivo.

2.3 - Acoplamento de um ligando à extremidade distal do polímero hidrofílico

O acoplamento do ligando é efectuado à extremidade distal da molécula de PEG, correspondendo ao terminal reactivo, tanto no caso de moléculas de PEG bifuncionais, como monofuncionais. Sempre que necessário, o ligando é previamente activado de modo a adquirir grupos reactivos, os quais reagem com o terminal reactivo da molécula de PEG.

A activação do ligando, sempre que necessária pode ser efectuada com vários compostos, nomeadamente com 2-iminotiolano, sendo que nestas condições é necessário para cada ligando determinar a razão ideal de 2-iminotiolano/ligando para obter a quantidade ideal de grupos mercapto (SH) associados ao ligando. Demasiados grupos mercapto no ligando podem promover a conjugação da mesma molécula a diferentes grupos reactivos da molécula de PEG, inviabilizando a interacção com as células alvo. A quantidade insuficiente de grupos mercapto no ligando pode comprometer a sua conjugação.

Após acoplamento do ligando, os grupos reactivos ainda existentes são desactivados com os reagentes apropriados, sendo que, o ligando que se encontre em excesso, é removido posteriormente por cromatografia de exclusão molecular.

3 - Demonstração de eficácia dos nanotransportadores obtidos pelo processo descrito

As nanopartículas desenvolvidas apresentam direccionamento eficiente para células alvo e tem a capacidade de transportar os vectores adenovirais até ao espaço intracelular, induzindo expressão do transgene apenas nas

células alvo, mantendo simultaneamente características favoráveis à administração intravenosa.

O perfil de associação celular obtido pela técnica de citometria de fluxo com lipossomas de 200 nm, contendo vectores adenovirais, demonstra que quando os lipossomas direccionados são incubados com células endoteliais activadas 78% das células apresentam uma fluorescência superior aos controlos negativos. Estes controlos correspondem à incubação de lipossomas não direccionados (ou seja, lipossomas aos quais não se procedeu ao acoplamento do ligando) com células activadas e quiescentes (ou seja, células que não expressam a molécula de superfície para a qual os lipossomas foram direccionados) assim como à incubação de lipossomas direccionados com células quiescentes. A especificidade da interacção celular foi confirmada por microscopia confocal.

Entenda-se por células activadas, células que foram incubadas com um mediador inflamatório, por exemplo com o TNF- α , passando a expressar e a apresentar na superfície celular novas moléculas, que não se detectam nas mesmas células enquanto no estado quiescente (não activadas). Este processo de activação mimetiza a situação que decorre, quando em determinadas patologias ocorre acumulação local de mediadores inflamatórios, verificando-se a expressão ou sobre-expressão de determinadas moléculas como a E-selectina, que constituem excelentes alvos para direccionar nanopartículas.

Após verificação da eficiência de associação dos lipossomas direccionados às respectivas células alvo, procedeu-se à análise da respectiva eficiência de transdução por

estabelecimento da curva dose/resposta das nanopartículas, utilizando-se a técnica de citometria de fluxo. Os lipossomas desenvolvidos transduzem especificamente células endoteliais activadas. A incubação de células no estado quiescente com lipossomas direccionados resultou em níveis insignificantes de transdução. O mesmo é válido para lipossomas não direccionados incubados tanto com células endoteliais quiescentes, como com células endoteliais activadas. O aumento da concentração de lipossomas direccionados com a qual as células activadas são incubadas, resulta num aumento do número de células transduzidas, até se atingir um *plateau* de 34,25% de células transduzidas, para uma concentração de lípido de 32 μM .

Estes resultados estão em consonância com os níveis de associação celular previamente descritos e permitem concluir que os níveis de transdução observados em células endoteliais activadas, após tratamento com lipossomas direccionados, são dependentes da dose inicial de lipossomas. A observação das células endoteliais por microscopia confocal confirmou a especificidade na entrega de genes e consequente transdução em células endoteliais activadas.

É de realçar que os estudos de transdução foram realizados, incubando os imunolipossomas com as células por um período de 12 horas, na presença de soro fetal de bovino não desactivado. A especificidade da transdução observada é indicativa da estabilidade das nanopartículas em condições próximas das fisiológicas.

Com o objectivo de desvendar os mecanismos subjacentes à entrega de genes mediada pelas nanopartículas desenvolvidas, as células endoteliais activadas foram incubadas com imunolipossomas durante 1 hora, a 37 ou a 4° C. Os resultados demonstram claramente que a 4° C os lipossomas direccionados ficam retidos à superfície das células sem que ocorra internalização, ao contrário do que se observa quando a incubação é realizada a 37° C. Nestas condições é possível observar lipossomas ligados à superfície celular, mas também uma quantidade significativa de fluorescência citoplasmática, indicação inequívoca da internalização celular das nanopartículas. Estes resultados indicam que a internalização dos lipossomas direccionados é dependente de energia, sugerindo o envolvimento da via endocítica.

Adicionalmente, as células endoteliais previamente activadas, foram incubadas com excesso de ligando (20 µg/ml). Os resultados obtidos demonstram que o excesso de ligando foi suficiente para abolir a transdução mediada por imunolipossomas, indicando claramente que a internalização dos lipossomas direccionados contendo vectores adenovirais está a ser mediada pelo ligando acoplado ao terminal distal da molécula de PEG. Numa perspectiva mais abrangente, estes resultados traduzem a vantagem da estratégia desenvolvida neste trabalho: o direccionamento de vectores adenovirais especificamente para células endoteliais activadas, por uma via de internalização independente do receptor natural destes vectores virais.

As nanopartículas desenvolvidas demonstraram ser eficientes no reconhecimento e entrega de adenovírus recombinantes a células endoteliais activadas, com consequente expressão do

transgene transportado, apresentando características adequadas para administração sistémica, factos que se traduzem no elevado potencial para aplicação em terapia génica para patologias com envolvimento de células endoteliais.

Para além disto, apresentam ainda flexibilidade de preparação em diversos aspectos. Deste modo, podem ser preparadas com lípidos neutros, ou neutros e negativos, de natureza diversa. As nanopartículas desenvolvidas são flexíveis quanto ao vector viral incluído, podendo também considerar-se a inclusão de quimeras virais, resultantes da conjugação de características vantajosas provenientes de dois ou mais vectores virais num só vector viral.

4- Vantagens relativamente a outros produtos e processos análogos e aplicações

As composições, de acordo com a presente invenção, permitem aliar as vantagens dos vectores virais às dos lipossomas direccionados, ou seja, conjugar a elevada eficiência de transdução característica dos vectores adenovirais com a capacidade dos lipossomas direccionados para conferir protecção, atenuar imunogenicidade e direccionar especificamente para as células alvo, ao mesmo tempo que exibem propriedades farmacotécnicas adequadas a uma administração intravenosa.

O assunto desta invenção consiste num novo sistema de entrega de genes em que se utilizam as características das nanovesículas de modo a ultrapassar as desvantagens associadas aos vectores adenovirais. Deste modo é possível mascarar os vectores virais, evitando respostas imunitárias agudas induzidas pelas proteínas da cápside viral,

características destes vectores virais, evitando simultaneamente o efeito neutralizante dos anticorpos preexistentes, que existem potencialmente nos pacientes a tratar. O sistema é versátil em relação ao vector viral introduzido. As vesículas lipídicas apresentam características que permitem minimizar interacção com proteínas séricas e com células que não as células alvo e simultaneamente, apresenta elevados tempos de circulação, características estas, que resultam da presença de polímeros hidrofílicos à superfície das nanovesículas, e da manipulação do tamanho e da carga destas. No seu conjunto os aspectos referidos tornam as nanopartículas, e as composições que as contém, adequadas para a administração intravenosa. Adicionalmente, o direccionamento que lhe foi conferido possibilita o reconhecimento de células alvo (por exemplo células tumorais ou células endoteliais activadas), permitindo a transferência de genes e respectiva expressão especificamente para as células referidas. Simultaneamente, a eficiência de expressão do transgene mediada pelas vesículas é significativamente potenciada pela utilização dos vectores adenovirais, reconhecidos pela sua eficiência de transdução de vários tipos celulares.

Deste modo, a entrega de genes pode ser efectuada de um modo específico sempre que se verifique sobreexpressão ou expressão *de novo* de determinada molécula à superfície das células que são definidas como células alvo. Deste modo, conjugando um ligando à superfície dos lipossomas é possível que estes promovam a ligação específica das nanopartículas à superfícies das células alvo, a sua consequente internalização e transferência do material genético transportado para o citoplasma.

A presente invenção exhibe ainda a possibilidade de permitir a entrega concomitante de genes a células endoteliais activadas da vasculatura de tumores e às células tumorais, dependendo do tamanho dos lipossomas e do tropismo do ligando acoplado à superfície das nanovesículas, podendo utilizar-se ligandos com afinidade para a E-selectina, ou para os receptores da transferrina, respectivamente, ou os dois ligandos em simultâneo, permitindo assim uma abordagem terapêutica mais abrangente e eficaz contra o tumor.

Assim, a presente invenção pode representar uma mais valia terapêutica em situações de isquémia com o objectivo de promover a angiogénese, utilizando-se para tal ligandos com afinidade para a E-selectina, ou outras moléculas expressas especificamente em células endoteliais activadas.

Adicionalmente, pode mediar a entrega intravenosa de genes a células endoteliais activadas presentes em situações inflamatórias como a artrite reumatóide com o objectivo de inibir o processo inflamatório.

Descrição das Figuras

Figura 1: Representação esquemática das nanopartículas direccionadas contendo adenovírus recombinantes (rAd) - rAd (1) encapsulados em lipossomas (2) os quais apresentam a superfície modificada por um polímero hidrófilo (poli(etilenoglicol) ou PEG) (4) ao terminal distal do qual se acoplou o ligando (3).

Figura 2: Representação esquemática da interacção entre os lipossomas contendo os vectores adenovirais com as células alvo. A nanopartícula apresentada na Figura 1 interage com a célula alvo (5), a qual é reconhecida devido à afinidade entre o ligando presente nos lipossomas e as moléculas

expressas à superfície destas (representadas por círculos vermelhos).

Figura 3: Representação esquemática da internalização celular dos lipossomas direccionados e respectivo processamento. Após reconhecimento da nanopartícula às respectivas moléculas de superfície, esta sofre internalização por um processo endocítico, acabando por ser liberto para o citoplasma (6). Após entrada no núcleo (7), os vírus sofrem descapsidação de modo a libertar o ADN viral, permitindo o seu processamento.

Descrição Detalhada da Invenção

1. Preparação das nanopartículas

O filme lipídico, composto por PI (fosfatidilinositol)/EPC (fosfatidilcolina de ovo)/DOPE (dioleil-fosfatidiletanolamina)/CHOL (colesterol) na razão molar 3/2/3/2, ou por EPC/DOPE/CHOL na razão molar 5/3/2, foi preparado por evaporação do clorofórmio da mistura lipídica, recorrendo a um fluxo de azoto. De seguida, o filme lipídico foi hidratado com uma solução aquosa contendo os vectores adenovirais, de modo a obter uma concentração total de lípido de 4,5 mM e uma concentração de vectores adenovirais de $3,5 \times 10^{11}$ unidades infecciosas/ml.

Os lipossomas multilamelares resultantes foram extrudidos por filtros de policarbonato com poros de diâmetro de 200 nm, utilizando um extrusor (Avestin).

Os adenovírus recombinantes não associados aos lipossomas foram separados dos lipossomas contendo rAd por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο. O

gradiente de cloreto de céσιο foi preparado utilizando duas soluções de cloreto de céσιο com massas volúmicas de 1,41 e 1,27 kg/l, tendo-se pipetado 1,5 ml da solução de concentração 1,41 kg/l, e 2,5 ml da solução com concentração 1,27 kg/l. No topo, como última camada, colocaram-se 0,5 ml de lipossomas. O gradiente de cloreto de céσιο foi sujeito a ultracentrifugação a 155 000 g durante 2 horas, a 18° C.

No caso particular, em que se analisou a eficiência deste gradiente para remoção de vectores não encapsulados em lipossomas, a última camada consistiu numa solução de HBS contendo adenovírus recombinantes livres (5×10^7 unidades infecciosas de Ad₅pCMVGFP). A determinação do número de unidades infecciosas por camada foi efectuada em células HUVEC após diálise das diferentes camadas utilizando uma membrana adequada.

Após remoção dos vectores adenovirais não encapsulados procedeu-se à quantificação do colesterol utilizando o *kit Infinity Cholesterol Reagent*. O PEG heterofuncional (NHS-PEG-Mal) foi incubado com os lipossomas numa razão de 5 mg de NHS-PEG-Mal por mg de colesterol, de modo a que o éster N-hidroxisuccinimida (NHS) reaja com as amins primárias do lípido DOPE. A reacção decorreu durante 2 horas, a uma temperatura de 4° C, sob agitação suave e em atmosfera de azoto.

As moléculas de NHS-PEG-Mal que não reagiram foram removidas por cromatografia de exclusão molecular, recorrendo a uma coluna de Sefarose CL-4b. A eluição foi realizada com HBS 7,2 contendo EDTA numa concentração de 2 mM (o perfil de eluição de uma solução de NHS-PEG-Mal

através de uma coluna de Sefarose CL-4b foi previamente determinada por medição da absorvância a 240 nm).

O anticorpo foi previamente activado com 2-iminotiolano, numa razão molar de 1/10 em HBS pH 8, contendo EDTA na concentração de 2 mM, e à temperatura ambiente. Após activação, o 2-iminotiolano foi removido por cromatografia de exclusão molecular. Para tal, preparou-se uma coluna contendo Sefadex G 25 equilibrada com HBS pH 7,2 e EDTA na concentração de 2 mM, e sujeitou-se a centrifugação a 400 g durante 5 minutos e a 4° C para remoção do 2-iminotiolano. O anticorpo activado foi incubado com os lipossomas numa razão de 0,375 mg por μmol de lípido total, por um período de 2 horas ou 12 horas, a 4° C ou à temperatura ambiente, sob agitação suave e em atmosfera de azoto. Após este período, os grupos maleiamida da molécula de PEG ainda activos foram desactivados com β -mercaptoetanol numa razão molar de 1 mol PEG por 5 mol de β -mercaptoetanol. O anticorpo não acoplado e o excesso de β -mercaptoetanol foram removidos por eluição em coluna de Sefarose CL-4b utilizando um tampão de HBS a pH 7,4.

2. Caracterização dos lipossomas

2.1. Medição dos tamanhos finais

O tamanho dos imunolipossomas, diluídos em HBS pH 7,4, foi medido por espectroscopia de correlação fotónica, num aparelho designado *PCS Submicron Particle Size Analyser* da *Beckman Coulter*. As medições foram realizadas a 25 °C, com um tempo de equilíbrio de 5 minutos durante 200 segundos, com um ângulo de leitura a 90°.

2.2. Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi calculada com base na concentração de genomas de adenovírus, determinada por PCR quantitativo, e na concentração de colesterol, determinada utilizando o *kit Infinity Cholesterol Reagent*. O objectivo de representar este parâmetro corrigido para as variações do colesterol prende-se com a necessidade de eliminar o efeito das diluições e das perdas de lípido no valor final da eficiência de encapsulação. As determinações por PCR foram realizadas utilizando *primers* e uma sonda (FAM) desenhados para o promotor CMV, tendo sido adquiridos da *Applied Biosystems*. O *JumpStart Taq ReadyMix* contendo os nucleótidos e a polimerase, foi adquirido da Sigma Genosys. A amplificação e a detecção foram realizadas num instrumento *ABI Prism 7000* da *Applied Biosystem*.

A quantificação dos genomas nas amostras foi realizada imediatamente após a hidratação do filme lipídico, e após a remoção de vectores adenovirais não encapsulados por centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο. Esta quantificação fornece as concentrações iniciais (i) e finais (f) de genomas virais.

A quantificação do colesterol foi realizada imediatamente após a hidratação do filme lipídico (i), e após a remoção de vectores adenovirais não encapsulados (f). A eficiência de encapsulação foi determinada com base na fórmula: (concentração de genomas (f)/concentração de colesterol (f)) / (concentração de genomas (i)/ concentração de colesterol (i))X 100.

2.3. Cultura celular

As células endoteliais humanas da veia umbilical (HUVEC) foram obtidas a partir do Serviço de Células Endoteliais

RuG/AZG (Groningen, Países baixos). As células isoladas foram cultivadas em frascos de cultura (Corning Costar) revestidas com gelatina (Sigma) a 1 % e mantidas a 37° C numa atmosfera de CO₂ a 5% e 95% de humidade. O meio de cultura consiste em RPMI contendo *Glutamax* (Gibco) suplementado com soro fetal de bovino (FBS) a 20% (não desactivado), heparina (Sigma) na concentração de 18 U/ml de, penicilina, estreptomicina e ECGF (Factor de Crescimento Endotelial de bovino da *Roche Applied Science*).

2.4. Medição da eficiência de associação das nanopartículas às células

Os estudos de associação celular foram realizados por citometria de fluxo e por microscopia confocal.

Nos estudos realizados por citometria de fluxo, as células endoteliais HUVEC foram semeadas em placas de 24 poços da Costar, previamente revestidos com gelatina a 1%, com uma densidade de 10 000 células por poço, 24 horas antes da incubação com os lipossomas. Imunolipossomas ou lipossomas não direccionados, contendo adenovírus recombinantes (LP Ad-H18/7 ou LP Ad-PEG) ou não (LP-H18/7 ou LP-PEG), foram incubados com as células endoteliais HUVEC numa concentração de 80 µM de lípido total, durante 4 horas a 37° C, na presença ou ausência de TNF-α (100 ng/ml), previamente incubado com as células durante 1 hora.

Nos estudos de microscopia confocal, as células foram semeadas em lâminas de 8 poços, previamente revestidos com 1% de gelatina, na densidade de 10 000 células por poço. Nas experiências de microscopia confocal utilizaram-se protocolos diversos, quer para os lipossomas desprovidos de adenovírus (vazios), quer para aqueles contendo adenovírus.

Assim, os estudos de associação de lipossomas vazios foram realizados incubando LP-H18/7 ou LP-PEG com células endoteliais HUVEC numa concentração de 80 μM durante 4 horas a 37°C, na presença ou ausência de TNF- α (100 ng/ml), previamente incubado com as células durante 1 hora. Nos estudos de associação celular, os lipossomas contendo vectores adenovirais (LP-Ad- H18/7 ou LP- Ad- PEG), foram incubados com as células endoteliais HUVEC numa concentração de 40 μM . Para activar as células, o TNF- α foi previamente incubado com as células durante 4 horas na concentração de 100 ng/ml. Subsequentemente, as células foram lavadas e incubadas com as formulações durante 1 hora, às temperaturas de 4°C ou 37°C.

2.5. Medição da eficiência de expressão de entrega de genes às células

As experiências de transfecção foram realizadas recorrendo à citometria de fluxo e à microscopia confocal.

Nos estudos de citometria de fluxo, as células endoteliais HUVEC foram semeadas numa placa de 24 poços, na densidade de 10 000 células por poço, 24 horas antes da experiência de transdução. Os lipossomas, LP Ad-H18/7 ou LP Ad-PEG, foram incubados com as células endoteliais HUVEC na concentração de 40 μM , embora em algumas condições tenham sido utilizadas outras concentrações. A incubação foi realizada por um período de 12 horas a 37°C, na presença ou ausência de TNF- α na concentração de 100 ng/ml. Nos estudos de inibição da transfecção, as células foram pré-incubadas durante 30 minutos com H18/7, após 4 horas de incubação com TNF- α . Os lipossomas foram então incubados com as células por 1 hora, ainda na presença de E-

selectina. Após este período, as células foram lavadas e incubadas durante mais 48 horas antes de realizar as experiências de citometria de fluxo.

Para os estudos de microscopia confocal o procedimento seguido foi semelhante com a diferença do plaqueamento das células, o qual foi realizado conforme descrito na secção *Medição da eficiência de associação das nanopartículas às células (2.4)*.

Todas as experiências foram realizadas na presença de soro fetal de bovino não inactivado a 20%.

2.6. Avaliação da associação celular e da expressão do transgene

Nos estudos de citometria de fluxo, as células endoteliais HUVEC foram lavadas três vezes com PBS, incubadas com uma solução de tripsina/EDTA até se destacarem das placas, e imediatamente ressuspensas em PBS contendo 20% de soro. Após centrifugação foram novamente ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo para determinação das células positivas para GFP. Para os estudos de transdução os lipossomas foram marcadas com Rh-PE para evitar interferência com a leitura da fluorescência da GFP, e para a análise da associação celular os lipossomas foram marcados com Fluor-PE uma vez que o aparelho de citometria de fluxo não permitia a análise da Rho-PE.

Para os estudos por microscopia confocal, as células foram lavadas com PBS e fixadas com p-formaldeído (PFA) a 4% e a 4°C. As células foram lavadas com PBS, e preparadas com meio de montagem *VectaShield* contendo DAPI, apropriado para a análise de amostras que apresentam fluorescência. Os

lipossomas preparados para os estudos de transdução foram marcados com Rh-PE pela razão já referida acima, e os lipossomas preparados para os estudos de associação celular foram marcadas tanto com Rh-PE como com Fluor-PE.

EXEMPLOS

Exemplo 1

A incubação de lipossomas de carga negativa acoplados ao ligando transferrina, com células que apresentem receptores de transferrina, induz um aumento na extensão de associação celular quando comparado com a condição em que as mesmas células são incubadas com lipossomas sem transferrina. Os lipossomas marcados com 2,5% de Rh-PE foram incubados com células HEK-293 na concentração de 300 μM , durante 4 horas. Após esse período, as células previamente semeadas em lâminas de 8 poços, foram lavadas com PBS, fixadas com PFA a 4% durante 15 minutos e posteriormente incubadas com solução de glicina na concentração de 0,1 M. As lâminas foram lavadas e montadas com meio de montagem Vectashield contendo DAPI, e finalmente analisadas por microscopia confocal. Os resultados demonstram que a associação dos lipossomas às células é superior quando estes possuem o ligando transferrina acoplado à sua superfície, indicando que os lipossomas podem ser vectorizados para células contendo receptores para a transferrina.

Exemplo 2

Lipossomas de carga negativa acoplados a um anticorpo anti-E-selectina apresentam uma interacção acentuada com células que expressam E-selectina. Os lipossomas vazios, marcados com Fluor-PE, preparados por extrusão através de membranas com poro de diâmetro de 200 nm, foram incubados com PEG heterofuncional durante 2 horas. Após remoção do PEG não

acoplado e incubação do ligando, os lipossomas foram incubados com células HUVEC activadas, numa concentração de 80 μM de lípido, durante 4 horas. A activação das células com $\text{TNF-}\alpha$, na concentração de 100 ng/ml, teve início uma hora antes da incubação com os lipossomas e prosseguiu durante as 4 horas de incubação. Este processo de activação induz a expressão da molécula E-selectina à superfície das células. Após esse período, as células foram lavadas, e o número de células positivas para a associação de lípido foi determinada por citometria de fluxo.

Exemplo 3

Lipossomas de carga negativa contendo rAd, acoplados a um anticorpo anti-E-selectina, apresentam uma interacção acentuada com células que expressam E-selectina. Os imunolipossomas marcados com Rh-PE e contendo $\text{Ad}_5\text{pCMVGFP}$, foram incubados com as células HUVEC activadas ou quiescentes (LP- H18/7), na concentração de 40 μM de lípido total, durante 1 hora. Os lipossomas controlo foram incubados com células activadas ou quiescentes (LP- PEG), nas mesmas condições. A activação das células HUVEC foi realizada por incubação com $\text{TNF-}\alpha$ na concentração de 100 ng/ml durante quatro horas, antes da incubação com os lipossomas. Após incubação dos lipossomas, as células foram lavadas, fixadas e preparadas com meio de montagem para análise por microscopia confocal, utilizando uma objectiva Pan- Neofluar 40x/0.75.

Exemplo 4

A interacção entre lipossomas de carga negativa contendo rAd, acoplados a um anticorpo anti-E-selectina induzem a transdução especificamente nas células endoteliais activadas

e não nas quiescentes. Os imunolipossomas marcados com Rh-PE foram preparados a partir de uma concentração inicial de Ad₅pCMVGFP de $3,75 \times 10^{11}$ ui/ ml e incubados com células activadas ou quiescentes na concentração de 40 μ M em lípido total. O mesmo foi aplicado a lipossomas não direccionados. Após 12 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio fresco e as células foram incubadas mais 36 horas. Após essa incubação, as células foram lavadas, fixadas e preparadas com meio de montagem para análise por microscopia confocal, utilizando uma objectiva *Pan-Neofluar 40x/0.75*. Os resultados demonstram que a associação celular específica anteriormente observada resulta na transdução específica das células alvo, que expressam E-selectina, e não nas que não expressam a referida molécula. Adicionalmente, nanopartículas semelhantes às referidas, mas sem o referido anticorpo não têm igualmente capacidade de transdução das células alvo, nas condições experimentais referidas.

Exemplo 5

A interacção entre lipossomas de carga negativa contendo rAd, acoplados a um anticorpo anti-E-selectina induzem a transdução especificamente nessas células, a qual é dependente da concentração de lípido inicial utilizada.

Os imunolipossomas marcados com Rh-PE foram preparados a partir de uma concentração inicial de Ad₅pCMVGFP de $3,75 \times 10^{11}$ ui/ ml e incubados com células activadas (LP Ad-H18/7 A) ou quiescentes (LP Ad-H18/7 R), em concentrações variáveis de lípido total. O mesmo se aplicou a lipossomas controlo não direccionados (LP Ad- PEG A e LP Ad- PEG R). Após 12 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio fresco e as células foram incubadas

mais 36 horas. Após essa incubação, as células foram lavadas, destacadas e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados apresentados foram determinados definindo o valor da fluorescência de células incubadas com HBS como a fluorescência basal.

Exemplo 6

A internalização celular de lipossomas de carga negativa contendo rAd, acoplados a um ligando é inibida a 4°C. Os imunolipossomas marcados com Rh-PE e contendo Ad₅pCMVGFP foram incubados na concentração de 40 µM de lípido total com células HUVEC activadas ou quiescentes (LP- H18/7). A incubação foi realizada durante 1 hora, a 37° C ou a 4° C. A activação das células HUVEC foi realizada durante 4 horas antes da incubação com os lipossomas por incubação com TNF-α na concentração de 100 ng/ml. Após incubação com os lipossomas, as células foram lavadas, fixadas e preparadas com meio de montagem para análise por microscopia confocal utilizando uma objectiva de óleo *Plan- Neofluar* 100x/1.3. A análise do perfil de associação celular de imunolipossomas contendo vírus recombinantes encapsulados, demonstrou que a 4°C este processo é inibido, o que implica a utilização de energia no processo de internalização celular.

Exemplo 7

A transdução mediada por lipossomas de carga negativa contendo rAd, acoplados a um ligando é inibida pela presença de um excesso de ligando livre no meio de cultura.

Os imunolipossomas marcados com Rh-PE e contendo Ad₅pCMVGFP foram incubados na concentração de 40 µM em lípido total com células HUVEC activadas (LP Ad-H18/7 A) ou quiescentes

(LP Ad- H18/7- R), durante 1 hora. Os lipossomas não direccionados foram incubados nas mesmas condições, com células activadas (LP Ad-PEG A) ou quiescentes (LP Ad-PEG R). As células HUVEC activadas ou quiescentes foram incubadas durante 30 minutos com o ligando livre na concentração de 20 µg/ml e subsequentemente com os lipossomas ainda na presença desse ligando. A activação das células HUVEC foi realizada durante 4 horas antes da incubação com os lipossomas por incubação com TNF- α na concentração de 100 ng/ml. Após 48 horas, as células foram lavadas, destacadas e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados apresentados foram determinados definindo os valores da fluorescência de células incubadas com HBS como a fluorescência basal.

O efeito do excesso de ligando na eficiência da transdução demonstra que a transdução é dependente do ligando acoplado à superfície dos lipossomas.

Bibliografia

- 1 Merdan T, Kopecek J, Kissel Tj. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 715-758.
- 2 Crystal RG et al. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 1994; 8: 42-51.
- 3 Bellon G et al. Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 15-25.
- 4 Gahery-Segard H et al. Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer. Longitudinal study

of the immune responses to transgene and viral products. *J Clin Invest* 1997; 100: 2218-2226.

5 Tursz T et al. Phase I study of a recombinant adenovirus-mediated gene transfer in lung cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1857-1863.

6 Welsh MJ et al. Cystic fibrosis gene therapy using an adenovirus vector: in vivo safety and efficacy in nasal epithelium. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 209-219.

7 Zuckerman JB et al. A phase I study of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to a lung segment of individuals with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2973-2985.

8 Channon KM et al. Adenoviral gene transfer of nitric oxide synthase: high level expression in human vascular cells. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 962-972.

9 Whitlock PR et al. Adenovirus-mediated transfer of a minigene expressing multiple isoforms of VEGF is more effective at inducing angiogenesis than comparable vectors expressing individual VEGF cDNAs. *Mol Ther* 2004; 9: 67-75.

10 Lamfers ML et al. In vivo suppression of restenosis in balloon-injured rat carotid artery by adenovirus-mediated gene transfer of the cell surface-directed plasmin inhibitor ATF.BPTI. *Gene Ther* 2001; 8: 534-541.

11 McDonald GA et al. Efficient adenoviral gene transfer to kidney cortical vasculature utilizing a fiber modified vector. *J Gene Med* 1999; 1: 103-110.

12 Brody SL et al. Acute responses of non-human primates to airway delivery of an adenovirus vector containing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 821-836.

13 Jooss K, Ertl HC, Wilson JM. Cytotoxic T-lymphocyte target proteins and their major histocompatibility complex

- class I restriction in response to adenovirus vectors delivered to mouse liver. *J Virol* 1998; 72: 2945-2954.
- 14 Kaplan JM et al. Humoral and cellular immune responses of nonhuman primates to long-term repeated lung exposure to Ad2/CFTR-2. *Gene Ther* 1996; 3: 117-127.
- 15 Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE, Hoeben RC. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50: 51-70.
- 16 Christ M et al. Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol Lett* 1997; 57: 19-25.
- 17 Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* 2004; 11 Suppl 1: S10-17.
- 18 Gahery-Segard H et al. Humoral immune response to the capsid components of recombinant adenoviruses: routes of immunization modulate virus-induced Ig subclass shifts. *Eur J Immunol* 1997; 27: 653-659.
- 19 Yang Y, Li Q, Ertl HC, Wilson JM. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol* 1995; 69: 2004-2015.
- 20 Wohlfart C. Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms. *J Virol* 1988; 62: 2321-2328.
- 21 Toogood CI, Crompton J, Hay RT. Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 6): 1429-1435.
- 22 Steel JC et al. Modification of liposomal concentration in liposome/adenoviral complexes allows significant protection of adenoviral vectors from

neutralising antibody, in vitro. *J Virol Methods* 2005; 126: 31-36.

23 Mizuno M, Yoshida J. Improvement of transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus vector by entrapment in multilamellar liposomes. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 352-354.

24 Yotnda P et al. Bilamellar cationic liposomes protect adenovectors from preexisting humoral immune responses. *Mol Ther* 2002; 5: 233-241.

25 Mizuno M, Ryuke Y, Yoshida J. Cationic liposomes conjugation to recombinant adenoviral vectors containing herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment reduces viral antigenicity and maintains antitumor activity in mouse experimental glioma models. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 825-829.

26 Steel JC et al. Increased tumor localization and reduced immune response to adenoviral vector formulated with the liposome DDAB/DOPE. *Eur J Pharm Sci* 2007; 30: 398-405.

27 Steel JC, Cavanagh HM, Burton MA, Kalle WH. Microsphere-liposome complexes protect adenoviral vectors from neutralising antibody without losses in transfection efficiency, in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 1371-1378.

28 Lee SG et al. Enhancement of adenoviral transduction with polycationic liposomes in vivo. *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 1329-1335.

29 Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra Dj. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 2004; 377: 159-169.

30 Conner SD, Schmid SLj. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; 422: 37-44.

Lisboa, 25 de Outubro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Nano-transportadores de base lipídica para entrega direccionada de vectores virais **caracterizadas por** serem compostos por uma parte lipídica, as vesículas lipídicas, formadas por lípidos neutros e/ou neutros e negativos, por um vector viral contendo o material genético a transferir para as células alvo, por um sistema de direccionamento às células alvo e ainda por terem uma dimensão variável entre 100 a 400 nm.
2. Nano-transportadores de base lipídica, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizadas por** as vesículas lipídicas apresentarem na sua composição lípidos neutros e/ou neutros e negativos, como por exemplo não limitativo, DOPE, EPC, PI e CHOL, e não apresentarem na sua composição lípidos catiónicos.
3. Nano-transportadores de base lipídica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados por** o sistema de direccionamento poder ser composto por um polímero hidrofílico conjugado à superfície dos lipossomas que permita o acoplamento de um ligando.
4. Nano-transportadores de base lipídica, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizado por** polímero hidrofílico exibir um ou dois grupos reactivos.
5. Nano-transportadores de base lipídica, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizados por** o polímero hidrófilo ser preferencialmente uma molécula de PEG com um tamanho entre 1000 e 5000 Da, podendo ser tanto mono como bi-funcional.

6. Nano-transportadores de base lipídica, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizados por** o ligando se encontrar acoplado ao terminal reactivo distal das moléculas do polímero hidrófilo.

7. Nano-transportadores de base lipídica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados por** o sistema de direccionamento ser composto apenas por um ligando.

8. Nano-transportadores de base lipídica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados por** o sistema de direccionamento poder ser composto por mais que um ligando para direccionamento a alvos celulares diferentes.

9. Nano-transportadores de base lipídica, de acordo com as reivindicações 7 e 8, **caracterizados pelos** ligandos se encontrarem directamente acoplados à superfície das nanovesículas.

10. Composições farmacêuticas, **caracterizadas por** conterem partículas de nano-transportadores de base lipídica, de acordo com as reivindicações anteriores.

11. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizadas por** conterem um veículo farmacologicamente aceitável e por poderem incluir outros compostos, como por exemplo não limitativo agentes lisosomotrópicos, conservantes, estabilizantes coloidais peptídeos com propriedades fusogénicas e sinais de localização nuclear.

12. Processo de produção de nano-transportadores de base lipídica, de acordo com as reivindicações 1 a 8, **caracterizado por** os seguintes passos de obtenção:

1) preparação de lipossomas por hidratação de filme lipídico com uma suspensão de vírus recombinantes, como por exemplo não limitativo, vectores adenovirais, seguido de purificação;

2) conjugação de um polímero hidrofílico, como por exemplo não limitativo PEG, seguido de purificação;

3) acoplamento de ligando/s à extremidade distal do polímero hidrofílico ou à superfície dos lipossomas, seguido de purificação.

13. Processo de produção de nano-transportadores, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizado por** a suspensão lipossómica, após o passo 1, ser submetida a um processo de extrusão para homogeneização de tamanhos.

14. Processo de produção de nano-transportadores, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizado por** a suspensão lipossómica ser submetida a um processo de purificação, como por exemplo não limitativo, por ultra-centrifugação em gradiente de cloreto de cézio, para remoção dos vírus não encapsulados.

15. Processo de produção de nano-transportadores, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado por**, no passo 2, o polímero hidrofílico, com um grupo reactivo, poder ser inserido na mistura lipídica antes da hidratação do filme lipídico ou inserido após formação dos lipossomas.

16. Processo de produção de nano-transportadores, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado por**, no passo 2, o

polímero hidrofílico, com dois grupos reactivos, poder ser acoplado após formação dos lipossomas.

17. Processo de produção de nano-transportadores, de acordo com as reivindicações 15 e 16, **caracterizado por** a formulação ser submetida a um processo de purificação, como por exemplo não limitativo, cromatografia de exclusão molecular, para remoção das moléculas de polímero não conjugadas à superfície dos nano-transportadores.

18. Processo de produção de nano-transportadores, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado por**, no passo 3, um ligando como por exemplo não limitativo, uma proteína, um peptídeo, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, um aptamero ou uma molécula que exiba afinidade específica para um receptor celular, ser acoplado covalentemente à extremidade distal de um polímero hidrofílico conjugado à superfície dos nano transportadores de base lipídica.

19. Processo de produção de nano-transportadores, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizado por** o ligando ser acoplado covalentemente à extremidade distal de um polímero hidrofílico previamente à sua inserção à superfície dos nano transportadores de base lipídica.

20. Processo de produção de nano-transportadores, de acordo com as reivindicações 18 e 19, **caracterizado por** a formulação ser submetida a um processo de purificação, como por exemplo não limitativo, cromatografia de exclusão molecular, para remoção dos ligandos não acoplados.

21. Utilização dos nano-transportadores das reivindicações 1 a 8, **caracterizada por** ser aplicada na entrega direccionada de genes a células alvo.

22. Utilização dos nano-transportadores, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizada por** se destinarem a aplicação em terapia, como por exemplo não limitativo, em terapia génica, anti-cancerígena, de doenças neurodegenerativas, de doenças vasculares, e de doenças inflamatórias e outras associadas a processos envolvendo células endoteliais activadas.

23. Utilização dos nano-transportadores das reivindicações 1 a 8, **caracterizada por** se destinar ao fabrico de uma composição farmacêutica para entrega direccionada de material genético a células-alvo, preferencialmente para aplicação em terapias génicas, como por exemplo não limitativos, terapias anti-cancerígenas, doenças neurodegenerativas e em terapias para tratamento de patologias associadas a processos envolvendo células endoteliais activadas.

24. Utilização, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizada pela** composição farmacêutica ser preferencialmente uma composição para aplicação intravenosa.

25. Utilização do processo de produção de nano-transportadores, de acordo com as reivindicações 12 a 20, **caracterizada por** ser aplicada à produção de nano-transportadores de base lipídica, contendo material genético e um sistema de direccionamento, de elevada especificidade, responsável pela identificação das células

alvo que o vector viral irá transduzir, destinados à terapia génica.

Lisboa, 25 de Outubro de 2007

1/2

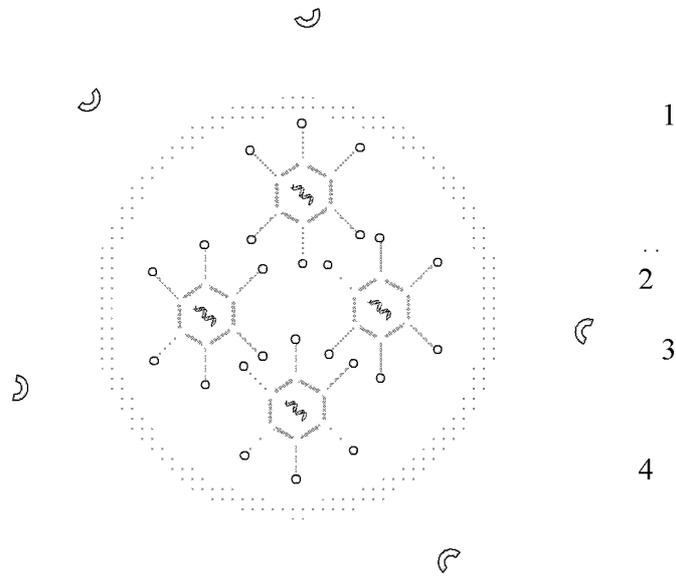
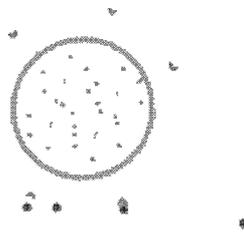


Figura 1



(5)

Figura 2

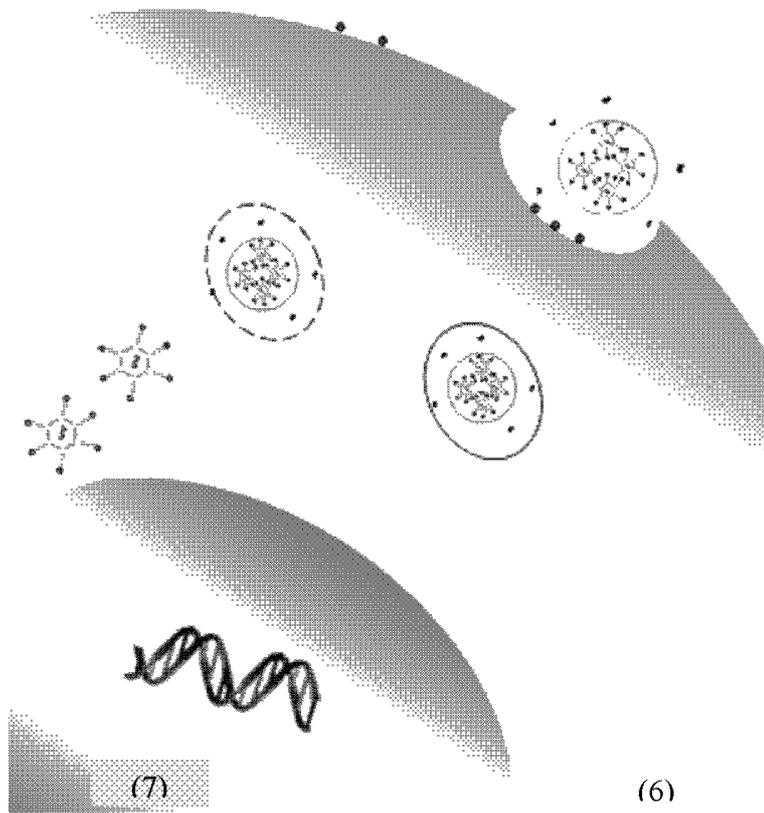


Figura 3