

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2006.03.08	(73) Titular(es): MEBIOPHARM CO., LTD.
(30) Prioridade(s): 2005.03.10 JP 2005067469	1-14-5 AKASAKA MINATO-KU TOKYO107-0052 JP
(43) Data de publicação do pedido: 2007.12.12	(72) Inventor(es):
(45) Data e BPI da concessão: 2014.11.26 028/2015	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **NOVAS COMPOSIÇÕES DE LIPOSSOMAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE REVELAÇÃO PROPORCIONA COMPOSIÇÕES QUE CONTÊM LÍPIDOS, INCLUINDO FÁRMACO DE ENCAPSULAÇÃO DE LIPOSSOMAS DIRECIONADOS, E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DAS MESMAS, ALÉM DE MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES QUE CONTÊM LÍPIDOS, INCLUINDO A UTILIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DIRECIONADOS NO TRATAMENTO DO CANCRO E DE OUTRAS DOENÇAS.

RESUMO

NOVAS COMPOSIÇÕES DE LIPOSSOMAS

A presente revelação proporciona composições que contêm lípidos, incluindo fármaco de encapsulação de lipossomas direcionados, e formulações farmacêuticas das mesmas, além de métodos para a produção e utilização das composições que contêm lípidos, incluindo a utilização dos lipossomas direcionados no tratamento do cancro e de outras doenças.

DESCRIÇÃO

NOVAS COMPOSIÇÕES DE LIPOSSOMAS

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A eficácia de tratamentos para muitas doenças, incluindo cancro, melhorou dramaticamente nas últimas décadas; no entanto, muitos regimes de tratamento exigem a utilização de fármacos com efeitos secundários deletérios, que incluem, por exemplo, alopecia, náuseas, vômitos, fadiga, etc. Alguns regimes de tratamento também implicam na utilização de fármacos que não são estáveis sob condições fisiológicas, por exemplo, bioterápicos (por exemplo, genes ou produtos génicos) e/ou outros fármacos que são facilmente degradados ou de algum modo alterados mediante administração e, dessa forma, perdem sua eficácia antes de obterem o resultado terapêutico desejado. Tal instabilidade também faz com que o armazenamento e a preparação para administração dos fármacos sejam mais difíceis e custosos.

Há diversas classes de agentes anticancro, que englobam quase 100 fármacos individuais, além de várias terapêuticas de combinação de fármacos, métodos de libertação e regimes de tratamento. Os agentes anticancro podem ser classificados de acordo com vários critérios como, por exemplo, a classe de composto e o estado de doença tratado. Foram desenvolvidos certos agentes que se beneficiam da divisão rápida das células de cancro e que têm como alvo fases específicas no ciclo celular, o que proporciona outro método de classificação. Os agentes também podem ser agrupados de acordo com o tipo e a gravidade de seus efeitos secundários ou com o método de libertação. No entanto, a classificação mais comum de agentes anticancro que não se baseiam em bioterápicos é por classe de composto químico, o que, de forma ampla, abrange

o mecanismo de ação desses compostos.

Dependendo da fonte de referência consultada, há ligeiras diferenças na classificação de agentes anticâncer. As classes de compostos são descritas em "Physician's Desk Reference" da seguinte forma: alcaloides; agentes alquilantes; antibióticos antitumorais; antimetabólitos; hormonas e análogos de hormona; imunomoduladores; agentes fotossensibilizantes, e outros agentes diversos.

A classe de compostos dos alcaloides também pode ser denominada de inibidores mitóticos, uma vez que são específicos de uma fase do ciclo celular e servem para inibir a mitose ou para inibir as enzimas necessárias para a mitose. Eles são derivados geralmente de alcaloides vegetais e de outros produtos naturais e funcionam durante a fase M do ciclo celular. Essa classe de compostos é frequentemente usada para o tratamento de neoplasias como leucemia linfoblástica aguda, linfoma de Hodgkin e não Hodgkin; neuroblastomas e cânceres do pulmão, mama e testículos.

Os agentes alquilantes constituem uma grande classe de agentes quimioterápicos, que inclui as seguintes subclasses, as quais, cada uma, representam diversos fármacos individuais: sulfonatos de alquilo; aziridinas; etileniminas e metilmelaminas; mostardas de azoto; nitrosoureas; e outros, incluindo compostos de platina. Os agentes alquilantes atacam células neoplásicas alquilando diretamente o ADN das células e, portanto, fazendo com que o ADN seja incapaz de replicar. Essa classe de compostos é normalmente usada para tratar diversas doenças, incluindo leucemias crônicas, linfoma não Hodgkin, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo e certos cânceres de pulmão, mama e ovário.

As nitrosoureas são frequentemente categorizadas como agentes alquilantes, e têm um mecanismo de ação similar, mas em vez de alquilar diretamente o ADN, elas inibem as

enzimas de reparo do ADN o que leva à incapacidade de replicação. Esses compostos têm a vantagem de serem capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e, portanto, podem ser usados para o tratamento de tumores cerebrais.

Os antibióticos antitumorais possuem atividade antimicrobiana e citotóxica e também interferem com ADN ao inibirem quimicamente enzimas e mitose ou alterarem as membranas celulares. Eles não são específicos para uma fase do ciclo celular e são amplamente usados para tratar diversos cancros.

A classe de agentes anticancro antimetabólitos interfere com o crescimento de ADN e ARN e é específica para a fase S do ciclo celular. Esses agentes podem ainda ser divididos pelo tipo de composto, incluindo análogos do ácido fólico, análogos de purina e análogos de pirimidina. Eles são utilizados frequentemente no tratamento de leucemia crónica, tumores de mama, de ovário e gastrintestinais.

Há duas classes de hormonas ou análogos de hormona usados como agentes anticancro. As hormonas corticosteroides e as hormonas sexuais. Embora algumas hormonas corticosteroides possam tanto matar células de cancro ao tornar mais lento o crescimento de tumores, e serem usados no tratamento de linfoma, leucemias etc., as hormonas sexuais funcionam basicamente tornando mais lento o crescimento de cancros mama, próstata e do endométrio. Há inúmeras subclasses de hormonas e análogos de hormona, incluindo androgénios, antiadrenérgicos, antiandrogénios, antiestrogénios, inibidores da aromatase, estrogénios, análogos de hormona de libertação de hormona luteinizante (LHRH) e progestinas.

Uma classe menor de agentes anticancro adicional é classificada como imunoterapia. Esses são agentes que visam a estimular o sistema imunológico para atacar mais eficazmente as células neoplásicas (cancerosas). Essa

terapêutica é usada frequentemente em combinação com outras terapêuticas.

Há também diversos compostos, por exemplo, camptotecinas, que são geralmente listados como "outros" agentes anticâncer e que podem ser usados para tratar várias neoplasias.

Também são utilizadas combinações de agentes anticâncer no tratamento de diversos cânceres. Por exemplo, Sanofi Synthelabo comercializa ELOXATIN™ (oxaliplatina para injeção) para o tratamento do câncer colorretal para utilização em combinação com 5-fluorouracil e leucovorin. Essa combinação de fármacos é frequentemente usada associada à cirurgia no tratamento do câncer colorretal. Oxaliplatina é um agente alquilante que supostamente atua inibindo tanto a replicação quanto a transcrição do ADN. Diferentemente de outros agentes de platina, a oxaliplatina demonstrou uma menor probabilidade de desenvolvimento de resistência. Oxaliplatina é adicionalmente descrita nas Patentes US Nº 4.169.846, 5.338.874, 5.298.642, 5.959.133, 5.420.319, 5.716.988, 5.290.961 e em Wilkes GM. "New therapeutic options in colon, cancer: focus on oxaliplatin" *Clin. J. Oncol. Nurs.* (2002) 6: 131-137.

Embora haja uma abundância de agentes anticâncer, o benefício desses compostos frequentemente é sobrepujado pela gravidade dos efeitos secundários produzidos pelo agente. Essa comparação é frequentemente denominada índice terapêutico, que descreve o equilíbrio entre a dose necessária para se obter a destruição das células de câncer, comparada com a dose na qual a substância é inaceitavelmente tóxica para o indivíduo. A desvantagem da maioria dos agentes anticâncer é o intervalo relativamente pequeno do índice terapêutico (ou seja, o intervalo de dosagem estreita na qual as células de câncer são destruídas sem toxicidade inaceitável para o indivíduo). Essa característica limita a frequência e a dosagem quando

um agente é útil, e frequentemente os efeitos secundários tornam-se intoleráveis, antes do cancro poder ser totalmente erradicado.

Os efeitos secundários graves apresentados com a maioria dos quimioterápicos contra o cancro são resultado da natureza não específica desses fármacos, que não distinguem entre células saudáveis e cancerosas e, em vez disso, destroem ambas. Certos fármacos específicos para o ciclo celular tentam reduzir esses efeitos, visando fases do ciclo celular envolvidas na replicação e divisão celulares. Esses fármacos, no entanto, não distinguem entre células cancerosas e células saudáveis que estejam se submetendo à divisão celular normal. As células com maiores riscos com esses tipos de quimioterapia são aquelas que se submetem à divisão celular frequentemente, incluindo células sanguíneas, células do folículo piloso e células dos sistemas reprodutivo e digestivo.

Os efeitos secundários mais comuns dos agentes anticancro são náuseas e vômitos. Uma grande proporção de indivíduos também sofre de mielossupressão, ou supressão da medula óssea, que produz as células sanguíneas vermelhas, células sanguíneas brancas e plaquetas. Esses e outros efeitos secundários também são exacerbados pela supressão do sistema imunológico concomitante com a destruição e ausência de produção de células sanguíneas brancas, e pelo risco associado de infecção oportunista.

Outros efeitos secundários comuns a uma ampla gama de agentes anticancro incluem: queda do cabelo (alopecia); perda de apetite; perda de peso; alterações do paladar; estomatite e esofagite (inflamação e úlceras); constipação; diarreia; fadiga; lesão cardíaca; alterações do sistema nervoso; lesão pulmonar; lesão do tecido reprodutivo; lesão hepática; lesão renal e do sistema urinário.

A ampla gama dos efeitos secundários associados à maioria dos agentes anticancro e sua gravidade em

indivíduos que já se encontram debilitados pela doença e possivelmente com o sistema imunológico comprometido levaram os pesquisadores a buscar mecanismos pelos quais pudessem aliviar alguns dos efeitos secundários, mantendo a eficácia do tratamento. Foram utilizadas várias abordagens para esse problema. Elas incluem a quimioterapia de combinação, na qual vários agentes anticâncer são administrados em conjunto; terapêuticas adjuvantes, em que agentes adicionais são prescritos juntamente com o agente anticâncer para combater os efeitos secundários do agente anticâncer; tratamentos de modalidade combinada, nos quais a quimioterapia é combinada com radiação e/ou cirurgia; e veículos de libertação alternativos para a administração de agentes anticâncer, por exemplo, a encapsulação de agentes anticâncer em lipossomas.

Os lipossomas são formados quando fosfolípidos e seus derivados são dispersos na água. Mediante dispersão na água, os fosfolípidos formam vesículas fechadas denominadas "lipossomas", que são caracterizados por bicamadas lipídicas que encapsulam um núcleo aquoso. Vários lipossomas foram usados como veículos para agentes terapêuticos encapsulados, tais como fármacos, enzimas e sequências genéticas para utilização na ciência médica, na ciência farmacêutica e na bioquímica.

Exemplos de composições de lipossomas incluem as Patentes US N° 4.983.397, 6.476.068, 5.834.012, 5.756.069, 6.387.397, 5.534.241, 4.789.633, 4.925.661, 6.153.596, 6.057.299, 5.648.478, 6.723.338, 6.627.218; Publicações de Pedidos de Patentes US N°: 2003/0224037; 2004/0022842; 2001/0033850; 2003/0072794; 2003/0082228; 2003/0212031; 2003/0203865; 2004/0142025; 2004/0071768; Pedidos de Patente Internacional WO 00/74646; WO 96/13250; WO 98/33481; Papahadjopolulos D., Allen T.H., Gbizon A., et al. "Sterically stabilized liposomes; Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy" *Proc*

Natl Acad Sci U.S.A. (1991) 88: 11460-11464; Allen TM., Martin F.J. "Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines" *Semin. Oncol.* (2004) 31: 5-15 (supl. 13). Weissig et al. *Pharm. Res.* (1998) 15: 1552-1556.

Nos estágios iniciais no desenvolvimento de lipossomas, foram usados fosfolípidos de ocorrência natural da membrana celular, tais como fosfolípidos da gema do ovo e fosfolípidos de soja. No caso de serem administrados por via intravenosa, no entanto, os lipossomas que utilizam esses fosfolípidos podem ser incorporados no sistema reticuloendotelial do fígado ou do baço, causando um problema de baixo tempo de retenção no sangue e, dessa forma, reduzindo a eficácia do fármaco. Portanto, como uma forma de solucionar esse problema, foram usados fosfolípidos sintéticos cuja porção lipídica contém apenas ligações saturadas como constituinte da membrana do lipossoma a fim de enrijecer a membrana do lipossoma.

Num esforço para prolongar a semivida circulatória dos lipossomas e evitar a captação pelo sistema reticuloendotelial, os pesquisadores desenvolveram lipossomas que foram modificados pela incorporação de polietileno glicol ou outros polímeros hidrofílicos (por exemplo, um lipossoma de PEG em que um ou mais dos lípidos constituintes foram modificados por adesão de PEG). Lipossomas modificados com PEG também foram frequentemente denominados lipossomas "protegidos". Doxil™ (injeção de lipossoma de HCl de doxorubicina) é uma doxorubicina encapsulada em lipossoma, com polietileno glicol (PEG) auxiliar utilizado para evitar o sistema reticuloendotelial (RES) e prolongar o tempo de circulação do fármaco. Veja-se Vail D.M., Amantea M.A., Colbern G.T., et al., "Pegylated Liposomal Doxorubicin: Proof of Principle Using Preclinical Animal Models and Pharmacokinetic Studies". *Semin. Oncol.* (2004) 31 (Supl. 13): 16-35. No entanto, efeitos adversos causados também por retenção sanguínea prolongada (por

exemplo, síndrome mão-pé, um efeito adverso de Doxil® sobre o sistema periférico, etc.), foram reconhecidos como um problema.

Exemplos de lipossomas incluem as Patentes US N° 4.983.397, 5.013.556, 6.316.024, 6.056.973, 5.945.122, 5.891.468, 6.126.966, 5.593.622, 5.676.971, 6.586.559 e 5.846.458, Publicações de Pedidos de Patente US N° 2003/0224037, 2004/0022842, 2003/0113262, 2002/0136707, Pedidos de Patente Internacional WO 99/30686, WO 02/41870 Alimiñana et al., *Prep. Biochem. Biotech.* (2004) 34(1): 77-96. Lipossomas também são descritos nas Patentes US N° 6.228.391, 6.197.333, 6.046.225, 5.292.524, e Publicações de Pedidos de Patente US N° 20050271588, 20040213833, 20040029210, 20030175205, 20030162748, 20030130190, 20030059461 e 20020034537.

Além dos lipossomas modificados por PEG, os pesquisadores desenvolveram vários outros lípidos derivatizados. Esses lípidos derivatizados também podiam ser incorporados em lipossomas. Veja-se, por exemplo: Pedido de Patente Internacional WO 93/01828; Park Y.S., Maruyama K., Huang L.. *"Some negatively charged fosfolipids derivatives prolong the liposome circulation in vivo"*. *Biochimica et Biophysics Acta* (1992) 1108: 257-260; Ahl et al., *Biochimica Biophys. Acta* (1997) 1329: 370-382.

Composições lipídicas adicionais são descritas nas Patentes US N° 6.936.272, 6.897.196, 6.077.834, e nas Publicações de Pedidos de Patente US N° 20050136064, 20040234588, 20030215490, 20030166601 e 20010038851.

Além da modificação de lipossomas com PEG e com outros polímeros hidrofílicos, os pesquisadores também desenvolveram lipossomas que tinham como alvo especificamente tipos celulares particulares por incorporação de fatores de direcionamento (também denominados ligandos de direcionamento) para tipos celulares particulares. Exemplos de fatores/ligandos de

direcionamento incluem asialoglicoproteína, folato, transferrina, anticorpos, etc. Em alguns casos, um ou mais dos lípidos constituintes podiam ser modificados pela adesão de um fator de direcionamento.

Exemplos de composições lipídicas que incluem fatores de direcionamento incluem as Patentes US N° 5.049.390, 5.780.052, 5.786.214, 6.316.024, 6.056.973, 6.245.427, 6.524.613, 6.749.863, 6.177.059, 6.530.944, as Publicações de Pedidos de Patente US N° 2004/0022842, 2003/0224037, 2003/143742, 2003/0228285, 2002/0198164, 2003/0220284, 2003/0165934, 2003/0027779, os Pedidos de Patente Internacional N° WO 95/33841, WO 95/19434, WO 2001037807, WO 96/33698, WO 2001/49266, WO 9940789, WO 9925320, WO 9104014, WO 92/07959, EP 1369132, JP 2001002592; Iinuma H, Maruyama K, et al., "Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer" *Int. J. Cancer* (2002) 99: 130-137; Ishida O., Maruyama K., Tanahashi H., Iwatsuru M., Sasaki K., et al., "Liposomes bearing polyethylene glycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors *in vivo*" *Pharmaceutical Research* (2001) 18: 1.042-1.048, Holmberg et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1989) 165 (3): 1.272-1.278; Nam et al., *J. Biochem. Mol. Biol.* (1998) 31(1): 95-100; Nag et al., *J. Drug Target.* (1999) 6 (6): 427-438.

Em particular, Iinuma et al. desenvolveram um lipossoma Tf-PEG, com transferrina (Tf) anexada na superfície do lipossoma. Iinuma et al., mostraram que um maior número de lipossomas estava ligado à superfície das células tumorais, e que havia uma maior captação de lipossomas pelas células tumorais para lipossoma Tf-PEG, comparado com PEG-lipossoma (Iinuma et al., *ibid*; Ishida et al., *ibid*).

No entanto, apesar dos avanços recentes feitos no

campo da libertação do fármaco e do composto marcado, incluindo a utilização de composições de lipossomas, ainda há uma necessidade de composições de lipossomas aprimoradas para a libertação de fármacos e compostos marcados para células e/ou tecidos específicos que obtenham um efeito terapêutico ou de diagnóstico. Em particular, no campo do cancro, são necessárias formulações farmacológicas com especificidade aprimorada e toxicidade reduzida para assegurar o benefício terapêutico, sem afetar de forma adversa as células saudáveis e que também não resultem em efeitos secundários deletérios para o indivíduo que está a ser tratado. Da mesma forma, compostos marcados que possam ser usados para detetar condições, particularmente condições potencialmente fatais, num estágio inicial (por exemplo, com elevada especificidade e/ou elevada sensibilidade) e possam monitorizar com precisão a gravidade/extensão da condição (por exemplo, progressão e/ou regressão, com ou sem tratamento) também melhorariam significativamente a qualidade e o sucesso da terapêutica.

O documento EP 1 209 469 A1 (Vectron Therapeutics AG, 29 de Maio de 2002) descreve um "sistema de diagnóstico direcionado" que compreende um portador negativamente carregado, uma fração de direcionamento, e um agente de diagnóstico, e métodos para a sua preparação e utilização. O sistema de diagnóstico direcionado pode ser na forma de um lipossoma (veja-se, por exemplo, parágrafo [0021] no mesmo). Como foi descrito no parágrafo [0081] no mesmo, os lipossomas foram preparados a partir de uma mistura de DOPS / DLPE / Colesterol / N-glutaril-DPPE (3:3:3:1 numa base molar). Como foi descrito no parágrafo [0083] no mesmo, um péptido RGD foi então unido à superfície lipossomal por meio da ativação primeiro do grupo carboxilo N-glutaril-DPPE com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EC-DI) e então reagindo-o com o péptido RGD. Note que "DOPS" é 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoserina; "DLPE" é 1,2-

dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina; e "DPPE" é "1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina".

O documento WO 96/04232 A1 (Cooper-Lipotech, Inc., 31 de Julho de 1986) descreve composições formadas de lipossomas que têm proteínas funcionalmente ativas ligadas pela superfície numa concentração de 100-600 µg de proteína/µmol de lípido. As proteínas são unidas através de ligações de amida a cadeias espaçadoras ancoradas ao lipossomas usando, por exemplo, grupos carboxilo ou N-hidroxisuccinimida ativados. Como foi descrito na página 21, linhas 18-27 no mesmo, sob o cabeçalho "PE-NHS Liposomes", o antissoro de coelho contra BSA-DNP (um anticorpo) foi acoplado aos lipossomas de PE-NHS que foram preparados a partir de uma mistura de PC (50 mol por cento), reagente de acoplamento de PE-suberoil-NHS (10 mol por cento), colesterol (40 mol por cento), e uma quantidade traço de ¹²⁵I-PE. Os exemplos no mesmo descrevem a preparação das PE-amidas de vários ácidos dicarboxílicos: a PE-amida de ácido glutárico (Exemplo I), a PE-amida de ácido succínico (Exemplo II), a PE-amida de ácido 1,12-dodecanodicarboxílico (Exemplo III), a PE-amida de 1,20-eicosanodicarboxílico ácido (Exemplo IV), e a PE-amida de ácido 1,8-octanodicarboxílico (Exemplo VI). O Exemplo VI também descreve a preparação de lipossomas correspondentes das misturas de uma das PE-amidas (1 µmol) com colesterol (10 µmol) e PC (9 µmol). O Exemplo VII descreve o acoplamento subsequente de IgG de ratinho (um anticorpo) aos lipossomas usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (ECDI), com eficiências de acoplamento de 30 a 60 %. O Exemplo VIII no mesmo descreve a preparação dos ésteres succinimidílicos de diversas PE-amidas de vários ácidos dicarboxílicos: ácido glutárico, ácido adípico, ácido subérico e ácido 1, 12-dodecanodicarboxílico. O Exemplo X descreve a preparação de lipossomas correspondentes das misturas de um dos ésteres

succinimidílicos de uma das PE-amidas (1 μmol) com colesterol (10 μmol) e PC (9 μmol). O Exemplo XI descreve o acoplamento subsequente de IgG de ratinho (um anticorpo) aos lipossomas usando tampão de MEPS-MOPS com eficiências de acoplamento de 65 a 73 % e teores de proteína de desde 428 até 479 μmol de proteína/ μmol de lípido.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

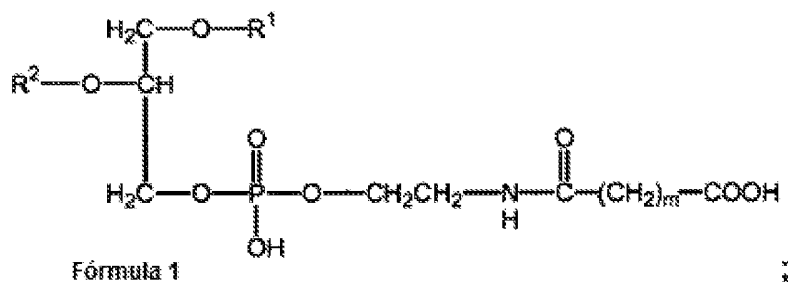
Um primeiro aspecto da presente invenção é um lipossoma direcionado que compreende:

um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento,

um fármaco encapsulado ou composto marcado e,

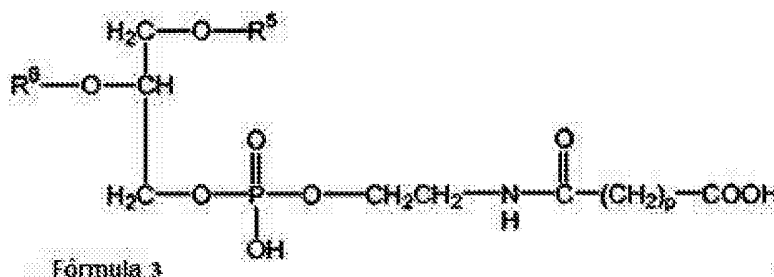
pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico; em que o fator de direcionamento está presente numa quantidade de 10 a 50 μg por mg de lípido; e em que:

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



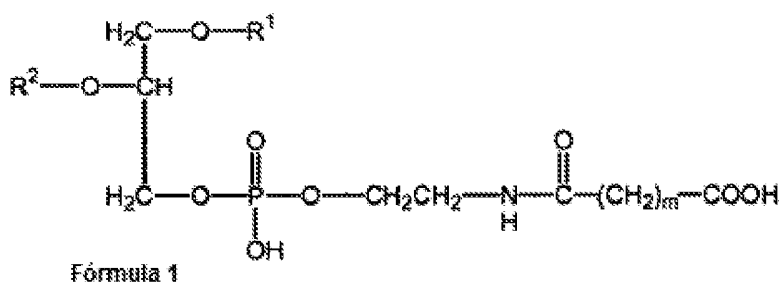
em que:

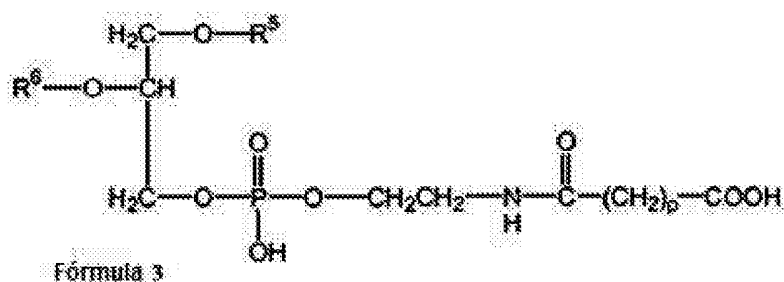
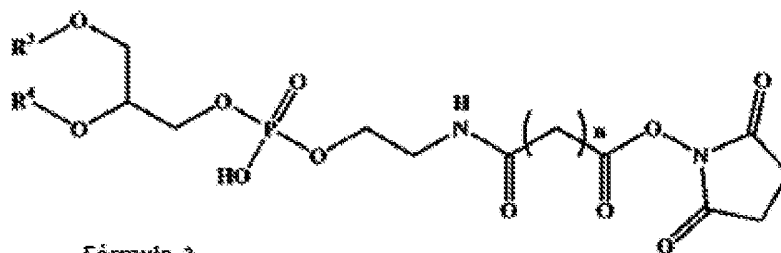
R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que o lipossoma não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, semi-fosfatidil etanolamina(s) sintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,





em que:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e

m , n , e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10;

e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

Numa forma de realização, a fosfatidilcolina inclui uma fração de um ácido gordo saturado.

Numa forma de realização, a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC.

Numa forma de realização, o lipossoma compreende DMPC e colesterol, DSPC e colesterol, POPC e colesterol, ou DPPC e colesterol.

Numa forma de realização, o lipossoma compreende DMPC e colesterol.

Numa forma de realização, m e p são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4.

Numa forma de realização, m e p são iguais.

Numa forma de realização, m e p são 3.

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo.

Numa forma de realização, R^1 e R^2 são iguais, e R^5 e R^6 são iguais.

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são iguais.

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo.

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo, e m e p são 3.

Numa forma de realização, a fosfatidilcolina é DMPC ou DSPC, e o pelo menos um lípido adicional é colesterol.

Numa forma de realização, o ligando de direcionamento é selecionado a partir de transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico, uma cadeia de açúcar, e um fragmento de um anticorpo monoclonal.

Numa forma de realização, o ligando de direcionamento é selecionado a partir de transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico e uma cadeia de açúcar.

Numa forma de realização, o ligando de direcionamento é transferrina.

Numa forma de realização, a transferrina é numa forma holo, mas não numa forma apo.

Numa forma de realização, a transferrina é numa forma holo.

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo, m e p são 3, o ligando de direcionamento é transferrina, a fosfatidilcolina é DMPC, e o pelo menos um lípido adicional é colesterol.

Numa forma de realização, o diâmetro médio do lipossoma é de 50 nm a 250 nm.

Numa forma de realização, o fármaco está presente.

Numa forma de realização, o fármaco é um agente anticancro.

Numa forma de realização, o fármaco é um fármaco citotóxico.

Numa forma de realização, o fármaco é um composto de platina.

Numa forma de realização, o composto de platina é biplatina, cisplatina, carboplatina, ormaplatina, oxaliplatina, zeniplatina, enloplatina, lobaplatina ou espiroplatina.

Numa forma de realização, o fármaco é oxaliplatina.

Numa forma de realização, o fármaco é oxaliplatina; R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo; m e p são 3; o ligando de direcionamento é transferrina; a fosfatidilcolina é DMPC; e o pelo menos um lípido adicional é colesterol.

Numa forma de realização, a oxaliplatina é dissolvida numa solução aquosa de um açúcar selecionado a partir de trehalose, maltose, sucrose, manose, lactose, manitol, glicerol e dextrose.

Numa forma de realização, o açúcar é numa concentração de desde cerca de 1 até cerca de 20 por cento de açúcar (v/v).

Numa forma de realização, a concentração de oxaliplatina é de 0,1 mg/ml a 25 mg/ml dentro do lipossoma.

Numa forma de realização, o fármaco é um inibidor de topoisomerase I.

Numa forma de realização, o inibidor de topoisomerase I é topotecano ou irinotecano.

Numa forma de realização, o fármaco é um alcaloide da vinca.

Numa forma de realização, o alcaloide da vinca é vincristina, vinblastina, vinleurosina, vinrodisina, vinorelbina ou vindesina.

Numa forma de realização, o fármaco é um ácido nucleico.

Numa forma de realização, o ácido nucleico é um oligonucleótido antissense ou uma ribozima.

Numa forma de realização, o fármaco é um agente alquilante.

Numa forma de realização, o fármaco é um taxano, um antagonista metabólico, um antibiótico antitumoral, um hormônio terapêutica fármaco, ou um fármaco de alvo molecular.

Numa forma de realização, o lipossoma não compreende um lípido catiónico.

Numa forma de realização, o lipossoma não compreende um lípido aniônico.

Um segundo aspecto da presente invenção é um método de produção de um lipossoma direcionado do primeiro aspecto, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais fosfolípidos,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento,
e,
o pelo menos um lípido adicional,
para formar uma mistura de lípidos;

(b) adicionar o fármaco ou composto marcado à mistura de lípidos formada na etapa (a);

(c) formar um lipossoma.

Numa forma de realização, o método compreende adicionalmente uma etapa de: (d) purificar o lipossoma da etapa (c).

Numa forma de realização, o fármaco na etapa (b) está em solução aquosa antes da mistura.

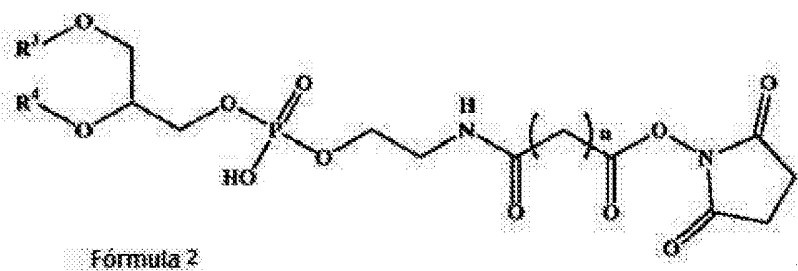
Numa forma de realização, etapa (c) compreende sonicação, agitação, ou extrusão.

Um terceiro aspecto da presente invenção é um método de produção de um lipossoma direcionado do primeiro aspecto, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais fosfolípidos,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e,
o pelo menos um lípido adicional,
para formar uma mistura de lípidos,

em que o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



em que:

R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

n é, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

(b) adicionar o fármaco ou composto marcado à mistura de lípidos formada na etapa (a);

(c) formar um lipossoma; e,

(d) ligar um ligando de direcionamento ao éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

Numa forma de realização, o método compreende adicionalmente uma etapa de: (e) purificar o lipossoma da etapa (d).

Numa forma de realização, o fármaco na etapa (b) está em solução aquosa antes da mistura.

Numa forma de realização, etapa (c) compreende sonicação, agitação, ou extrusão.

Um quarto aspeto da presente invenção é uma formulação farmacêutica que compreende um lipossoma direcionado do primeiro aspeto e um ou mais portadores, excipientes, diluentes, estabilizantes, ou conservantes farmaceuticamente aceitáveis.

Um quinto aspeto da presente invenção é um lipossoma direcionado do primeiro aspeto, para utilização num método de tratamento do corpo humano ou animal por meio da terapêutica.

Um sexto aspeto da presente invenção é um lipossoma direcionado do primeiro aspeto, em que o lipossoma direcionado compreende um fármaco, e o fármaco é um agente anticancro, para utilização num método de tratamento do cancro.

Um sétimo aspeto da presente invenção é a utilização de um lipossoma direcionado do primeiro aspeto, em que o lipossoma direcionado compreende um fármaco, e o fármaco é um agente anticancro, no fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro.

Um oitavo aspeto da presente invenção é um lipossoma direcionado do primeiro aspeto, em que o lipossoma direcionado compreende um composto marcado, para utilização num método de diagnóstico.

Um nono aspeto da presente invenção é a utilização de um lipossoma direcionado do primeiro aspeto, em que o lipossoma direcionado compreende um composto marcado, no fabrico de um agente de diagnóstico.

Um décimo aspeto da presente invenção é um lipossoma em branco que compreende:

um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-

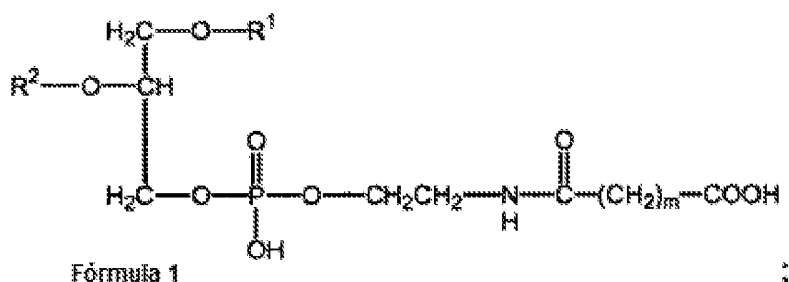
dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e, pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol,

em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico;

em que o fator de direcionamento está presente numa quantidade de 10 a 50 μg por mg de lípido;

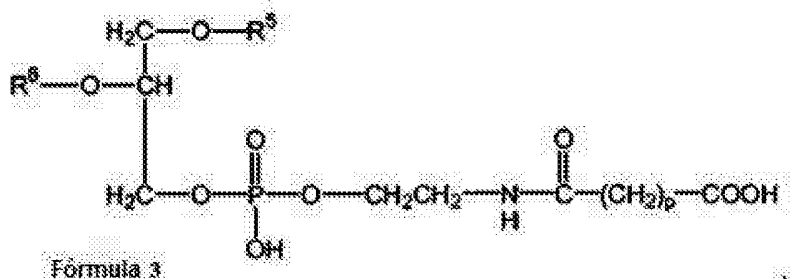
e em que:

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



em que:

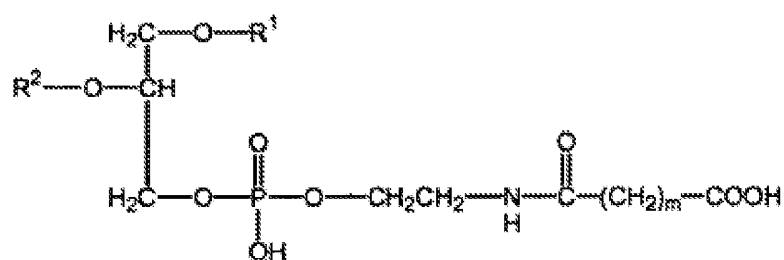
R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um

grupo acilo, e

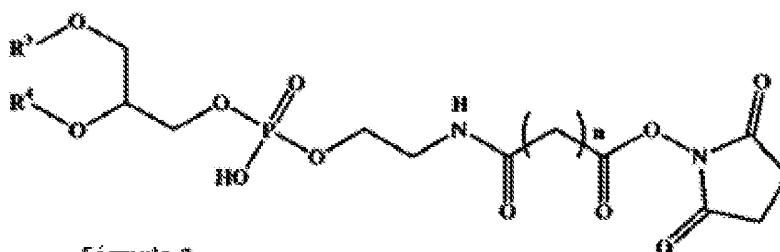
m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que o lipossoma não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

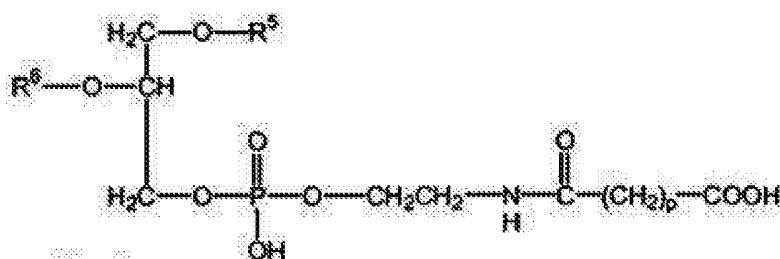
em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, semi-fosfatidil etanolamina(s) sintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,



Fórmula 1



Fórmula 2



Fórmula 3

em que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente

um grupo acilo, e m, n, e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10; e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

Numa forma de realização, a fosfatidilcolina inclui uma fração de um ácido gordo saturado.

Numa forma de realização, a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC.

Numa forma de realização, o lipossoma compreende DMPC e colesterol, DSPC e colesterol, POPC e colesterol, ou DPPC e colesterol.

Numa forma de realização, o lipossoma compreende DMPC e colesterol.

Numa forma de realização, m e p são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4.

Numa forma de realização, m e p são iguais.

Numa forma de realização, m e p são 3.

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo.

Numa forma de realização, R^1 e R^2 são iguais, e R^5 e R^6 são iguais.

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são iguais.

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo.

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo, e m e p são 3.

Numa forma de realização, a fosfatidilcolina é DMPC ou DSPC, e o pelo menos um lípido adicional é colesterol.

Numa forma de realização, o ligando de direcionamento é selecionado a partir de transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico, uma cadeia de açúcar, e um fragmento de um anticorpo monoclonal.

Numa forma de realização, o ligando de direcionamento é selecionado a partir de transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico e uma cadeia de açúcar.

Numa forma de realização, o ligando de direcionamento

é transferrina.

Numa forma de realização, a transferrina é numa forma holo, mas não numa forma apo.

Numa forma de realização, a transferrina é numa forma holo.

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo, m e p são 3, o ligando de direcionamento é transferrina, a fosfatidilcolina é DMPC, e o pelo menos um lípido adicional é colesterol.

Numa forma de realização, o diâmetro médio do lipossoma é de 50 nm a 250 nm.

Numa forma de realização, o lipossoma não compreende um lípido catiónico.

Numa forma de realização, o lipossoma não compreende um lípido aniónico.

Um décimo primeiro aspeto da presente invenção é um método de produção de um lipossoma em branco do décimo aspeto, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais fosfolípidos,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento,
e,
o pelo menos um lípido adicional,
para formar uma mistura de lípidos; e

(b) formar um lipossoma.

Numa forma de realização, o método compreende adicionalmente uma etapa de (c) purificar o lipossoma da etapa (b).

Numa forma de realização, etapa (b) compreende sonicação, agitação, ou extrusão.

Um décimo segundo aspeto da presente invenção é um método de produção de um lipossoma em branco do décimo

aspeto, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

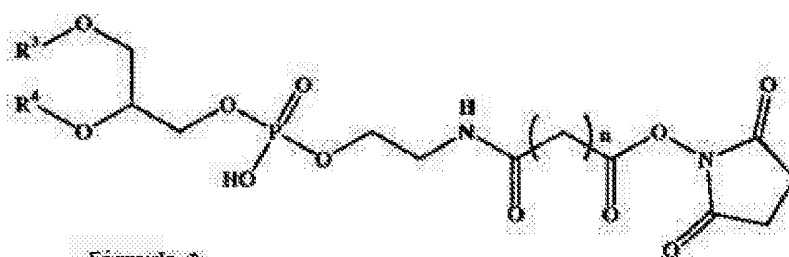
o um ou mais fosfolípidos,

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e,

o pelo menos um lípido adicional,

para formar uma mistura de lípidos,

em que o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



em que:

R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

n é, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

(b) formar um lipossoma; e,

(c) ligar um ligando de direcionamento ao éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico para formar uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento.

Numa forma de realização, o método compreende adicionalmente uma etapa de (d) purificar o lipossoma da etapa (c).

Numa forma de realização, etapa (b) compreende sonicação, agitação, ou extrusão.

Um décimo terceiro aspeto da presente invenção é um método de preparação de um lipossoma terapêutico, que compreende a etapa de: (a) encapsular um fármaco num lipossoma em branco do décimo aspeto.

Um décimo quarto aspeto da presente invenção é uma mistura de lípidos que compreende uma mistura de:

um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina,

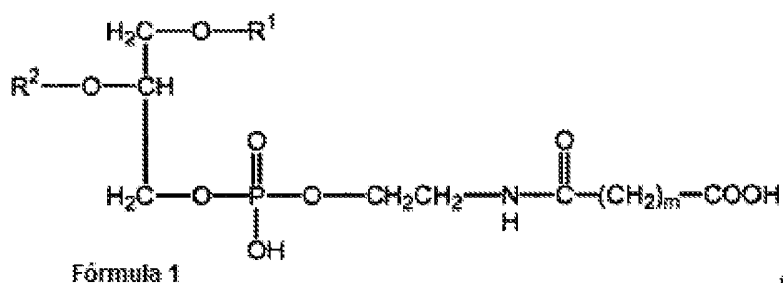
uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,

um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e,

pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol,

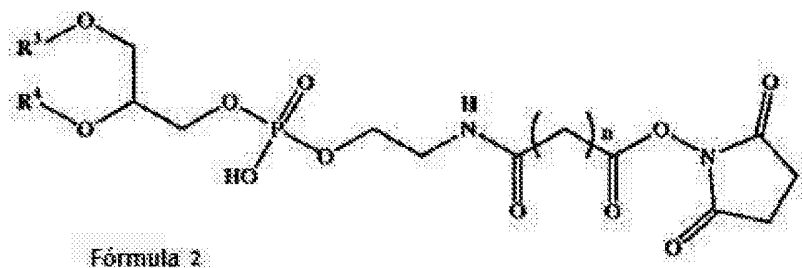
em que:

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



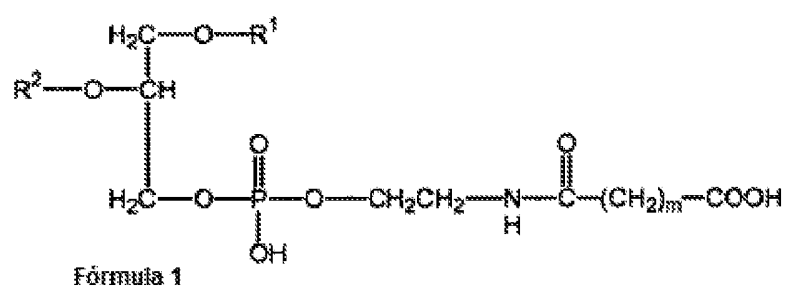
em que:

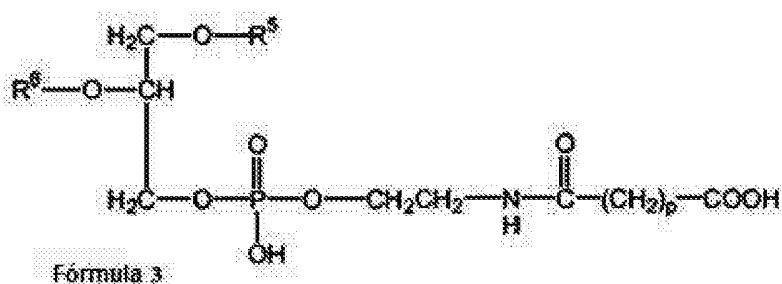
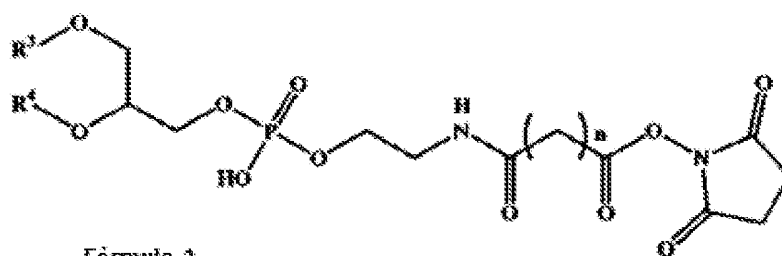
R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

m e n são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que a mistura não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, semi-fosfatidil etanolamina(s) sintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,





em que:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e

m , n , e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10.

Numa forma de realização, a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC; m e n são 3; R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são iguais; e R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo ou estearoilo.

Um décimo quinto aspeto da presente invenção é um método de produção de uma mistura de lípidos do décimo quarto aspeto, que compreende a etapa de:

misturar:

o um ou mais fosfolípidos,

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

Um décimo sexto aspeto da presente invenção é uma mistura de lípidos que compreende uma mistura de:

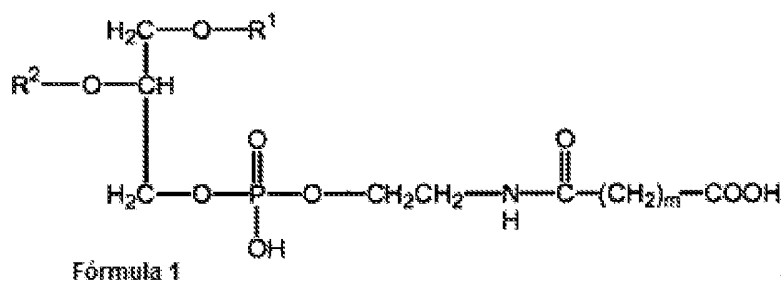
um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina,

uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,

uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e, pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico;

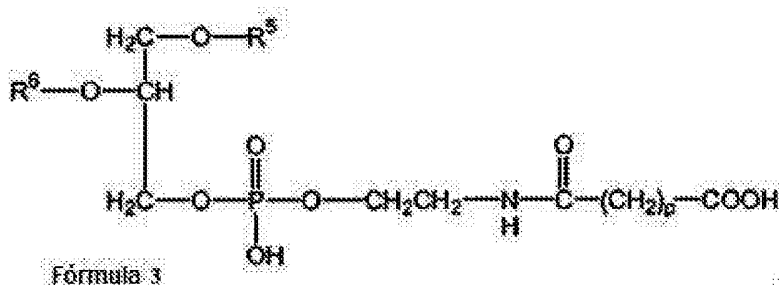
em que o fator de direcionamento está presente numa quantidade de 10 a 50 μ g por mg de lípido; e em que:

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



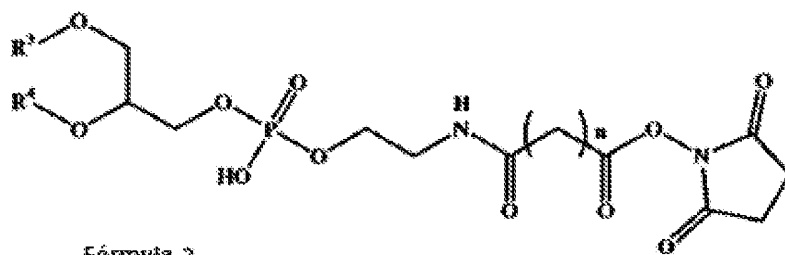
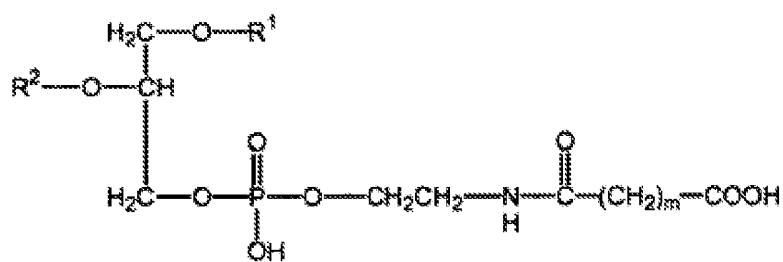
em que:

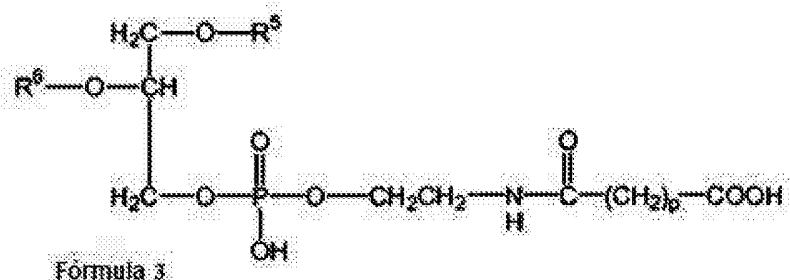
R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que a mistura não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, semi-fosfatidil etanolamina(s) sintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,





em que:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e

m , n , e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10;

e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

Numa forma de realização, a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC; m e p são 3; R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são iguais; R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo ou estearoilo; e o ligando de direcionamento é transferrina.

Um décimo sétimo aspecto da presente invenção é um método de produção de uma mistura de lípidos do décimo quinto aspecto, que compreende a etapa de:

misturar:

o um ou mais fosfolípidos,

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento.

Um décimo oitavo aspecto da presente invenção é uma composição que contém lipossoma que compreende:

um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina,

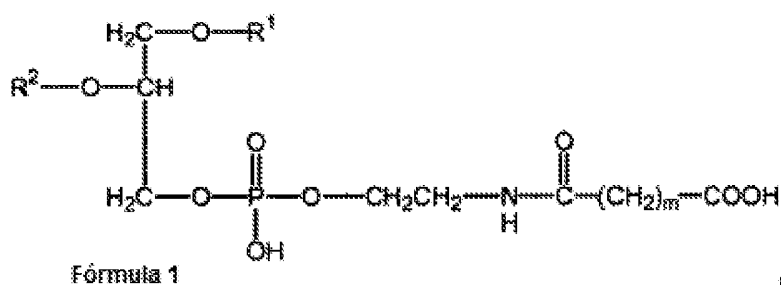
uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,

um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e,

pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol,

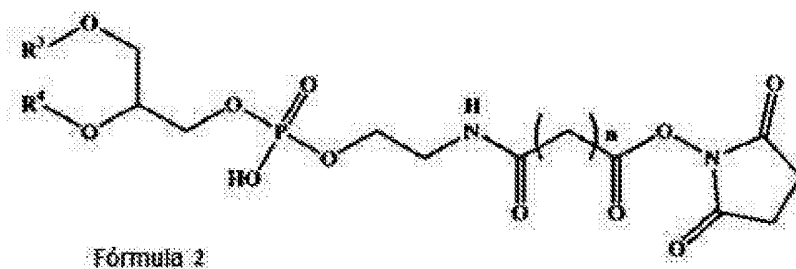
em que:

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



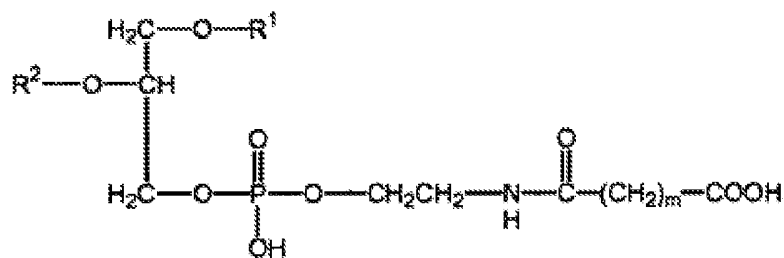
em que:

R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

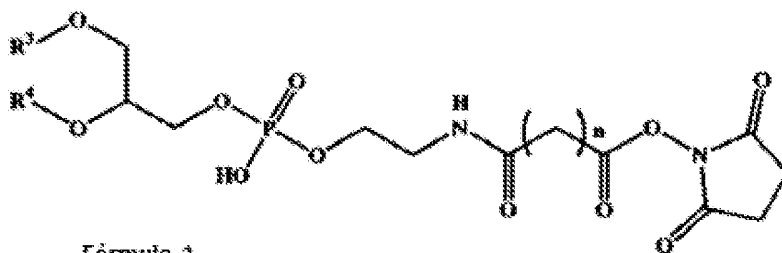
m e n são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que a composição não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

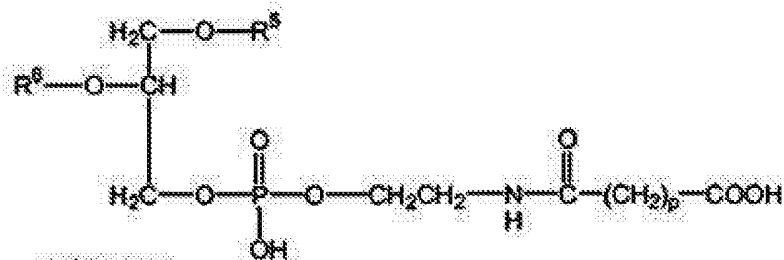
em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, semi-fosfatidil etanolamina(s) sintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,



Fórmula 1



Fórmula 2



Fórmula 3

em que:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e

m , n , e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10.

Numa forma de realização, a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC; m e n são 3; R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são iguais;

e R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo ou estearoilo.

Numa forma de realização, a composição que contém lipossoma do décimo sétimo aspecto compreende adicionalmente um fármaco, em que o fármaco é oxaliplatina.

Um décimo nono aspecto da presente invenção é um método de produção de uma composição que contém lipossoma do décimo sétimo aspecto, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais lípidos fosfolípidos,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,

o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico ou a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e
o pelo menos um lípido adicional,
para formar uma mistura de lípidos; e

(b) adicionar o fármaco à mistura de lípidos formada na etapa (a); e,

(c) formar uma composição que contém lipossoma.

Um vigésimo aspecto da presente invenção é uma composição que contém lipossoma que compreende lipossomas que compreendem:

um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina,

uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,

uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e,
pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol,

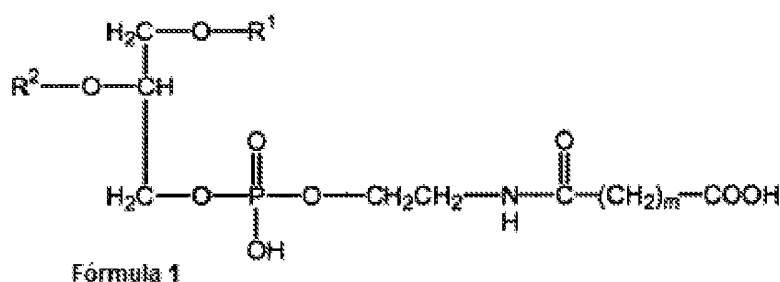
em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma

segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico;

em que o fator de direcionamento está presente numa quantidade de 10 a 50 μg por mg de lípido;

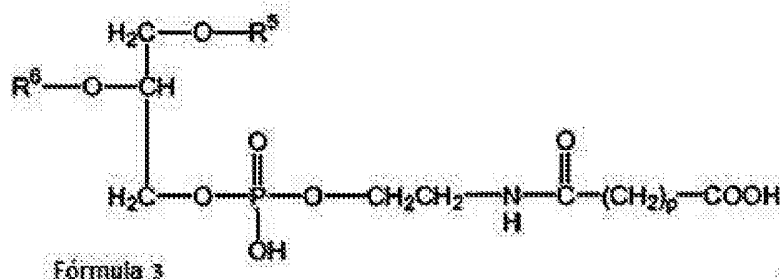
e em que:

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



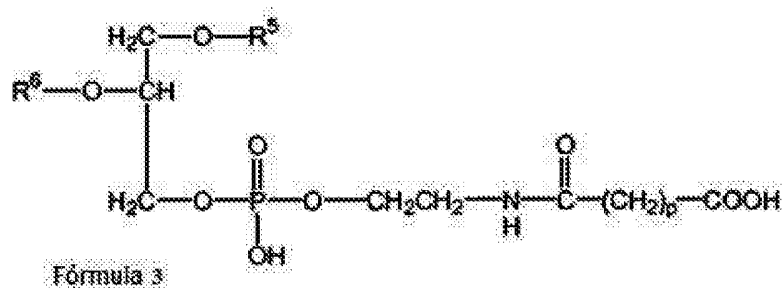
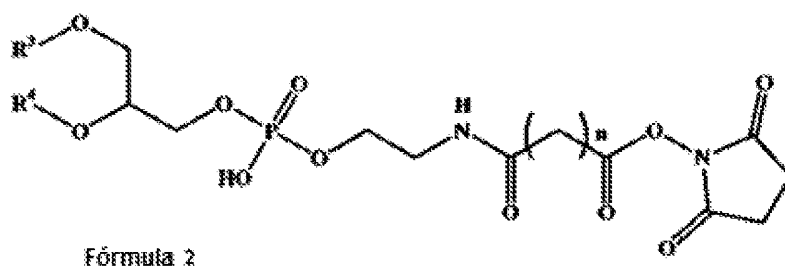
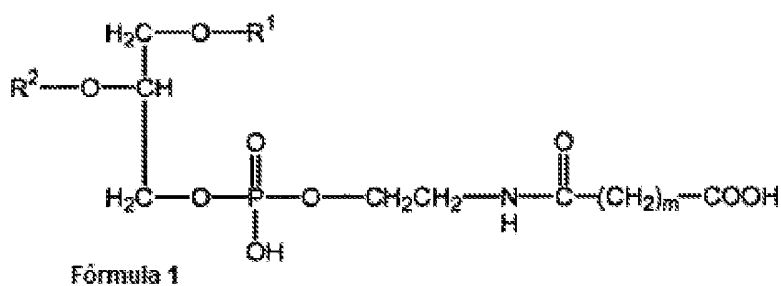
em que:

R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que a composição não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, semi-fosfatidil etanolamina(s) sintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,



em que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e

m , n , e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10;

e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intacto.

Numa forma de realização, a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC; m e p são 3; R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são iguais; R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo; e o ligando de direcionamento é transferrina.

Numa forma de realização, a composição que contém lipossoma do décimo nono aspeto compreende adicionalmente um fármaco, em que o fármaco é oxaliplatina.

Um vigésimo primeiro aspeto da presente invenção é um método de produção de uma composição que contém lipossoma do décimo nono aspeto, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais fosfolípidos,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento e,
o pelo menos um lípido adicional,
para formar uma mistura de lípidos; e

(b) adicionar solvente à mistura formada na etapa (a) para formar uma composição que contém lipossoma.

Um vigésimo segundo aspeto da presente invenção é um método de produção de uma composição que contém lipossoma do décimo nono aspeto, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais lípidos fosfolípidos,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico ou a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e
o pelo menos um lípido adicional,
para formar uma mistura de lípidos; e

(b) adicionar o fármaco à mistura de lípidos formada na

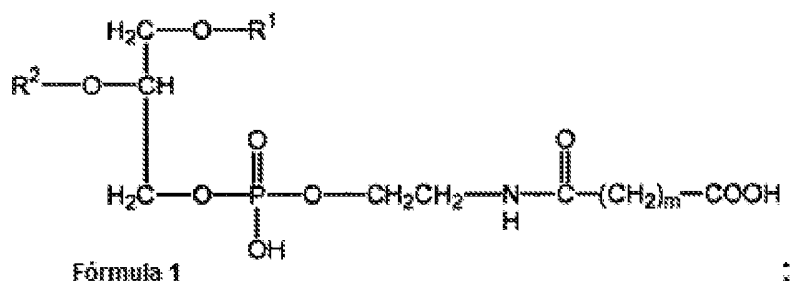
etapa (a); e,

(c) formar uma composição que contém lipossoma.

Descrevem-se no presente documento novas composições que contêm lípidos (incluindo lipossomas (por exemplo, lipossomas direcionados, lipossomas em branco), misturas de lípidos e composições que contêm lipossoma) que podem opcionalmente incorporar um fármaco ou composto marcado, ou que possam ser usadas na preparação de formulações que incorporam um fármaco ou um composto marcado, em que a composição que contém lípido confere o benefício de reduzir os efeitos secundários do fármaco ou composto marcado e/ou também evita a degradação e/ou perda de eficácia do fármaco ou composto marcado. Também se descrevem no presente documento métodos de preparação e utilização das composições que contêm lípido no presente documento descritas. Como foi descrito no presente documento, as composições que contêm lípido podem ser usadas para tratar ou diagnosticar cancro (por exemplo, cancro de mama, cancro gástrico, cancro colorretal, cancro de cólon, cancro do pâncreas, cancro de pulmão de célula não pequena, cancro de pulmão de pequena célula, cancro cerebral, cancro hepático, cancro renal, cancro de próstata, cancro de bexiga, cancro de ovário ou malignidades hematológicas (por exemplo, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo etc.)).

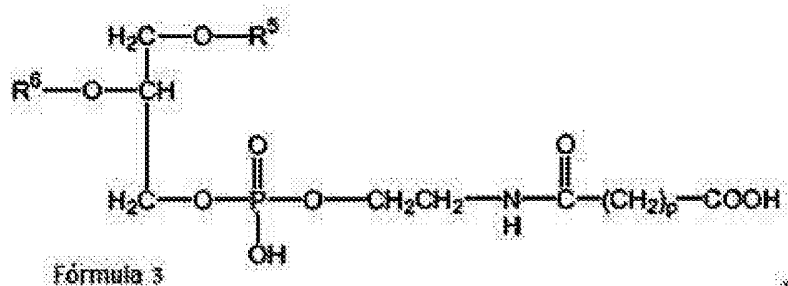
Em certas formas de realização, são proporcionados lipossomas direcionados que compreendem um ou mais fosfolípidos, um ou mais fosfolípidos, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, um fármaco encapsulado ou composto marcado e, opcionalmente, pelo menos um lípido adicional, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil

etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico; e em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

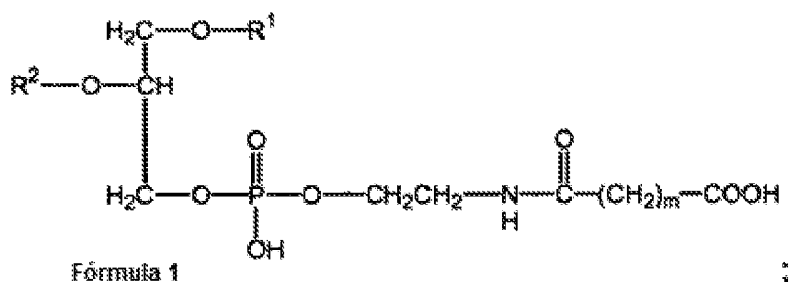
a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10; e, em que o lipossoma não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada ou polietileno glicol, e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

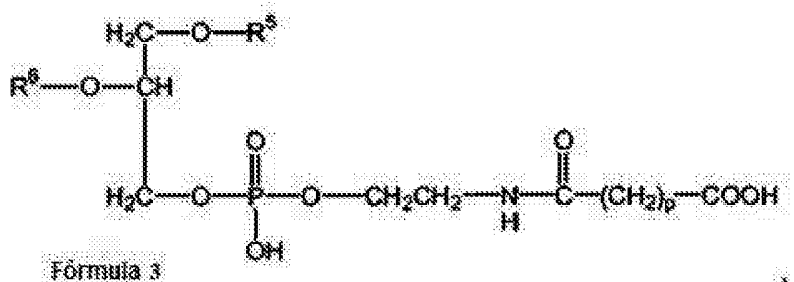
Em outras formas de realização proporcionam-se lipossomas em branco que compreendem um ou mais fosfolípidos, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e, opcionalmente, pelo menos um lípido adicional, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por

fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico; e em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, onde estiver presente, é representada pela Fórmula 3,



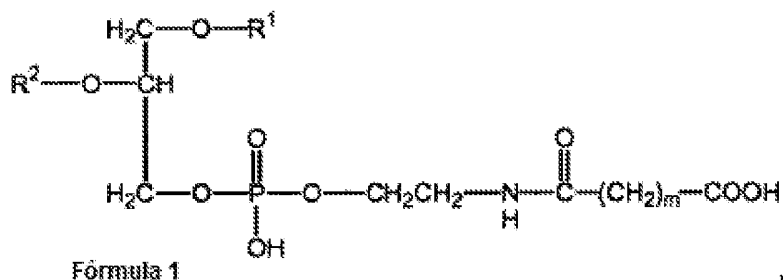
em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10; e, em que o lipossoma não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, fármaco ou composto marcado, e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

Em certas formas de realização dos lipossomas direcionados e lipossomas em branco, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo, e m e p são 3. Em certas formas de realização, o ligando de direcionamento é transferrina. Em

formas de realização particulares, o um ou mais fosfolípidos é DMPC ou DSPC, e o pelo menos um lípido adicional está presente e é colesterol. Em certas formas de realização dos lipossomas direcionados e lipossomas em branco, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo, m e p são 3, o um ou mais fosfolípido é DMPC e o lípido adicional é colesterol.

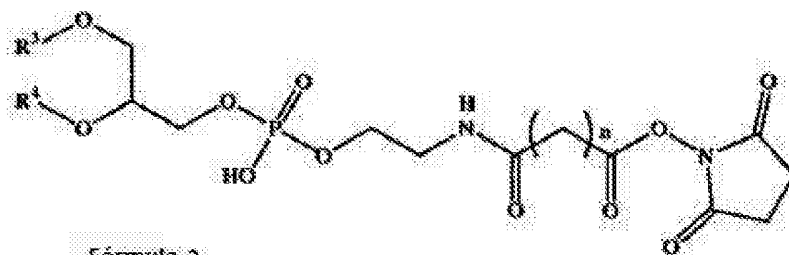
Em certas formas de realização dos lipossomas direcionados e lipossomas em branco, m e p são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4. Em algumas formas de realização, m e p são iguais e são um número inteiro de 2 a 4. Em formas de realização particulares, m e p são iguais e são 3. Em certas formas de realização, R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em algumas formas de realização, R^1 e R^2 são iguais, e R^5 e R^6 são iguais. Em outras formas de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são iguais. Em formas de realização particulares, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo. Em certas formas de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo.

Em formas de realização adicionais proporcionam-se misturas de lípidos que compreendem uma mistura de um ou mais fosfolípidos, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e, opcionalmente, pelo menos um lípido adicional, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



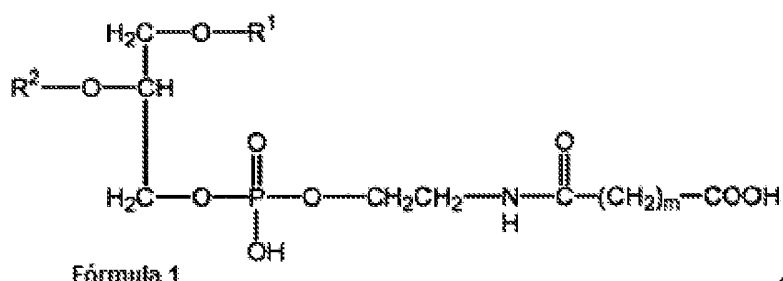
Fórmula 2

em que R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, m e n são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10; e, em que a mistura não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada ou polietileno glicol.

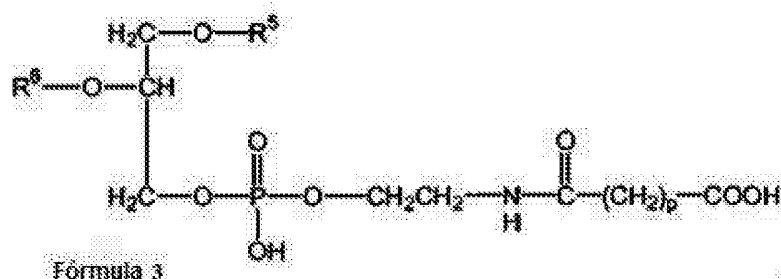
Em certas formas de realização da misturas de lípidos, m e n são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4. Em algumas formas de realização, m e n são iguais e são um número inteiro de 2 a 4. Em formas de realização particulares, m e n são iguais e são 3.

Em certas formas de realização da misturas de lípidos, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em algumas formas de realização, R^1 e R^2 são iguais, e R^3 e R^4 são iguais. Em formas de realização particulares, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são iguais. Em algumas formas de realização, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo ou estearoilo. Em certas formas de realização, m e n são 3, onde o um ou mais fosfolípidos é DMPC ou DSPC e o pelo menos um lípido adicional está presente e é colesterol. Em certas formas de realização da misturas de lípidos, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo, m e n são 3, o um ou mais fosfolípido é DMPC e o lípido adicional é colesterol.

Em formas de realização adicionais proporcionam-se misturas de lípidos que compreendem uma mistura de um ou mais fosfolípidos, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e, opcionalmente, pelo menos um lípido adicional, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico; e em que a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



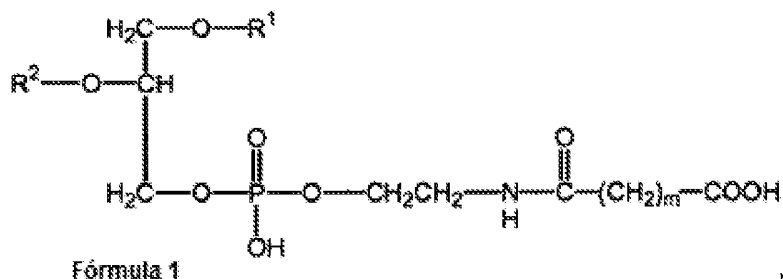
em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10; e, em que a mistura não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada ou polietileno glicol, e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

Em formas de realização particulares da misturas de lípidos, onde uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento estiver presente, m e p são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4. Em certas formas de realização, m e p são iguais e são um número inteiro de 2 a 4. Em algumas formas de realização, m e p são iguais e são 3.

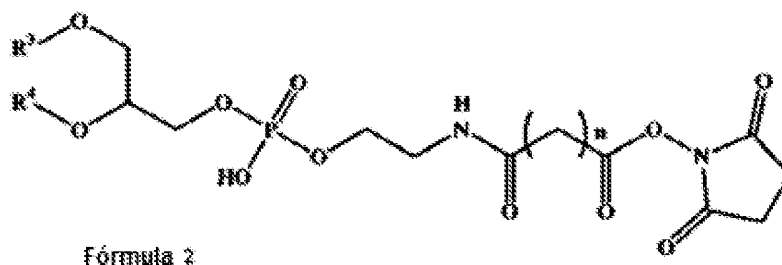
Em formas de realização particulares da misturas de lípidos, onde uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento estiver presente, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em algumas formas de realização, em que R^1 e R^2 são iguais, e R^5 e R^6 são iguais. Em formas de realização adicionais, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são iguais. Em algumas formas de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo. Em certas formas de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo, m e p são 3, o um ou mais fosfolípidos é DMPC ou DSPC, o pelo menos um lípido adicional é colesterol, e o ligando de direcionamento é transferrina. Em certas formas de realização da misturas de lípidos, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo, m e p são 3, o um ou mais fosfolípido é DMPC, o lípido adicional é colesterol e o ligando de direcionamento é transferrina.

Em certas formas de realização proporcionam-se composições que contêm lipossoma que compreendem lipossomas que compreende um ou mais fosfolípidos, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, um

éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e, opcionalmente, pelo menos um lípido adicional, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,

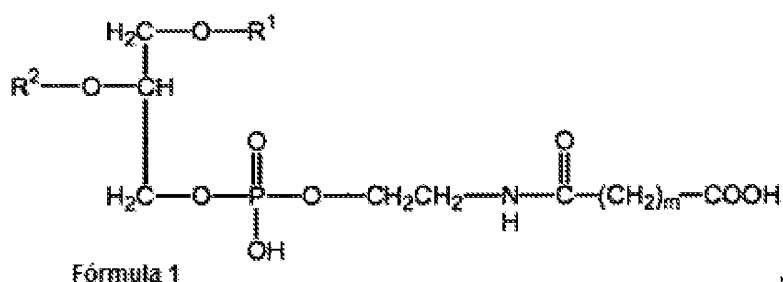


em que R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, m e n são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10; e, em que a composição não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada ou polietileno glicol.

Em algumas formas de realização das composições que contêm lipossoma m e n são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4. Em certas formas de realização, m e n são iguais e são um número inteiro de 2 a 4. Em formas de realização particulares, m e n são iguais são 3.

Em algumas formas de realização das composições que contêm lipossoma, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em formas de realização particulares, R^1 e R^2 são iguais, e R^3 e R^4 são iguais. Em algumas formas de realização, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são iguais. Em certas formas de realização, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo ou estearoilo. Em algumas formas de realização, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo ou estearoilo, e m e n são 3 e o um ou mais fosfolípidos é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC. Em certas formas de realização, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo, m e n são 3, o um ou mais fosfolípido é DMPC e o lípido adicional é colesterol.

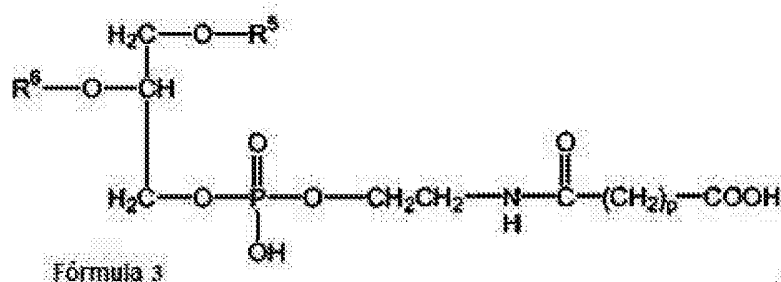
Em formas de realização adicionais das composições que contêm lipossoma proporcionam-se composições que contêm lipossoma que compreendem lipossomas que compreende um ou mais fosfolípidos, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e, opcionalmente, pelo menos um lípido adicional, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-

dicarboxílico; e em que a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10; e, em que a composição não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada ou polietileno glicol, e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

Em certas das composições que contêm lipossoma, onde uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento estiver presente, m e p são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4. Em formas de realização particulares, m e p são iguais e são um número inteiro de 2 a 4. Em algumas formas de realização, m e p são iguais são 3.

Em certas das composições que contêm lipossoma, onde uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento estiver presente, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em formas de realização particulares, R^1 e R^2 são iguais, e R^5 e R^6 são iguais. Em certas formas de realização, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são iguais. Em algumas formas de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou

estearoilo. Em formas de realização particulares, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo, o um ou mais fosfolípidos é DMPC ou DSPC, o pelo menos um lípido adicional colesterol, e o ligando de direcionamento é transferrina. Em certas formas de realização, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo, m e p são 3, o um ou mais fosfolípido é DMPC, o lípido adicional é colesterol e o ligando de direcionamento é transferrina.

Em formas de realização adicionais das composições que contêm lipossoma um fármaco é incluído. Em certas formas de realização, o um ou mais fosfolípido é DMPC ou DSPC, R^1 , R^2 e, onde estiver presente, R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo, m e, onde estiver presente, p são 3, o pelo menos um lípido adicional, onde estiver presente, é colesterol, o fármaco é oxaliplatina, e o ligando de direcionamento, onde estiver presente, é transferrina. Em certas formas de realização, a composição inclui ainda um açúcar numa concentração de desde cerca de 1 até cerca de 20 % por cento de açúcar (v/v). Em certas formas de realização, o um ou mais fosfolípido é DMPC ou DSPC, R^1 , R^2 e, onde estiver presente, R^5 e R^6 são oleoilo, m e, onde estiver presente, p são 3, o pelo menos um lípido adicional, onde estiver presente, é colesterol, o fármaco é oxaliplatina, e o ligando de direcionamento, onde estiver presente, é transferrina.

Em formas de realização adicionais das composições que contêm lipossoma um composto marcado é incluído. Em certas formas de realização, o composto marcado compreende uma fração radioisotópica.

Em certas formas de realização dos lipossomas direcionados, lipossomas em branco, misturas de lípidos e composições que contêm lipossoma, o pelo menos um lípido adicional está presente. Em formas de realização particulares, o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol.

Em formas de realização particulares dos lipossomas

direcionados, lipossomas em branco, misturas de lípidos e composições que contêm lipossoma, o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina ou fosfatidilglicerol. Em formas de realização particulares, o um ou mais fosfolípidos é um neutral fosfolípido. Em algumas formas de realização, o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina. Em formas de realização particulares, a fosfatidil colina inclui uma fração de um ácido gordo saturado. Em certas formas de realização, o um ou mais fosfolípidos é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC. Em particular destas formas de realização, o pelo menos um lípido adicional está presente. E em certas destas, o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol. Em formas de realização particulares, DMPC e colesterol, DSPC e colesterol, POPC e colesterol, ou DPPC e colesterol são incorporados. Em certas formas de realização, DMPC e colesterol.

Em formas de realização particulares dos lipossomas direcionados, lipossomas em branco, misturas de lípidos e composições que contêm lipossoma, onde estiver presente, o ligando de direcionamento é direcionado a uma célula alvo. Em algumas formas de realização, o ligando de direcionamento é direcionado a um recetor de superfície celular de uma célula alvo. Em formas de realização particulares, o ligando de direcionamento é transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico, uma cadeia de açúcar ou um fragmento de um anticorpo monoclonal. Em certas formas de realização, o ligando de direcionamento é transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico ou uma cadeia de açúcar. Em outras formas de realização, o ligando de direcionamento é transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico ou uma cadeia de açúcar. Em algumas formas de realização, o ligando de direcionamento é transferrina. Em formas de realização particulares, a transferrina é numa forma holo, mas não numa forma apo. Em algumas formas de realização, a

transferrina é numa forma holo.

Em certas formas de realização dos lipossomas direcionados e lipossomas em branco, o diâmetro médio do lipossoma é de cerca de 50 nm a cerca de 250 nm. Em outras, o diâmetro médio do lipossoma é de cerca de 90 nm a cerca de 200 nm.

Em formas de realização particulares dos lipossomas direcionados e lipossomas em branco, o potencial zeta do lipossoma é negativo. Em certas formas de realização, o potencial zeta é de cerca de -75 mV a cerca de -90 mV. Em outras, o potencial zeta é de cerca de -80 mV a cerca de -85 mV.

Em certas formas de realização das composições que contêm lipossoma, lipossomas direcionados e lipossomas em branco, as formulações incluem ainda uma solução.

Em formas de realização particulares dos lipossomas direcionados e composições que contêm lipossoma, o fármaco está presente.

Em formas de realização particulares dos lipossomas direcionados e composições que contêm lipossoma, o fármaco é oxaliplatina. Em certas formas de realização onde o fármaco é oxaliplatina, o ligando de direcionamento é transferrina. Em certas formas de realização, o pelo menos um lípido adicional está presente e é colesterol.

Em certas formas de realização, o fármaco é um agente anticâncer. Em formas de realização particulares, o fármaco é um fármaco citotóxico. Em algumas formas de realização, o fármaco é um inibidor de topoisomerase I. Em formas de realização particulares, o inibidor de topoisomerase I é topotecano ou irinotecano. Em outras formas de realização, o fármaco é um alcaloide da vinca. Em formas de realização particulares, o alcaloide da vinca é vincristina, vinblastina, vinleurosina, vinorelbina ou vindesina. Em algumas formas de realização, em que o fármaco é um ácido nucleico. Em certas formas de

realização, o ácido nucleico é um oligonucleótido antissense ou uma ribozima. Em algumas formas de realização, o fármaco é um agente alquilante. Em formas de realização particulares, o fármaco é um taxanos. Em outras formas de realização, o fármaco é um antagonista metabólico. Em certas formas de realização, o fármaco é um antibiótico antitumoral. Em algumas formas de realização, o fármaco é um fármaco de terapêutica hormonal. Em algumas formas de realização, o fármaco é um fármaco de alvo molecular.

Em algumas formas de realização dos lipossomas direcionados e composições que contêm lipossoma, o fármaco é um composto de platina. Em formas de realização particulares, o composto de platina é biplatina, cisplatina, carboplatina, ormaplatina, oxaliplatina, zeniplatina, enloplatina, lobaplatina ou espiroplatina. Em algumas formas de realização, o composto de platina é oxaliplatina.

Em algumas formas de realização onde o fármaco é oxaliplatina, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo, m e p são 3, o ligando de direcionamento é transferrina, o um ou mais fosfolípidos é DMPC ou DSPC, e o pelo menos um lípido adicional está presente e é colesterol. Em certas formas de realização onde o fármaco é oxaliplatina, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo, m e p são 3, o ligando de direcionamento é transferrina, o um ou mais fosfolípidos é DMPC, e o pelo menos um lípido adicional está presente e é colesterol. Em formas de realização particulares, o lipossomas direcionados e composições que contêm lipossoma estão livres de outros componentes de lípidos.

Em algumas formas de realização onde o fármaco é oxaliplatina, a oxaliplatina é dissolvida numa solução aquosa de um açúcar selecionado a partir do grupo que consiste em trehalose, maltose, sucrose, manose, lactose, manitol, glicerol e dextrose. Em certas formas de

realização, o açúcar está numa concentração de desde cerca de 1 até de cerca de 20 % por cento de açúcar (v/v). Em formas de realização particulares, a concentração de oxaliplatina é de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 25 mg/ml dentro do lipossoma. Em outras formas de realização, a concentração de oxaliplatina é de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 10 mg/ml dentro do lipossoma. Em ainda outras formas de realização, a concentração de oxaliplatina é de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 3 mg/ml.

Em formas de realização particulares dos lipossomas direcionados e composições que contêm lipossoma, o composto marcado está presente. Em certas formas de realização, o composto marcado inclui uma fração radioisotópica. Em formas de realização particulares, a fração radioisotópica incorpora ^{125}I .

Em formas de realização particulares dos lipossomas direcionados e as composições que contêm lipossoma, a concentração de ligando de direcionamento incorporado no lipossoma é de cerca de 1,0 mg/ml a cerca de 3,0 mg/ml. Em outras, a concentração de ligando de direcionamento incorporado no lipossoma é de cerca de 1,0 mg/ml a cerca de 2,5 mg/ml.

Em formas de realização particulares dos lipossomas direcionados e as composições que contêm lipossoma onde o fármaco estiver presente e é oxaliplatina, o ligando de direcionamento é transferrina. Em formas de realização particulares, a transferrina é numa forma holo. Em algumas formas de realização, o ferro férrico está numa concentração de desde cerca de 0,4 a cerca de 3,0 $\mu\text{g/ml}$. Em outras formas de realização, o ferro férrico está numa concentração de desde cerca de 0,4 a cerca de 1,5 $\mu\text{g/ml}$.

Em formas de realização particulares dos lipossomas direcionados, lipossomas em branco, misturas de lípidos e composições que contêm lipossoma, o lipossomas, misturas de lípidos ou composição que contêm lipossoma não compreende

um lípido catiónico. Em formas de realização particulares, os lipossomas, misturas de lípidos ou composição que contém lipossoma não compreendem um lípido aniónico. Em algumas formas de realização, os lipossomas, lipossoma de lípido, misturas de lípidos ou composição que contém lipossoma não compreendem um lípido aniónico ou um lípido catiónico.

Em formas de realização particulares dos lipossomas direcionados, lipossomas em branco, misturas de lípidos e composições que contém lipossoma, as formulações incluem ainda uma solução, Em certas formas de realização, as misturas de lípidos estão livres de solução. Em formas de realização particulares, a solução é uma solução aquosa ou uma mistura de uma solução aquosa e um solvente miscível em água.

Em formas de realização particulares dos lipossomas direcionados, lipossomas em branco, misturas de lípidos e composições que contém lipossoma, as formulações incluem ainda sucrose.

Também se descrevem no presente documento formulações farmacêuticas das composições que contém lípidos descritas no presente documento. Formas de realização particulares das composições que contém lipossoma, lipossomas direcionados e lipossomas em branco incluem as composições que contém lipossoma, lipossomas direcionados ou lipossomas em branco como foi descrito no presente documento e um ou mais portadores, excipientes, diluentes, estabilizantes, ou conservantes farmacêuticamente aceitáveis.

Também se descrevem no presente documento kits incluindo as composições que contém lípidos descritas no presente documento. Certas formas de realização das composições que contém lipossoma, lipossomas direcionados e lipossomas em branco incluem as composições que contém lipossoma, lipossomas direcionados ou lipossomas em branco como foi descrito no presente documento, embalagem e instruções para utilização.

Em certas formas de realização dos kits, as composições que contêm lipossoma, lipossomas direcionados ou lipossomas em branco como foi descrito no presente documento está contido num primeiro recipiente e um ou mais portadores, excipientes, diluentes, estabilizantes, ou conservantes farmacêuticamente aceitáveis estão contidos num segundo recipiente.

Em formas de realização particulares, proporcionam-se kits que incorporam as formulações farmacêuticas descrito no presente documento, embalagem e instruções para utilização.

Também se descrevem no presente documento métodos de preparação das composições que contêm lípidos descritas no presente documento.

Em formas de realização particulares, proporcionam-se métodos de preparação de lipossomas direcionados como foi descrito no presente documento, que compreende as etapas de:

- a) misturar o um ou mais fosfolípidos, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e, opcionalmente, o pelo menos um lípido adicional, para formar uma mistura de lípidos;
- b) adicionar um fármaco ou composto marcado à mistura de lípidos formada na etapa (a);
- c) formar um lipossoma.

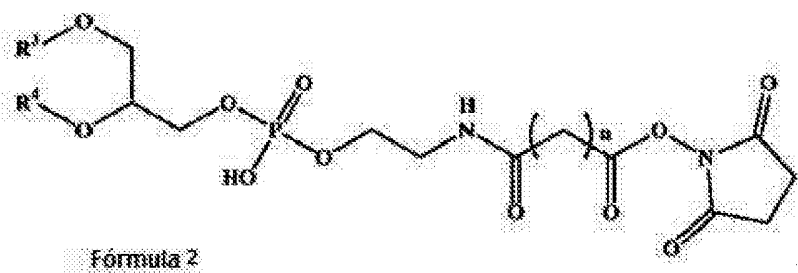
Numa forma de realização adicional do método, proporciona-se uma etapa (d), purificar o lipossoma da etapa (c). Em formas de realização particulares, o fármaco na etapa (b) está em solução aquosa antes da mistura. Em certas formas de realização, a etapa (c) compreende sonicação ou agitação. Em algumas formas de realização, a etapa (c) compreende extrusão.

Em outras formas de realização, proporcionam-se

métodos de preparação de lipossomas direcionados como foi descrito no presente documento, que compreende as etapas de

a) misturar o um ou mais fosfolípidos, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e, opcionalmente, o pelo menos um lípido adicional, para formar uma mistura de lípidos

em que o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



em que R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, n é, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

b) adicionar fármaco ou composto marcado à mistura de lípidos formada na etapa (a);

c) formar um lipossoma; e,

d) ligar um ligando de direcionamento ao éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

Em certas formas de realização do método descrito acima, o método também inclui uma etapa (e), purificar o lipossoma da etapa (d).

Em formas de realização particulares, o fármaco na etapa (b) está em solução aquosa antes da mistura. Em algumas formas de realização, a etapa (c) compreende

sonicação ou agitação. Em certas formas de realização, a etapa (c) compreende extrusão. Em formas de realização particulares, a etapa (c) compreende agitação.

Em certas formas de realização, proporcionam-se métodos de preparação de lipossomas em branco como foi descrito no presente documento, que compreende as etapas de

a) misturar o um ou mais fosfolípidos, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e, opcionalmente, o pelo menos um lípido adicional, para formar uma mistura de lípidos; e

b) formar um lipossoma.

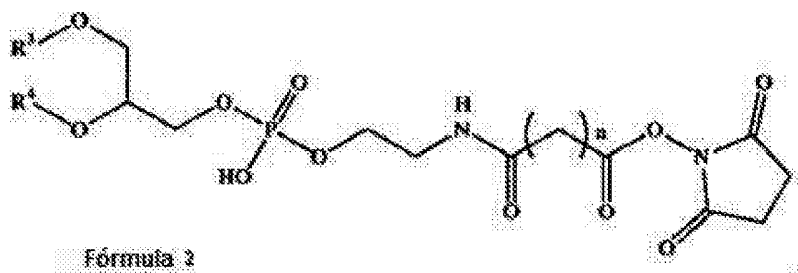
Em certas formas de realização dos métodos de preparação dos lipossomas em branco, o método compreende adicionalmente uma etapa (c), purificar o lipossoma da etapa (b).

Em formas de realização particulares, a etapa (b) compreende sonicação ou agitação. Em algumas formas de realização, a etapa (b) compreende extrusão.

Em outras formas de realização, proporcionam-se métodos de preparação de lipossomas em branco como foi descrito no presente documento, que compreende as etapas de

a) misturar o um ou mais fosfolípidos, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e, opcionalmente, o pelo menos um lípido adicional, para formar uma mistura de lípidos,

em que o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



em que R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, n é, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

b) formar um lipossoma; e,

c) ligar um ligando de direcionamento ao éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico para formar uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento.

Em certos dos métodos de preparação dos lipossomas em branco, os métodos incluem ainda uma etapa (d), purificar o lipossoma da etapa (c).

Em formas de realização particulares, a etapa (b) compreende sonicação ou agitação. Em algumas formas de realização, a etapa (b) compreende extrusão.

Em outras formas de realização, proporcionam-se métodos de preparação das composições que contêm lípidos como foi descrito no presente documento, que compreende a etapa de misturar o um ou mais fosfolípidos, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

Em formas de realização adicionais, proporcionam-se métodos de preparação das composições que contêm lípidos onde o pelo menos um lípido adicional está presente, como foi descrito no presente documento, que compreende a etapa de misturar o um ou mais fosfolípidos, o pelo menos um lípido adicional, a fosfatidil etanolamina derivatizada de

ácido N-(ω)-dicarboxílico e o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

Em outras formas de realização, proporcionam-se métodos de preparação das composições que contêm lípidos como foi descrito no presente documento, que compreende a etapa de misturar o um ou mais fosfolípidos, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento.

Em formas de realização adicionais, proporcionam-se métodos de preparação das composições que contêm lípidos, onde o pelo menos um lípido adicional está presente, como foi descrito no presente documento, que compreende a etapa de misturar o um ou mais fosfolípidos, o pelo menos um lípido adicional, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento.

Também se proporcionam métodos de preparação das composições que contêm lipossoma descritas no presente documento, que compreende as etapas de

- a) misturar o um ou mais lípidos fosfolípidos, e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e, onde estiver presente, o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, ou fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e, opcionalmente, onde estiver presente, pelo menos um lípido adicional, para formar uma mistura de lípidos; e
- b) adicionar um fármaco à mistura de lípidos formada na etapa (a); e,
- c) formar um lipossoma.

Em certas formas de realização dos métodos de preparação das várias composições que contêm lípidos (lipossomas direcionados, lipossomas em branco, composições que contêm lipossoma), onde um fármaco está presente, o fármaco é numa solução aquosa. Em certas formas de realização, a etapa a) é levada a cabo na presença de solvente orgânico. Em algumas formas de realização, a solução aquosa compreende adicionalmente um açúcar. Em certas formas de realização, a solução aquosa pode também incluir um solvente orgânico miscível em água.

Em outras formas de realização, proporcionam-se métodos de preparação das composições que contêm lipossoma, que compreende as etapas de

- a) misturar o um ou mais lípidos fosfolípidos, e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e, onde estiver presente, o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, ou a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e, opcionalmente, onde estiver presente, o pelo menos um lípido adicional, para formar uma mistura de lípidos; e
- b) adicionar um composto marcado à mistura de lípidos formada na etapa (a).
- c) formar um lipossoma

Em certas formas de realização dos métodos de preparação das várias composições que contêm lípidos (lipossomas direcionados, lipossomas em branco, composições que contêm lipossoma), onde um composto marcado estiver presente, o composto marcado é numa solução aquosa. Em certas formas de realização, a etapa a) é levada a cabo na presença de solvente orgânico. Em certas formas de realização a solução aquosa pode também incluir um solvente orgânico miscível em água.

Em certas formas de realização também se proporcionam métodos de preparação das composições que contêm lipossoma como foi descrito no presente documento, em que a composição que contêm lipossoma inclui uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, que compreende as etapas de

- a) misturar o um ou mais fosfolípidos, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento e, opcionalmente, pelo menos um lípido adicional, para formar uma mistura de lípidos; e
- b) adicionar solvente à mistura formada na etapa (a) para formar uma composição que contêm lipossoma.

Em formas de realização particulares, a etapa de mistura (a) é levada a cabo na presença de um solvente orgânico. Em formas de realização particulares, o solvente na etapa (b) é uma solução aquosa ou uma mistura de solução aquosa e um solvente miscível em água.

Em certas formas de realização, a etapa (b) compreende sonicação ou agitação. Em algumas formas de realização, a etapa (b) compreende extrusão.

Em formas de realização particulares dos métodos de preparação das composições que contêm lípidos, na etapa (a) o pelo menos um lípido adicional está presente.

Em algumas formas de realização dos métodos de preparação das composições que contêm lípidos, na etapa (a) o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico está presente.

Em certas formas de realização dos métodos de preparação das composições que contêm lípidos na etapa (a) a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento está presente.

Também se descrevem no presente documento métodos de tratamento ou diagnóstico usando as composições que contêm lípidos descritas no presente documento.

Em formas de realização particulares, proporcionam-se métodos para tratar cancro que compreende, a) administrar um lipossoma direcionado como foi descrito no presente documento a um indivíduo em necessidade do mesmo numa quantidade eficaz para tratar o cancro, em que o lipossoma direcionado compreende um fármaco, e o fármaco é um agente anticancro.

Em certas formas de realização do método de tratamento ou diagnóstico, o indivíduo é um mamífero. Em formas de realização particulares, o indivíduo é um ser humano.

Em certas formas de realização dos métodos de tratamento, o cancro é de mama, gástrico, de cólon, cancro colorretal, cancro do pâncreas, cancro de pulmão de não pequena célula, cancro de pulmão de pequena célula, cancro cerebral, cancro hepático, cancro renal, cancro de próstata, cancro de bexiga, cancro de ovário, ou malignidades hematológicas.

Em algumas formas de realização dos métodos de tratamento, a etapa (a) é levada a cabo antes de, concomitantemente com ou após terapêutica de cancro de modalidade combinada. Em formas de realização particulares, a terapêutica de cancro de modalidade combinada compreende quimioterapia, radiação terapêutica, ou cirurgia.

Em formas de realização particulares dos métodos de tratamento, a etapa (a) é levada a cabo antes de, concomitantemente com ou após terapêutica de cancro adjuntiva. Em formas de realização particulares, a terapêutica de cancro adjuntiva compreende a administração de um ou mais agentes para reduzir queda do cabelo, vômitos, supressão imunológica, náuseas, diarreia, erupção cutânea, distúrbios sensoriais, anemia, fadiga, estomatite ou síndrome mão-pé. Em algumas formas de realização, a

etapa (a) é levada a cabo antes de, concomitantemente com ou após administração de um ou mais agentes anticancro adicionais. Em certas formas de realização, o um ou mais agentes anticancro adicionais compreendem 5-fluorouracil, leucovorin, capecitabina, UFT/LV (tegafur-uracil e leucovorin), irinotecano, um anticorpo anti-EGFR, um anticorpo anti-VEGF, um inibidor de tirosina quinase, ou combinações dos mesmos.

Em algumas formas de realização dos métodos de tratamento, o lipossoma direcionado é administrado via administração parentérica. Em formas de realização particulares, a administração parentérica é via injeção ou infusão intravenosa.

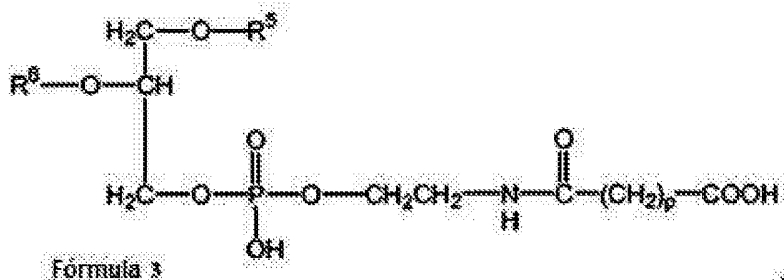
Também se proporcionam métodos de diagnóstico que compreende as etapas de

- a) administrar um lipossoma direcionado como foi descrito no presente documento a um indivíduo em necessidade do mesmo numa quantidade eficaz para deteção, em que o lipossoma direcionado compreende um composto marcado; e,
- b) detetar o composto marcado.

Em formas de realização adicionais dos métodos de diagnóstico, os métodos compreendem ainda uma etapa (c), comparar um nível de composto marcado detetado com a quantidade de composto marcado detetado num ponto anterior no tempo.

Em formas de realização adicionais dos métodos de diagnóstico, a etapa (b) compreende deteção via um contador gama.

Também se descrevem no presente documento fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificadas por transferrina, onde a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



em que R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo e p é um número inteiro de 1 a 10, e transferrina é linked ligado à fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

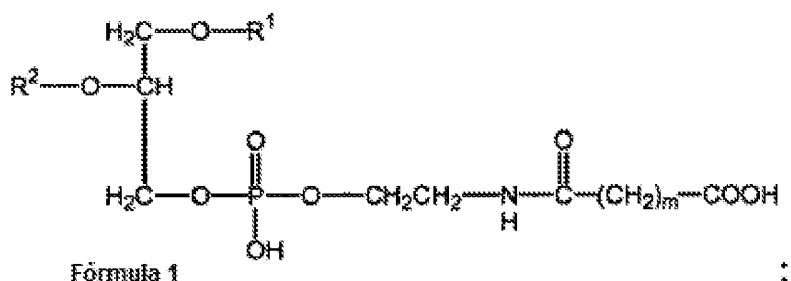
Em certas formas de realização da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por transferrina, p é um número inteiro de 2 a 4. Em formas de realização particulares, p é 3.

Em algumas formas de realização da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por transferrina, R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em formas de realização particulares, R^5 e R^6 são iguais. Em algumas formas de realização, R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo. Em certas formas de realização, R^5 e R^6 são oleoilo e p é 3.

Também se descrevem no presente documento formulações farmacêuticas que compreende a fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificadas por transferrina como foi descrito no presente documento e um ou mais portadores, excipientes, diluentes, estabilizantes, ou conservantes farmacêuticamente aceitáveis.

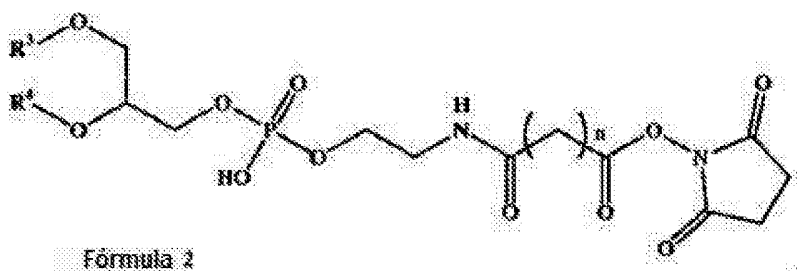
Em certas formas de realização, proporcionam-se misturas de lípidos que compreendem uma mistura de pelo menos dois lípidos neutros diferentes, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, em que a

fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

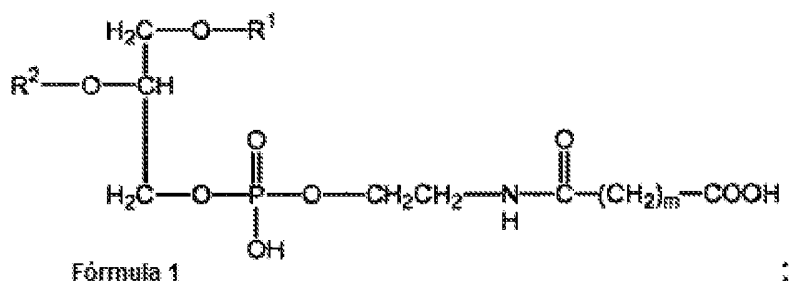
o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



em que R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, m e n são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10; e, em que a mistura não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada ou polietileno glicol.

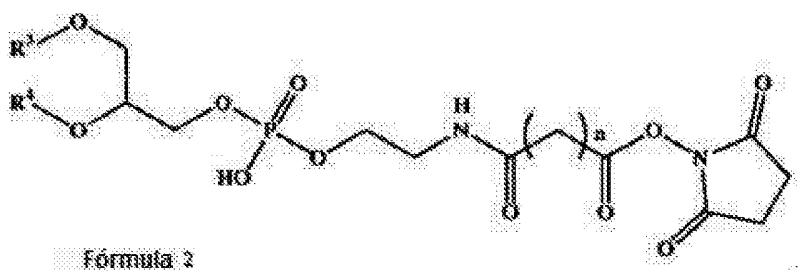
Em certas formas de realização, proporcionam-se composições que contêm lipossoma que compreendem pelo menos dois lípidos neutros diferentes, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e um fármaco encapsulado ou composto marcado, em que a fosfatidil etanolamina

derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



em que R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo; m e n são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10; e, em que a mistura não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada ou polietileno glicol.

Em formas de realização particulares das composições que contêm lipossoma e a misturas de lípidos, m e n são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4. Em certas formas de realização, m e n são iguais e são um número inteiro de 2 a 4. Em outras formas de realização, m e n são iguais e são 3.

Em algumas formas de realização das composições que

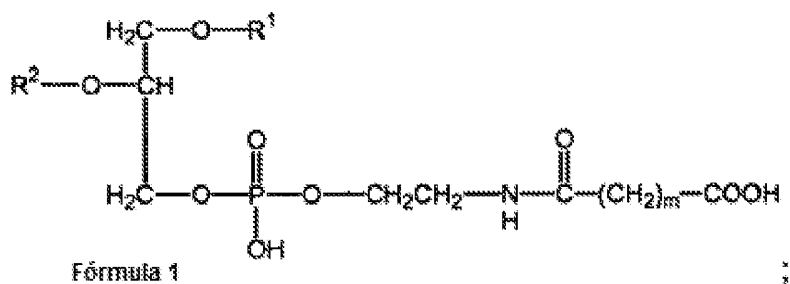
contêm lipossoma e a misturas de lípidos, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em algumas formas de realização, R^1 e R^2 são iguais, e R^3 e R^4 são iguais. Em formas de realização particulares R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são iguais. Em algumas formas de realização, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo.

Em formas de realização particulares das composições que contêm lipossoma e a misturas de lípidos, a razão molar de lípidos neutros:fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico:éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é de cerca de 95:4:1.

Em algumas formas de realização das composições que contêm lipossoma e a misturas de lípidos, onde os lípidos neutros são DMPC e colesterol, a razão molar de DMPC:colesterol: (fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico +éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico) é 50:45:5. Em certas destas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NG-DOPE e o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NHS-NG-DOPE.

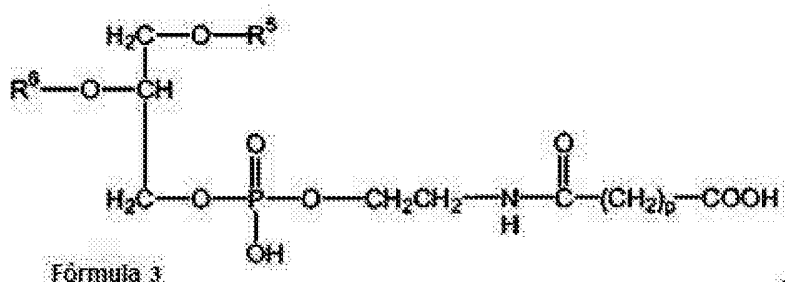
Em certas formas de realização, proporcionam-se lipossomas direcionados que compreende pelo menos dois lípidos neutros diferentes, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento e um fármaco encapsulado ou composto marcado, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico; e, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-

(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

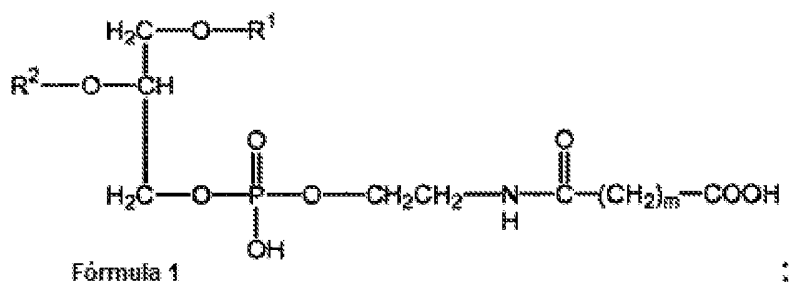
a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10; e, em que o lipossoma não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada ou polietileno glicol, e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

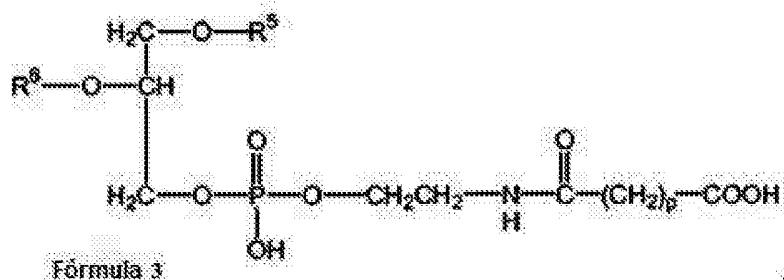
Em formas de realização particulares, proporcionam-se lipossoma direcionado que compreende um neutral fosfatidil colina, colesterol ou um derivado de colesterol, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, um fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por transferrina e oxaliplatina encapsulada, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por

transferrina compreende transferrina ligada por uma ligação amida de ácido carboxílico a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico; e em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2, e a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10; e, em que o lipossoma não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada ou polietileno glicol. Em certas formas de realização, o lipossoma direcionado é substancialmente livre de EDC e/ou DCC.

Em certas formas de realização dos lipossomas

direcionados, m e p são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4. Em algumas formas de realização, m e p são iguais e são um número inteiro de 2 a 4. Em formas de realização particulares, m e p são iguais são 3.

Em algumas formas de realização dos lipossomas direcionados, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em certas formas de realização, R^1 e R^2 são iguais, e R^5 e R^6 são iguais. Em formas de realização particulares, R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são iguais. Em algumas formas de realização, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo ou estearoilo. Em certas formas de realização, R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo.

Em certa forma de realização dos lipossomas direcionados, o ligando de direcionamento é direcionado a uma célula alvo. Em formas de realização particulares, o ligando de direcionamento é direcionado a um recetor de superfície celular de uma célula alvo. Em algumas formas de realização, o ligando de direcionamento é transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico, uma cadeia de açúcar ou um fragmento de um anticorpo monoclonal. Em certas formas de realização, o ligando de direcionamento é transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico ou uma cadeia de açúcar. Em formas de realização particulares, o ligando de direcionamento é transferrina. Em some destas formas de realização, a transferrina é numa forma holo, mas não numa forma apo. Em outras formas de realização, a transferrina é numa forma apo.

Em certas formas de realização das misturas de lípidos, composições que contêm lipossoma e os lipossomas direcionados, as formulações não compreendem um lípido aniónico. Em algumas formas de realização, as formulações não compreendem um lípido catiónico. Em algumas formas de realização, as formulações não compreendem um lípido catiónico ou um lípido aniónico. Em certas formas de realização, a formulação não compreendem um fosfatidilo

glicerol ou derivado do mesmo. Em formas de realização particulares, as formulações não compreendem fosfatidilcolina de ovo.

Em algumas formas de realização das misturas de lípidos, composições que contêm lipossoma e os lipossomas direcionados, os pelo menos dois lípidos neutros diferentes são um ou mais fosfolípidos e colesterol ou um colesterol derivados. Em algumas formas de realização, pelo menos um dos pelo menos dois lípidos neutros diferentes é um fosfolípido. Em certas formas de realização das misturas de lípidos, composições que contêm lipossoma e os lipossomas direcionados, os pelo menos dois lípidos neutros diferentes são um fosfatidil colina e colesterol. Em formas de realização particulares, um dos pelo menos dois lípidos neutros diferentes é DMPC, DSPC ou DPPC. Em algumas das formas de realização, um dos pelo menos dois lípidos neutros diferentes é colesterol ou um derivado de colesterol. Em formas de realização particulares, os pelo menos dois lípidos neutros diferentes são DMPC e colesterol, DSPC e colesterol, ou DPPC e colesterol. Em formas de realização particulares, os pelo menos dois lípidos neutros diferentes são DMPC e colesterol.

Em algumas formas de realização dos lipossomas direcionados o diâmetro médio do lipossoma é de cerca de 50 nm a cerca de 250 nm. Em certas formas de realização, o diâmetro médio do lipossoma é de cerca de 90 nm a cerca de 200 nm. Em formas de realização particulares, o diâmetro médio do lipossoma é de cerca de 100 nm a cerca de 140 nm.

Em certas formas de realização dos lipossomas direcionados o potencial zeta do lipossoma é negativo. Em formas de realização particulares, o potencial zeta é de cerca de -75 mV a cerca de -90 mV. Em algumas formas de realização, o potencial zeta é de cerca de -80 mV a cerca de -85 mV.

Em algumas formas de realização das misturas de

lípidos, composições que contêm lipossoma e os lipossomas direcionados, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NG-DOPE (onde NG-DOPE é equivalente a R¹ e R² sendo oleoilo e m sendo 3) e, onde estiver presente, o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NHS-NG-DOPE (onde NHS-NG-DOPE é equivalente a R³ e R⁴ sendo oleoilo e n sendo 3) ou, onde estiver presente a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento é TF-NG-DOPE (onde TF-NG-DOPE é equivalente a R⁵ e R⁶ sendo oleoilo e p sendo 3).

Em algumas formas de realização das composições que contêm lipossoma e os lipossomas direcionados, as formulações incluem ainda uma solução.

Em certas formas de realização dos lipossomas direcionados, a razão molar de lípidos neutros:fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico:fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento é de cerca de 95:4:1.

Em certas formas de realização dos lipossomas direcionados, a razão molar de DMPC: colesterol: (fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico + fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento) é 50:45:5.

Em formas de realização particulares das composições que contêm lipossoma e os lipossomas direcionados, um composto marcado está presente. Em certas formas de realização, o composto marcado inclui uma fração radioisotópica. Em formas de realização particulares, o composto marcado inclui ¹²⁵I.

Em algumas formas de realização das composições que contêm lipossoma e os lipossomas direcionados, um fármaco

está presente. Em formas de realização particulares, o fármaco é um agente anticâncer. Em algumas formas de realização, o fármaco é um fármaco citotóxico. Em certas formas de realização, o fármaco é um inibidor de topoisomerase I. Em formas de realização particulares, o inibidor de topoisomerase I é topotecano ou irinotecano. Em outras formas de realização, o fármaco é um alcaloide da vinca. Em algumas formas de realização, o alcaloide da vinca é vincristina, vinblastina, vinleurosina, vinorelbina ou vindesina. Em outras formas de realização, o fármaco é um ácido nucleico. Em some destas formas de realização, o ácido nucleico é um oligonucleótido antissense ou uma ribozima. Em formas de realização particulares, o fármaco é um composto de platina. Em certas formas de realização, o composto de platina é biplatina, cisplatina, carboplatina, ormaplatina, oxaliplatina, zeniplatina, enloplatina, lobaplatina ou espiroplatina. Em formas de realização particulares, o composto de platina é oxaliplatina. Em algumas formas de realização o fármaco é um agente alquilante. Em formas de realização particulares, o fármaco é um taxano. Em outras formas de realização, o fármaco é um antagonista metabólico. Em certas formas de realização, o fármaco é um antibiótico antitumoral. Em algumas formas de realização, o fármaco é um fármaco de terapêutica hormonal. Em formas de realização particulares, o fármaco é um fármaco de alvo molecular.

Em formas de realização particulares, onde oxaliplatina está presente, a oxaliplatina é dissolvida numa solução aquosa de um açúcar selecionado a partir do grupo que consiste em trehalose, maltose, sucrose, lactose, manose, manitol, glicerol e dextrose. Em certas formas de realização, o açúcar está numa concentração de desde cerca de 1 até de cerca de 20 % por cento de açúcar (v/v). Em algumas formas de realização, a concentração de oxaliplatina é de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 25 mg/ml

dentro do lipossoma. Em outras formas de realização, a concentração de oxaliplatina é de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 10 mg/ml dentro do lipossoma. Em ainda outras formas de realização, a concentração de oxaliplatina é de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 3 mg/ml.

Em formas de realização particulares onde fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento está presente, a concentração de ligando de direcionamento incorporado no lipossoma é de cerca de 1,0 mg/ml a cerca de 3,0 mg/ml. Em certas formas de realização, a concentração de ligando de direcionamento incorporado no lipossoma é de cerca de 1,0 mg/ml a cerca de 2,5 mg/ml.

Em certas formas de realização, onde uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento estiver presente, o ligando de direcionamento é transferrina. Em algumas formas de realização, a transferrina é numa forma holo, mas não numa forma apo. Em certas formas de realização, a transferrina é numa forma holo. Em algumas formas de realização, o ferro férrico está numa concentração de desde cerca de 0,4 a cerca de 3,0 μ g/ml. Em outras formas de realização, o ferro férrico está numa concentração de desde cerca de 0,4 a cerca de 1,5 μ g/ml.

Em algumas formas de realização das misturas de lípidos, composições que contêm lipossoma e os lipossomas direcionados, formulações estão livres de componentes de lípidos outros que não os dois lípidos neutros diferentes, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento. Em formas de realização particulares, as formulações estão livres de componentes de lípidos outros que não os fosfatidil colina, colesterol ou um derivado de colesterol, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido

N-(ω)-dicarboxílico e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por transferrina.

Também se descrevem no presente documento formulações farmacêuticas que compreendem um lipossoma direcionado ou composição que contém lipossoma como foi descrito no presente documento e um ou mais portadores, excipientes, diluentes, estabilizantes, ou conservantes farmaceuticamente aceitáveis.

Também se descrevem no presente documento kits que contêm um ou mais das misturas de lípidos, composições que contêm lipossoma ou lipossomas direcionados descrito no presente documento, embalagem e instruções para utilização.

Em certas formas de realização, o kit inclui lipossomas direcionados. Em formas de realização particulares, o lipossoma direcionado está contido num primeiro recipiente e um ou mais portadores, excipientes, diluentes, estabilizantes, ou conservantes farmaceuticamente aceitáveis estão contidos num segundo recipiente.

A não ser que de outro modo indicado, as composições que contêm lípidos como foram descritas no presente documento destinadas para utilização nos métodos de tratamento e diagnóstico como foi descrito no presente documento e podem ser incorporadas nas formulações farmacêuticas e kits descritos no presente documento. As composições que contêm lípidos descritas no presente documento (incluindo misturas de lípidos, composições que contêm lipossoma), os lipossomas (incluindo lipossomas direcionados, lipossomas em branco, etc.)) podem, a não ser que de outro modo indicado, ser feitas pelos métodos de produção como foi descrito no presente documento.

Também se descrevem no presente documento métodos para produzir as composições que contêm lípidos descritas no presente documento, que compreendem a etapa de misturar os pelo menos dois lípidos neutros diferentes, a fosfatidil

etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

Em certas formas de realização, proporcionam-se métodos para produzir as composições que contêm lipossoma descritas no presente documento, que compreendem as etapas de

- a) misturar os pelo menos dois lípidos neutros diferentes, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico para formar uma mistura de lípidos;
- b) adicionar um fármaco à mistura de lípidos formada na etapa (a); e,
- c) formar um lipossoma.

Em certas formas de realização, a etapa de mistura (a) é levada a cabo na presença de um solvente orgânico.

Em algumas formas de realização, o fármaco na etapa (b) está em solução aquosa antes da mistura.

Em certas formas de realização, a etapa (c) compreende sonicação ou agitação. Em formas de realização particulares, a etapa (c) compreende extrusão.

Em formas de realização adicionais, proporcionam-se métodos de preparação de um lipossoma direcionado como foi descrito no presente documento, que compreende as etapas de

- a) misturar os pelo menos dois lípidos neutros diferentes, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico para formar uma mistura de lípidos;
- b) adicionar fármaco ou composto marcado à mistura de lípidos formada na etapa (a);
- c) formar um lipossoma; e,
- d) ligar um ligando de direcionamento ao éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina

derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

Em certas formas de realização do método acima, o método compreende ainda uma etapa (e), purificar o lipossoma da etapa (d). Em formas de realização particulares, o fármaco na etapa (b) está em solução aquosa antes da mistura. Em certas formas de realização etapa (c) compreende sonicação ou agitação. Em algumas formas de realização, a etapa (c) compreende extrusão.

Também se proporcionam adicional métodos de preparação de um lipossoma direcionado que compreende as etapas de

- a) misturar a fosfatidil colina, colesterol ou um derivado de colesterol, e fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico para formar uma mistura de lípidos;
- b) adicionar oxaliplatina à mistura de lípidos formada na etapa (a);
- c) formar um lipossoma; e,
- d) funcionalizar uma porção da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico para formar um éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico; e
- e) ligar a transferrina ao éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

Em certas formas de realização, o método compreende adicionalmente uma etapa (f) de purificar o lipossoma da etapa (e).

Em formas de realização particulares do método o fármaco na etapa (b) está em solução aquosa antes da mistura.

Em algumas formas de realização do método etapa (c) compreende sonicação ou agitação.

Também se descreve no presente documento a utilização das composições que contêm lípidos (incluindo lipossomas direcionados) e formulações das mesmas como foi descrito no

presente documento no fabrico de um medicamento. Particularmente, o fabrico de um medicamento para utilização no tratamento ou diagnóstico de condições como foi descrito no presente documento. Além disso, as formulações farmacêuticas das mesmas, descritas de várias maneiras no presente documento, também se destinam à utilização no fabrico de um medicamento para utilização em tratamento e diagnóstico das condições e, de acordo com os métodos, descritos no presente documento, a não ser que de outro modo indicado.

Também se descrevem no presente documento métodos para tratar o cancro que compreende a etapa de a) administrar um lipossoma direcionado como foi descrito no presente documento a um indivíduo em necessidade do mesmo numa quantidade eficaz para tratar o cancro, em que o fármaco é um agente anticancro.

Em algumas formas de realização, o indivíduo é um mamífero. Em formas de realização particulares, o indivíduo é um ser humano.

Em certas formas de realização, o cancro é de mama, gástrico, de cólon, cancro colorretal, cancro do pâncreas, cancro de pulmão de não pequena célula, cancro de pulmão de pequena célula, cancro cerebral, cancro hepático, cancro renal, cancro de próstata, cancro de bexiga, cancro de ovário, ou malignidades hematológicas.

Em algumas formas de realização dos métodos de tratamento, a etapa (a) é levada a cabo antes de, concomitantemente com ou após terapêutica de cancro de modalidade combinada. Em formas de realização particulares, a terapêutica de cancro de modalidade combinada compreende quimioterapia, radiação terapêutica, ou cirurgia.

Em algumas formas de realização dos métodos de tratamento, a etapa (a) é levada a cabo antes de, concomitantemente com ou após terapêutica de cancro adjuntiva. Em formas de realização particulares, a

terapêutica de cancro adjuntiva compreende a administração de um ou mais agentes para reduzir queda do cabelo, vômitos, supressão imunológica, náuseas, diarreia, erupção cutânea, distúrbios sensoriais, anemia, fadiga, estomatite ou síndrome mão-pé. Em certas formas de realização, a etapa (a) é levada a cabo antes de, concomitantemente com ou após administração de um ou mais agentes anticancro adicionais. Em formas de realização particulares, o um ou mais agentes anticancro adicionais incluem 5-fluorouracil, leucovorin, capecitabina, UFT/LV (tegafur-uracil e leucovorin), irinotecano, um anticorpo anti-EGFR, um anticorpo anti-VEGF, um inibidor de tirosina quinase, ou combinações do mesmo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 mostra uma representação esquemática de um lipossoma direcionado.

A Fig. 2 mostra uma representação esquemática do direcionamento do fármaco ativo às células tumorais com a utilização de lipossomas direcionados.

A Fig. 3 mostra uma representação esquemática do modo de ação proposto dos lipossomas direcionados contendo oxaliplatina.

A Fig. 4 mostra uma descrição esquemática do processo de produção A para lipossomas direcionados.

A Fig. 5 mostra um esquema do processo de produção B para lipossomas direcionados.

A Fig. 6 mostra a citotoxicidade de oxaliplatina sobre células AsPC-1 em várias concentrações de oxaliplatina.

A Fig. 7 mostra o número de receptores de transferrina presentes na superfície celular de leucócitos normais e linhas celulares derivatizadas de tumores.

A Fig. 8 mostra os resultados da distribuição de tamanho para as misturas que contêm lipossomas preparadas no Exemplo 6 e obtidas por QELS; A) Entrada

1, B) Entrada 2, C) Entrada 3, D) Entrada 4, E) Entrada 5, F) Entrada 6.

A Fig. 9 mostra as concentrações de lipossomas no sangue, nas quais (♦) indica os lipossomas Tf-PEG preparados no Exemplo 6, (■) indica os lipossomas Tf-NG-DSPE:NG-DSPE:DSPC:CH preparados no Exemplo 5 e (▲) indica os lipossomas Tf/PEG-NG-DSPE preparados no Exemplo 6.

A Fig. 10 mostra as concentrações de lipossomas em tecidos cancerosos; em que (♦) indica os lipossomas Tf-PEG preparados no Exemplo 6, (■) indica os lipossomas Tf-NG-DSPE:NG-DSPE: DSPC: CH preparados no Exemplo 5 e (a) indica os lipossomas Tf/PEG-NG-DSPE preparados no Exemplo 6.

A Fig. 11 mostra o acúmulo no tecido tumoral de lipossomas NG-PE, preparados como descrito no Exemplo 13, após injeção intravenosa, em que lipossomas NGPE com tiraminil inulina marcada com ^{125}I encapsulada foram injetados em ratinhos com tumor de Cólon 26. Dados apresentados como média. Dados apresentados como média \pm DP (n = 5). (□) 0 mol% (-); (■) 1 mol% (+) Tf-NG-DOPE. * Diferença significativa a partir de 0 mol% (-).

A Fig. 12 mostra os efeitos inibidores de lipossomas sobre o crescimento tumoral num gráfico de proporção do crescimento tumoral vs. dias após tratamento inicial, em que (♦) indica os lipossomas Tf-PEG preparados no Exemplo 9; (■) indica os lipossomas PEG preparados no Exemplo 6, sem Tf; (▲) indica os lipossomas Tf-NG-DSPE:NG-DSPE:DSPC:CH preparados no Exemplo 8; (○) indica os lipossomas NG-DSPE:NG-DSPE:DSPC:CH preparados no Exemplo 8, sem Tf; (*) indica os lipossomas Tf/PEG-NG-DSPE preparados no Exemplo 9; (●) indica os lipossomas PEG-NG-DSPE preparados no Exemplo 9, sem Tf; (+) indica solução 1-

OHP; e (-) indica nenhum tratamento.

A Fig. 13 mostra o efeito de concentração variável de NG-PE (NG-DSPE) sobre a percentagem de dose de fármaco detetada no sangue, em que a concentração (% do teor total de lípidos) de NG-DSPE é a seguinte: (♦) 0 %, (■) 1 %; (▲) 3 %; (x) 6 %; (o) 12 %; e com os seguintes lípidos: (●) MPB 6 %; (+) PDP 6 %.

A Fig. 14 mostra a retenção sanguínea de lipossomas com vários ligantes de ácido dicarboxílico, com e sem Tf; em que (♦) Tf-NGPE, (■) Tf-NSPE; (▲) TF-MPB; (x) NGPE (sem Tf), (*) MPB (sem Tf).

A Fig. 15 mostra a análise exemplar de lipossomas por eletroforese: são mostradas a pista 6 (transferrina-N-glutaril-diestearoil fosfatidil etanolamina-lipossoma (lipossoma Tf-NG-DSPE)); pista 5 (transferrina-polietilenoglicol-diestearoil fosfatidil etanolamina-lipossoma (lipossoma Tf-PEG-DSPE)). As pistas 1-4 contêm h- apo-Tf (240 ng), h-apo-Tf (120 ng), h-apo-Tf (60 ng) e h-apo- Tf (30 ng), respetivamente.

A Fig. 16 mostra a quantidade de transferrina que se liga aos lipossomas Tf-NG-DSPE com (pista 5) e sem (pista 4) não-NG-DSPE incorporado no lipossoma. As pistas 1-3 contêm h-apo-Tf (400 ng), h-apo-Tf (200 ng) e h-apo-Tf (50 ng), respetivamente.

A Fig. 17 mostra o acúmulo oxaliplatina no sangue após administração de (■) lipossomas NG-DOPE:Tf-NG DOPE:DMPC:CH a 5 mg/kg e (●) lipossomas Tf-PEG a 5 mg/kg.

A Fig. 18 mostra o acúmulo oxaliplatina em tumores de cólon 26 após administração de (■) lipossomas NG-DOPE:Tf- NG-DOPE:DMPC:CH a 5 mg/kg e (●) lipossomas Tf-PEG a 5 mg/kg em tumores de cólon 26 de ratinho.

A Fig. 19 mostra o efeito antitumoral em ratinhos com tumor de cólon 26 dos lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH, em que (●) indica o controlo de veículo

(9 % de sacarose); U) indica solução l-OHP a 5 mg/kg, (♦) indica lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH a 5 mg/kg e (■) indica lipossomas Tf-PEG a 5 mg/kg.

A Fig. 20 mostra o efeito antitumoral em ratinhos com xenoenxerto de tumor de cólon humano HCT-116 de lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH, em que (●) indica controlo de veículo (300 mM (10,27 %) de sacarose); (O) indica lipossomas em branco (sem fármaco), (▲) indica solução l-OHP a 15 mg/kg, (♦) indica lipossomas NG-DOPE: Tf-NG-DOPE:DMPC:CH a 10 mg/kg e (■) indica lipossomas NG-DOPE.Tf NG-DOPE:DMPC:CH a 15 mg/kg. Todos os lipossomas foram administrados pelo peso corporal exato com um volume de injeção de 0,103 ml/10 g de peso corporal.

A Fig. 21 mostra o efeito antitumoral em ratinhos com xenoenxerto de tumor de cólon humano HT-29 de lipossomas NG-DOPE; Tf-NG-DOPE : DMPC; CH, em que (●) indica controlo de veículo (300 mM (10,27 %) de sacarose), (▲) indica lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE;DMPC:CH a 15 mg/kg, (■) indica lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC;CH a 10 mg/kg e (♦) indica lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH a 6,7 mg/kg.

A Fig. 22 mostra o efeito antitumoral em ratinhos com xenoenxerto de tumor gástrico humano MKN45 de lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH, em que (●) indica controlo de veículo (300 mM (10,27 %) de sacarose), (▲) indica lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH a 15 mg/kg, (■) indica lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH a 10 mg/kg e (♦) indica lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH a 6,7 mg/kg.

A Fig. 23 mostra o efeito antitumoral em ratinhos com xenoenxerto de tumor COLO 205 humano de lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH, em que (●) indica controlo de veículo (9 % de sacarose); (▲) indica solução l-OHP a 5 mg/kg q4d x3 (16º dia), 10 mg/kg q2d x2 (47º dia), 2

mg/kg q2d x 6 (51° dia); (4) indica lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH a 5 mg/kg q4d x3 (16° dia), 10 mg/kg q2d x2 (47° dia), 2 mg/kg q2d x 6 (51° dia); e (■) indica lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH a 10 mg/kg q4d x3 (16° dia), 15 mg/kg q2d x2 (47° dia), 4 mg/kg q2d x 6 (51° dia).

A Fig. 24 mostra o padrão de SDS-PAGE após redução com 2-mercaptoetanol, onde a pista 1 é os marcadores de peso molecular, a pista 2 é holo-transferrina, as pistas 3-5 são lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH e a pista 6 é Tf-NG-DOPE.

A Fig. 25 mostra um cromatograma HPLC exemplar da aplicabilidade do sistema.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA

Descrevem-se no presente documento composições que contêm lípidos (incluindo lipossomas direcionados, lipossomas em branco, composições que contêm lipossoma, misturas de lípidos etc.), e métodos de produção e utilização das composições que contêm lípido no presente documento descritas. As composições que contêm lípidos, e especificamente os lipossomas que são no presente documento proporcionados, são adequados para a preparação de formulações farmacêuticas e para utilização no tratamento ou de diagnóstico de diversas condições, incluindo cancro. As composições, incluindo as formulações farmacêuticas, permitem regimes de tratamento e diagnóstico mais eficazes com efeitos adversos reduzidos associados ao fármaco ou composto marcado que é libertado ao indivíduo. A eficácia aumentada e os efeitos adversos reduzidos devem aumentar o índice terapêutico da formulação farmacológica e proporcionar uma oportunidade para o tratamento bem-sucedido de diversas condições, incluindo cancro, e também devem aumentar a eficácia e reduzir os efeitos adversos associados ao diagnóstico. A especificidade aumentada das formulações farmacológicas com a redução concomitante dos

efeitos adversos deve assegurar benefício terapêutico a um número e uma gama maior de indivíduos tratados e, dessa forma, salvar ou prolongar vidas e melhorar a qualidade de vida de indivíduos que necessitam de tratamento. A especificidade aumentada das formulações de composto marcado com a redução concomitante dos efeitos adversos deve aumentar o número de indivíduos que podem ser diagnosticados com sucesso, por exemplo, capazes de tolerar a formulação diagnóstica, e também aumentar a precisão (por exemplo, sensibilidade etc.) do diagnóstico, incluindo a possibilidade de um diagnóstico precoce de condições e o monitoramento mais eficaz da gravidade da doença (por exemplo, progressão ou regressão, com ou sem terapêutica).

Estão incluídas nas composições atualmente descritas formulações farmacêuticas das composições que contêm lípido.

As composições que contêm lípido no presente documento descritas incluem, sem limitação, lipossomas que encapsulam fármacos e compostos marcados e podem ser usadas no tratamento ou de diagnóstico de doenças ou de outras condições que exigem tratamento ou de diagnóstico, incluindo, por exemplo, cancro (por exemplo, cancro de mama, gástrico, colorretal ou do cólon).

Quando agentes anticancro convencionais (incluindo citotóxicos) são administrados por via intravenosa, todo o corpo é exposto e afetado pelo fármaco de forma não seletiva. Em consequência, podem ocorrer várias reações adversas, o cancro não é atingido e/ou o efeito do fármaco pode se perder durante o processo de circulação. A encapsulação de um fármaco numa composição de lipossoma antes da administração pode resultar num ou mais benefícios, incluindo redução do(s) efeito(s) adverso(s) do fármaco sobre uma célula normal, proteção do fármaco até que ele chegue numa célula patológica alvo, caso o fármaco possa ser instável, prolongamento da presença do fármaco no

sistema circulatório para permitir a libertação às células patológicas e/ou na facilitação da libertação do fármaco a uma célula patológica alvo em particular. O direcionamento mais específico do fármaco e a redução da perda de fármaco por captação no RES também incluem o benefício de reduzir a quantidade de fármaco que deve ser administrada e, portanto, também reduzem o custo da terapêutica, além de outros benefícios no presente documento descritos.

Da mesma forma, muitos compostos marcados têm efeitos adversos e/ou podem ser degradados no tempo entre a administração e o diagnóstico (por exemplo, no momento em que a técnica diagnóstica é realizada - por exemplo, detecção de radioisótopo, imagem de ressonância magnética, ultrassom, etc.). A incorporação dos compostos marcados nas composições que contêm lípido no presente documento descritas deve aumentar a eficácia do composto marcado, como, por exemplo, o limiar de detecção pode ser alcançado em doses menores do composto marcado, reduzindo os efeitos adversos do agente e/ou estendendo a janela de tempo em que o diagnóstico pode ser realizado.

As composições que contêm lípido também incluem lípidos modificados com ligandos de direcionamento (por exemplo, lipossomas direcionados, lipossomas em branco, composições que contêm lipossoma, misturas de lípidos) ou outra derivatização. Por exemplo, foram desenvolvidas composições lipossômicas que incorporam fator de direcionamento (por exemplo, transferrina, folato, etc.) e lípidos derivatizados (por exemplo, fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico) para aumentar a segurança e a eficácia de agentes anticâncer (por exemplo, oxaliplatina, etc.) através do prolongamento do tempo de circulação do fármaco no plasma (comparado com o fármaco administrado em solução isoladamente) e por recetores específicos para o fator de direcionamento nas células tumorais. Essa maior biodisponibilidade e esse maior

direcionamento ao tumor devem produzir uma maior segurança e maior atividade antitumoral e, portanto, uma maior probabilidade de um tratamento eficaz para os indivíduos que dele necessitam, ao mesmo tempo em que reduzem os efeitos adversos associados a muitos fármacos, particularmente os efeitos adversos graves associados a maioria dos agentes anticâncer. Da mesma forma, tal derivatização e tais fatores de direcionamento também podem ser utilizados para direcionar eficientemente locais alvos específicos (por exemplo, tipos de tumor, órgãos, tecidos, etc.) para a libertação dos compostos marcados.

Descrevem-se no presente documento, fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificadas por transferrina que podem ser usadas nas composições que contêm lípido e formulações destas no presente documento descritas.

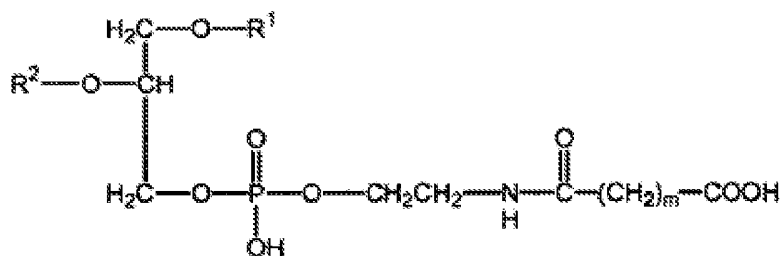
As composições que contêm lípido, incluindo os lipossomas, como no presente documento descritas, podem ser feitas pelos métodos no presente documento descritos, bem como por métodos para fabrico de lipossomas conhecidos pelos peritos na especialidade e apropriados à luz dos ensinamentos proporcionados na presente memória descritiva. A não ser que indicado de outro modo, os lipossomas e as composições que contêm lipossoma no presente documento descritas podem ser incorporados, sem limitação, em formulações farmacêuticas e/ou kits, incluindo formulações farmacêuticas e/ou kits como no presente documento descritos e, adicionalmente, aqueles que sejam evidentes para os peritos na especialidade à luz dos ensinamentos proporcionados na presente memória descritiva. Da mesma forma, os lipossomas e as composições contendo lipossoma e formulações farmacêuticas que incorporam os lipossomas e as composições que contêm lipossoma podem ser usados sem limitação, a não ser que indicado de outro modo, nos métodos de tratamento ou de diagnóstico consistentes com a

descrição proporcionada ao longo da presente memória descritiva e de acordo com a prática dos peritos na especialidade à luz dos ensinamentos no presente documento proporcionados.

Um lipossoma direcionado exemplar que incorpora um fármaco (oxaliplatina) está representado esquematicamente na Figura 1. Mecanismos propostos da captação e o modo de ação de lipossomas direcionados são proporcionados nas Figuras 2 e 3. Como é usado no presente documento, o termo "lipossoma direcionado" refere-se geralmente a um lipossoma com componentes que incluem pelo menos um ou mais fosfolípido (s), NωPE, TF-NωPE e que também incorpora um fármaco ou composto marcado como no presente documento descrito. Cada um desses componentes como foi descrito ao longo da memória descritiva, sem limitação, pode ser incorporado nos lipossomas direcionados da presente invenção de acordo com os ensinamentos no presente documento proporcionados. Deve-se observar que os lipossomas em branco, no presente documento descritos mais pormenorizadamente, também podem ser "direcionados", no sentido que podem incorporar NωPEs modificados com TF, mas geralmente não incorporam um fármaco ou composto marcado.

Fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico

As composições que contêm lípido no presente documento descritas incorporam pelo menos uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico de acordo com a Fórmula 1, abaixo:



em que R^1 e R^2 são, independentemente, um grupo acilo, e m é um número inteiro de 1 a 10.

Como é usado no presente documento, o termo "fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico", e seus cognatos, referem-se às fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico abrangidas pela Fórmula 1, como no presente documento proporcionada. Da mesma forma, a abreviação N ω PE é usada para se referir às fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico abrangidas pela Fórmula 1 (por exemplo, N ω -DOPE, N ω -DSPE, NG-DOPE, etc.) e, por exemplo, NG-PE refere-se à(s) N-glutaril fosfatidil etanolamina(s) de Fórmula 1, a não ser que indicado de outro modo.

Espera-se que a(s) única(s) fosfatidil etanolamina(s) incorporada(s) nas composições que contêm lípido (incluindo lipossomas direcionados) no presente documento descritas sejam fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico de Fórmula 1 ou ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico de Fórmula 2 ou das fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificadas por fator de direcionamento de Fórmula 3, como descrito mais pormenorizadamente a seguir. Como é usado no presente documento, o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada", e cognatos deste, referem-se à fosfatidil etanolamina, à(s) fosfatidil etanolamina(s) semissintéticas, fosfatidil etanolamina(s) sintéticas e/ou derivados destas que não sejam abrangidos pela Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3.

Uma ampla variedade de grupos acilo, representados por R^1 e R^2 , pode ser usada na Fórmula 1, como é de conhecimento dos peritos na especialidade.

Em algumas formas de realização, o grupo acilo é derivado de ácidos carboxílicos alifáticos saturados ou insaturados que possuem 12-22 átomos de carbono. Grupos

acilo exemplares incluem, sem limitação, grupos acilo derivados de ácido láurico, ácido tridecanóico, ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido margárico, ácido esteárico, ácido nonadecanóico, ácido aráquico, ácido heneicosânico, ácido behenico, ácido 2-lauroleico, ácido 5-lauroleico, ácido 11-lauroleico, ácido 5-minstoleico, ácido miristoleico, ácido 2-palmitoleico, ácido 7-palmitoleico, ácido cis-9-palmitoleico, ácido trans-9-palmitoleico, ácido petroselinico, ácido petroselinidínico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido vacénico, ácido gondóico, ácido trans-gondóico, ácido erúcico, ácido linoleico, ácido linoelaídico, ácido α -eleosteânico, ácido β -eleosteárico, ácido linolénico, ácido pseudoeleosteárico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaénico ou ácido docosaheptaénico.

Em certas formas de realização, o grupo acilo é derivado de ácidos carboxílicos alifáticos saturados ou insaturados que possuem 14-18 átomos de carbono. Grupos acilo exemplares desse tipo incluem, sem limitação, aqueles derivados de ácido oleico (18 carbonos), ácido palmítico (16 carbonos), ácido esteárico (18 carbonos) ou ácido mirístico (14 carbonos). Como é reconhecido pelos peritos na especialidade, os grupos acilo correspondentes são oleoilo, palmitoilo, estearoilo e miristoilo, respetivamente.

Em outras formas de realização, os grupos acilo são derivados de ácidos carboxílicos alifáticos saturados ou insaturados que possuem 14-18, 14-20, 14-22, 16-18, 16-20, 16-22, 18-20, 18-22, 12, 14, 16, 18, 20 ou 22 carbonos. Em certas formas de realização, os grupos acilo são derivados de ácidos carboxílicos alifáticos saturados ou insaturados que possuem um número par de carbonos.

Em algumas formas de realização, os grupos acilo são derivados de ácido oleico (oleoilo), ácido esteárico (estearoilo), ácido palmítico (palmitoilo), ácido linoleico

(linoleoilo, 18 carbonos) ou ácido mirístico (miristoilo). Em outras formas de realização, os grupos acilo são derivados de ácido oleico (oleoilo). Em certas formas de realização, os grupos acilo são derivados de ácido esteárico (estearoilo). Ainda em outras formas de realização, os grupos acilo são derivados de ácido palmítico (palmitoilo). Em outras formas de realização, os grupos acilo são derivados de ácido mirístico (miristoilo).

Em algumas formas de realização, o grupo acilo é derivado de um ácido carboxílico alifático saturado como, por exemplo, sem limitação, ácido palmítico (16 carbonos), ácido esteárico (18 carbonos) ou ácido mirístico (14 carbonos).

Em outras formas de realização, o grupo acilo é derivado de um ácido carboxílico alifático insaturado como, por exemplo, sem limitação, ácido oleico (oleoilo, 18 carbonos), ácido linoleico (linoleoilo, 18 carbonos) ou ácido linolenico (linolenoilo, 18 carbonos). Em algumas formas de realização, o grupo acilo é derivado de ácido linoleico.

Em certas formas de realização, m é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 10. Em outras formas de realização, m é um número inteiro de 1-8, 1-6, 1-5, 1-7, 1-3, 1-2, 2-8, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-4, 3-5 ou 3-6. Em algumas formas de realização, m é um número inteiro de 2-4. Em outras formas de realização, m é 1, 2 ou 3.

Em certas formas de realização, m é um número inteiro de 1 a 4. Como é reconhecido pelos peritos na especialidade, $m = 1$ corresponde a um derivado de ácido malónico da fosfatidil etanolamina (PE), enquanto $m = 2, 3$ ou 4 representa derivados de ácido succínico, ácido glutárico e ácido adípico da PE, respectivamente. Em algumas formas de realização, m é 3 (ácido glutárico).

Em certas formas de realização, R^1 e R^2 são o mesmo grupo acilo. Em outras formas de realização, R^1 e R^2 são

grupos acilo diferentes. Em certas formas de realização, R^1 e R^2 são oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em algumas formas de realização, R^1 e R^2 são oleoilo. Em outras formas de realização, R^1 e R^2 são estearoilo. Em formas de realização particulares, R^1 e R^2 são palmitoilo. Em outras formas de realização, R^1 e R^2 são miristoilo.

Em algumas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico de Fórmula 1 e N- glutaril-dioleoil fosfatidil etanolamina (NG-DOPE (ou seja, em que R^1 e R^2 são oleoilo e m é 3)). Em outras formas de realização, ela é N-glutaril-diestearoil fosfatidil etanolamina (NG- DSPE (ou seja, em que R^1 e R^2 são estearoilo e m é 3)) Em outras formas de realização, ela é N-glutaril-dimiristoil fosfatidil etanolamina (NG-DMPE (ou seja, em que R^1 e R^2 são miristoilo e m é 3)). Em outras formas de realização, ela é N-glutaril- dipalmitoil fosfatidil etanolamina (NG-DPPE (ou seja, em que R^1 e R^2 são palmitoilo e m é 3)). Em outras formas de realização, ela é N-succinil-diestearoil fosfatidil etanolamina (NS-DSPE (ou seja, em que R^1 e R^2 são estearoilo e m é 2)). Em outras formas de realização, ela é N-adipinil-diestearoil fosfatidil etanolamina (NA-DSPE (ou seja, em que R^1 e R^2 são estearoilo e m é 4)). Em certas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico de Fórmula 1 é NG-DOPE OU NG-DSPE.

Preparação de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico

As fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)- dicarboxílico no presente documento descritas podem ser obtidas por ligação de um ácido dicarboxílico ao grupo amino da fosfatidil etanolamina.

Fosfolípidos, incluindo fosfatidil etanolaminas e seus derivados utilizados para as finalidades no presente documento descritas, devem ser de alta pureza e devem idealmente ser homogêneos. Métodos conhecidos para a

preparação de fosfolípidos de alta pureza incluem extração do lípido de uma solução tampão e purificação com a utilização de cromatografia em coluna. Por exemplo, métodos de produção para N-succinil dipalmitoilfosfatidiletanolamina são descritos na Publicação do Pedido de Patente Internacional W093/01828 (JPAH7-501316) e nas Patentes US N° 5.804.552 e 5.554.728. Esses métodos de produção incluem a purificação de derivado fosfolipídico da mistura de reação por cromatografia em coluna de sílica gel 60 da mistura de reação. Dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE) é reagida com anidrido de ácido succínico com catalisador de trietilamina em temperatura ambiente sob gás de azoto durante 16 horas.

Outros métodos de produção de derivados fosfolipídicos de N-(ω -carboxi) acilamido-fosfatidil etanolamina são descritos no pedido publicado de patente japonesa JPA2001-261688, que inclui purificação por separação de uma camada líquida após adição de solução tampão de pH 3,5-7,5 à mistura de reação. Nesse caso, a PE foi reagida com anidrido de ácido dicarboxílico com catalisador alcalino de trietilamina a 4 °C durante 1 hora. Esse método pode não funcionar adequadamente para todos os derivados de fosfatidil etanolamina.

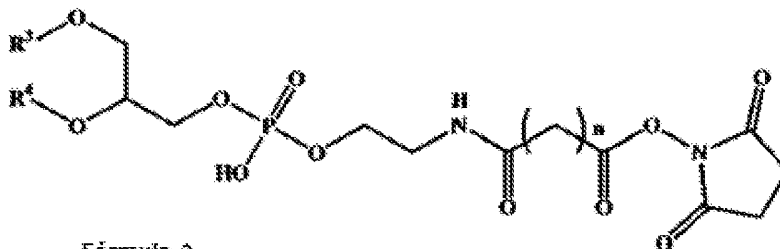
DOPE (dioleoil-fosfatidil etanolamina) também pode ser obtida comercialmente ou preparada por métodos conhecidos pelos peritos na especialidade. Por exemplo, resumidamente, lecitina (Material de Partida API) pode ser hidrolisada quimicamente para gerar glicerol-fosfo-colina, que é isolada por precipitação. O lípido é então acilado com a utilização de ácido oleico ativado, e DOPC (dioleoil-fosfatidilcolina) é isolada por cromatografia em coluna de fase normal e passada através de coluna de troca iônica para purificar. DOPE pode ser preparada a partir de DOPC por reação com etanolamina usando fosfolipase D.

Os derivados fosfolipídicos de N-(ω -carboxi)acilamido-

fosfatidiletanolamina também podem ser preparados da forma descrita, por exemplo, na Patente US N° 4.534.899. Resumidamente, um anidrido dicarboxílico é feito reagir com um fosfolípido, por exemplo, fosfatidiletanolamina, para obter uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

Ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolamina derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico

Os ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolamina derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico no presente documento descritos são representados pela seguinte Fórmula 2.



Fórmula 2

em que R³ e R⁴ são, independentemente, um grupo acilo, e n é um número inteiro de 1 a 10.

Como é usado no presente documento, o termo "ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico", e seus cognatos, referem-se aos ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico abrangidos pela Fórmula 2, como no presente documento proporcionados. Da mesma forma, a abreviação SuccN ω PE pode ser usada para se referir aos ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico abrangidos pela Fórmula 2 (por exemplo, SuccNu-DOPE, SuccNu-DSPE, SuccNG-DOPE, etc.) e, por exemplo, NHS-NG-PE refere-se ao éster succinimidílico de N-glutaril fosfatidil etanolamina(s) de Fórmula 2 formado por reação com NHS, a não ser que indicado de outro modo.

Uma ampla variedade de grupos acilo que são representados por R^3 e R^4 pode ser usada, como é do conhecimento dos peritos na especialidade e como descrito anteriormente para R^1 e R^2 . A não ser que no presente documento observado de forma diferente, é expressamente desejado que a descrição no presente documento proporcionada dos grupos acilo com relação à Fórmula 1 (por exemplo, R^1 e R^2) seja igualmente aplicável aos grupos acilo com relação à Fórmula 2 (por exemplo, R^3 e R^4). incluindo, em particular, a descrição acima na seção intitulada "fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico".

Em certas formas de realização, R^3 e R^4 são o mesmo grupo acilo. Em outras formas de realização, R^3 e R^4 são grupos acilo diferentes. Em certas formas de realização, R^3 e R^4 são oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em algumas formas de realização, R^3 e R^4 são oleoilo. Em outras formas de realização, R^3 e R^4 são estearoilo. Em certas formas de realização, R^3 e R^4 são palmitoilo. Em outras formas de realização, R^3 e R^4 são miristoilo.

Em certas formas de realização, n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em outras formas de realização, n é um número inteiro de 1-8, 1-6, 1-5, 1-7, 1-3, 1-2, 2-8, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-4, 3-5 ou 3-6. Em algumas formas de realização, n é um número inteiro de 2- 4. Em outras formas de realização, n é 1, 2 ou 3.

Em certas formas de realização, n é um número inteiro de 1 a 4. Como é reconhecido pelos peritos na especialidade, n 1 corresponde a um derivado de ácido malónico da fosfatidil etanolamina (PE), enquanto n = 2, 3 ou 4 representa derivados de ácido succínico, ácido glutárico e ácido adípico da PE, respectivamente. Em algumas formas de realização, n é 3 (ácido glutárico).

Em algumas formas de realização, o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de

ácido N-(ω)-dicarboxílico de Fórmula 2 é um éster succinimidílico de N- glutaril-dioleoil fosfatidil etanolamina (NG-DOPE). Em outras formas de realização, ele é um éster succinimidílico de N- glutaril-diestearoil fosfatidil etanolamina (NG-DSPE). Em certas formas de realização o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico de Fórmula 2 é um éster succinimidílico de NG-DOPE ou NG-DSPE.

Em algumas formas de realização, o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico de Fórmula 2 é o éster succinimidílico da N- glutaril-dioleoil fosfatidil etanolamina (SuccNG-DOPE (ou seja, em que R^3 e R^4 são oleoilo e n é 3)). Em outras formas de realização, ele é o éster succinimidílico de N-glutaril- diestearoil fosfatidil etanolamina (SuccNG-DSPE (ou seja, em que R^3 e R^4 são estearoilo e n é 3)). Em outras formas de realização, ele é o éster succinimidílico de N-glutaril- dimiristoil fosfatidil etanolamina (SuccNG-DMPE (ou seja, em que R^3 e R^4 são miristoilo e n é 3)). Em outras formas de realização, ele é o éster succinimidílico de N-glutaril- dipalmitoil fosfatidil etanolamina (SuccNG-DPPE (ou seja, em que R^3 e R^4 são palmitoilo e n é 3)). Em outras formas de realização, ele é o éster succinimidílico de N-succinil- diestearoil fosfatidil etanolamina (SuccNS-DSPE (ou seja, em que R^3 e R^4 são estearoilo e n é 2)). Em outras formas de realização, ele é o éster succinimidílico de N-adipinil- diestearoil fosfatidil etanolamina (SuccNA-DSPE (ou seja, em que R^3 e R^4 são estearoilo e n é 4)). Em certas formas de realização, o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico de Fórmula 2 é SuccNG-DOPE ou SuccNG-DSPE.

Em algumas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é Nu-DOPE e o s éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina

derivada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é SuccNu-DOPE. Em outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é N ω -DSPE e o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é SuccN ω -DSPE. Ainda em outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é N ω -DOPE e o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é SuccN ω -DSPE. Em algumas outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é N ω -DSPE e o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é SuccN ω -DOPE. Em algumas dessas formas de realização, o éster succinimidílico pode ser NHS (por exemplo, NHS-N ω -DOPE, NHS-N ω -DSPE, etc.).

Em algumas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NG-DOPE e o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é SuccNG-DOPE. Em outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NGDSPE e o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é SuccNG-DSPE. Ainda em outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NG-DOPE e o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é SuccNG-DSPE. Em algumas outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NG-DSPE e o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é SuccNG-DOPE. Em algumas dessas formas de realização, o éster succinimidílico pode ser NHS (por exemplo, NHS-NG-DOPE, NHS-NG-DSPE, etc.).

Preparação de ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico

Os ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico no presente documento descritos podem ser obtidos por derivatização das fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico no presente documento descritas, preparadas da forma conhecida na técnica e no presente documento descrita. A preparação dos ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico também é descrita mais pormenorizadamente abaixo, incluindo nos Exemplos. À luz dos ensinamentos proporcionados na presente memória descritiva, os peritos na especialidade também serão capazes de modificar os métodos no presente documento descritos.

Um método para a produção dos ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico descritos no presente documento é como se segue:

A 1 equivalente de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico representadas pela Fórmula 2 no presente documento descrita, é adicionado cerca de 0,7-1,3 equivalente de NHS, que é dissolvido num solvente orgânico que não possui um hidrogénio ativo. A mistura é então feita reagir com cerca de 0,7-1,3 equivalente de um composto de carbodiimida a 0-50 °C, por cerca de 1-7 dias.

Solventes orgânicos exemplares que não possuem um hidrogénio ativo incluem, sem limitação, ésteres (por exemplo, acetato de etilo, acetato de butilo, etc.), hidrocarbonetos alifáticos (por exemplo, hexano, heptanos, etc.), hidrocarbonetos aromáticos (por exemplo, tolueno, xileno, etc.), hidrocarboneto halogenados (por exemplo, clorofórmio, diclorometano, dicloroetano, etc.), éteres (por exemplo, THF, dioxano, éter dietílico, etc.),

hidrocarbonetos cíclicos (por exemplo, ciclohexano, etc.), DMF e DMSO. O solvente orgânico também pode ser desidratado.

Uma ampla variedade de compostos de carbodiimida pode ser usada, desde que os compostos possuam um grupo carbodiimida. Por exemplo, compostos de carbodiimida que podem ser usados incluem, sem limitação, grupos carbodiimida como N,N'-diciclohexil-carbodiimida (DCC), N,N'-diisopropil-carbodiimida, cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDO, etc. Em certas formas de realização, é usada DCC. Em outras, é usada EDC.

A reação acima descrita também pode ser realizada sob condições que minimizem ou eliminem a produção de subprodutos. Subprodutos indesejados incluem compostos de ureia (por exemplo, N,N'-diciclohexilureia, N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)ureia, etc.), compostos de ureia N-acilada, compostos de carboxianidrido e compostos de 5-oxazolona. Condições e materiais que desfavorecem ou minimizam a formação de subprodutos incluem: 1) dissolução lenta dos compostos de carbodiimida em solvente orgânico, 2) realização da reação abaixo de 0 °C para evitar libertação de calor pela reação, etc. Outros meios para aperfeiçoar a reação e minimizar a produção de subprodutos são do conhecimento dos peritos na especialidade, particularmente à luz dos ensinamentos no presente documento proporcionados.

O solvente orgânico que é capaz de dissolver os compostos de carbodiimida é o mesmo solvente orgânico que não possui um hidrogénio ativo descrito acima. O solvente usado para dissolver a carbodiimida e o solvente orgânico sem hidrogénio ativo podem ser o mesmo ou diferentes.

O progresso da reação pode ser monitorizado por sistemas de cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) e/ou detetores de dispersão de luz evaporada. Outros métodos

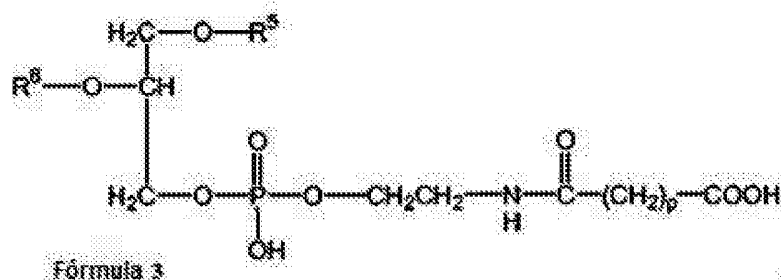
para o monitoramento do progresso da reação também serão do conhecimento dos peritos na especialidade.

A purificação pode ser realizada por cromatografia em coluna de sílica gel com a utilização de uma mistura de clorofórmio e metanol. Métodos de purificação adicionais serão conhecidos pelos peritos na especialidade.

Em solventes orgânicos totalmente desidratados e na ausência de forte acidez ou forte alcalinidade, os ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico no presente documento descritos são normalmente estáveis.

Fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificadas por fator de direcionamento

As osfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificadas por fator de direcionamento incluem um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, em que a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



em que R^5 e R^6 são, independentemente, um grupo acilo, e p é um número inteiro de 1 a 10.

Como é usado no presente documento, o termo "fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento", e seus cognatos, referem-se às fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico abrangidas pela

Fórmula 3 e modificadas com um fator de direcionamento como no presente documento proporcionado. Da mesma forma, a abreviação TF-N ω PE pode ser usada para se referir às fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificadas por fator de direcionamento (por exemplo, TF-N ω -DOPE, TF-N ω -DSPE, TF-NG-DOPE, etc.) e, por exemplo, TF-NG-PE refere-se a um ligando de direcionamento ligado à(s) N-glutaril fosfatidil etanolamina(s) de Fórmula 3.

Uma ampla variedade de grupos acilo que são representados por R⁵ e R⁶ pode ser usada, como é do conhecimento dos peritos na especialidade e como descrito acima para R¹ e R². A não ser que no presente documento observado de forma diferente, é expressamente desejado que a descrição no presente documento proporcionada dos grupos acilo com relação a Fórmula 1 (por exemplo, R¹ e R²) se já igualmente aplicável aos grupos acilo com relação à Fórmula 3 (por exemplo, R⁵ e R⁶). Incluindo, em particular, a descrição acima na seção intitulada "fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico".

Em certas formas de realização, R⁵ e R⁶ são o mesmo grupo acilo. Em outras formas de realização, R⁵ e R⁶ são grupos acilo diferentes. Em certas formas de realização, R⁵ e R⁶ são oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo. Em algumas formas de realização, R⁵ e R⁶ são oleoilo. Em outras formas de realização, R⁵ e R⁶ são estearoilo. Em certas formas de realização, R⁵ e R⁶ são palmitoilo. Em outras formas de realização, R⁵ e R⁶ são miristoilo.

Em certas formas de realização, p é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em outras formas de realização, p é um número inteiro de 1-8, 1-6, 1-5, 1-7, 1-3, 1-2, 2-8, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-4, 3-5 ou 3-6. Em algumas formas de realização, p é um número inteiro de 2-4. Em outras formas de realização, p é 1, 2 ou 3.

Em certas formas de realização, p é um número inteiro

de 1 a 4. Como é reconhecido pelos peritos na especialidade, p 1 corresponde a um derivado de ácido malónico da fosfatidil etanolamina (PE), enquanto p = 2, 3 ou 4 representa derivados de ácido succínico, ácido glutárico e ácido adípico da PE, respetivamente. Em algumas formas de realização, p é 3 (ácido glutárico).

Em algumas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento de Fórmula 3 é N-glutaril-dioleoil fosfatidil etanolamina modificada por fator de direcionamento (TF-NG-DOPE). Em outras formas de realização, ela é N-glutaril-diestearoil fosfatidil etanolamina modificada por fator de direcionamento (TF-NG-DSPE). Em certas formas de realização, ela é fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento de Fórmula 3 TF-NG-DOPE ou TF-NG-DSPE.

Em algumas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico de Fórmula 3 e N-glutaril-dioleoil fosfatidil etanolamina (NG-DOPE (ou seja, em que R⁵ e R⁶ são oleoil e p é 3)). Em outras formas de realização, ela é N-glutaril-diestearoil fosfatidil etanolamina (NG-DSPE (ou seja, em que R⁵ e R⁶ são estearoil e p é 3)). Em outras formas de realização, ela é N-glutaril-dimiristoil fosfatidil etanolamina (NG-DMPE (ou seja, em que R⁵ e R⁶ são minstoil e p é 3)). Em outras formas de realização, ela é N-glutaril-dipalmitoil fosfatidil etanolamina (NG-DPPE (ou seja, em que R⁵ e R⁶ são palmitoil e p é 3)). Em outras formas de realização, ela é N-succinil-diestearoil fosfatidil etanolamina (NS-DSPE (ou seja, em que R⁵ e R⁶ são estearoil e p é 2)). Em outras formas de realização, ela é N-adipinil-diestearoil fosfatidil etanolamina (NA-DSPE (ou seja, em que R⁵ e R⁶ são estearoil e p é 4)). Em certas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-

dicarboxílico de Fórmula 3 e NG- DOPE ou NG-DSPE.

Em certas formas de realização, o ligando de direcionamento é transferrina (Tf), que é descrita mais pormenorizadamente abaixo, e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)- dicarboxílico incorporada na fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)- dicarboxílico modificada por transferrina é de Fórmula 3, como no presente documento descrita.

Em algumas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é N ω -DOPE e o ligando de direcionamento é transferrina (Tf), e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)- dicarboxílico modificada por fator de direcionamento é Tf-N ω -DOPE. Em outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é N ω -DSPE e o ligando de direcionamento é transferrina (Tf), e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)- dicarboxílico modificada por fator de direcionamento é Tf-N ω -DSPE. Ainda em outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é N ω -DOPE e o ligando de direcionamento é transferrina (Tf), e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)- dicarboxílico modificada por fator de direcionamento é Tf-N ω -DSPE. Em algumas outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)- dicarboxílico é N ω -DSPE e o ligando de direcionamento é transferrina (Tf), e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento é Tf- N ω -DOPE. Em algumas dessas formas de realização, m pode ser 3 e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é uma NG-PE de acordo com a Fórmula 1.

Em algumas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NG-DOPE e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-

(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento é TF-NG-DOPE. Em outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NGDSPE e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento é TF-NG-DSPE. Ainda em outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NG-DOPE e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento é TF-NG-DSPE. Em algumas outras formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é NG-DSPE e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento é TF-NG-DOPE.

A fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamentos pode ser preparada a partir do SuccN ω PE por reação com o ligando de direcionamento e outros reagentes, como no presente documento descrito mais pormenorizadamente. A TF-N ω PE tanto pode ser preparada antes da mistura com outros componentes lipídicos das composições que contêm lípido no presente documento descritas (e opcionalmente purificadas) quanto pode ser preparada *in situ* pela reação do SuccN ω PE pré-preparada que foi incorporada numa composição que contém lípido.

Componentes Lipídicos Adicionais

As composições que contêm lípido no presente documento descritas também contêm um ou mais componentes lipídicos adicionais, além das N ω PEs, SuccN ω PEs e/ou TFN ω PEs no presente documento descritas. Diversos componentes lipídicos adicionais podem ser usados; no entanto, o termo "componente(s) lipídico(s) adicional(is)" não visa a incluir fosfatidil etanolaminas não derivadas (PEs) ou derivados de PEs como nas Fórmulas 1, 2 ou 3. Em algumas formas de realização, esse um ou mais componente lipídico

adicional pode ser um fosfolípido ou um ou mais fosfolípidos. Em certas formas de realização, esse um ou mais componente lipídico adicional pode incluir pelo menos dois lípidos neutros. Em outras formas de realização, podem estar presentes um ou mais fosfolípidos e, opcionalmente, um "lípidio adicional" (que não é um fosfolípido). Diversos lípidos neutros podem ser usados; no entanto, esses pelo menos dois lípidos neutros não visam a incluir fosfatidil etanolaminas não derivadas (PEs) ou derivados de PEs como nas Fórmulas 1, 2 ou 3. Não há a intenção de que o termo "fosfolípido", como é usado no presente documento, deva incluir PEs ou derivados destas, como nas Fórmulas 1, 2 ou 3. Da mesma forma, o termo "lípidio adicional" não inclui PEs ou derivados destas, como nas Fórmulas 1, 2 ou 3, nem inclui outros fosfolípidos.

Em formas de realização particulares, podem ser usados fosfolípido(s) nas composições que contêm lípido e formulações no presente documento descritas. Por exemplo, um ou mais, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro fosfolípidos; ou dois, três ou quatro fosfolípidos. Em formas de realização particulares, há um fosfolípido. Em certas formas de realização, os componentes lipídicos das composições são limitados a um fosfolípido, à N ω PE e ao SuccN ω PE (ou NgjPE modificada por TF, quando a reação com o fator de direcionamento tiver sido realizada).

Em formas de realização particulares, podem ser usados dois ou mais lípidos neutros nas composições que contêm lípido e nas formulações no presente documento descritas. Por exemplo, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro lípidos neutros; ou, dois, três ou quatro lípidos neutros. Em formas de realização particulares, há dois lípidos neutros. Em certas formas de realização, os componentes lipídicos das composições são limitados a dois lípidos neutros, à N ω PE, e ao SuccN ω PE (ou N ω PE modificada por TF, quando a reação com o fator de direcionamento tiver

sido realizada).

Em algumas formas de realização, quando os componentes lipídicos adicionais incluem um fosfolípido, o fosfolípido pode ser uma fosfatidilcolina, incluindo fosfatidilcolinas de ocorrência natural, semissintéticas ou sintéticas (por exemplo, DSPC, DMPC, etc.). Em algumas formas de realização, a fosfatidilcolina é uma fosfatidilcolina de ocorrência não natural (por exemplo, fosfatidilcolina sem ser de ovo). Em formas de realização particulares, a fosfatidilcolina é uma acil fosfatidilcolina (por exemplo, DMPC, DPPC, POPC, DSPC, etc.). Em algumas formas de realização, o fosfolípido é catiónico. Em outras formas de realização, o fosfolípido é aniónico. Ainda em outras formas de realização, o fosfolípido é neutro. Em formas de realização particulares, esse um ou mais fosfolípidos não são aniónicos. Em outras formas de realização, esse um ou mais fosfolípidos não são catiónicos. Em certas formas de realização nas quais mais de um fosfolípido estão presentes, um lípido aniónico e neutro poder ser incluído. Fosfolípidos exemplares incluem, sem limitação, fosfatidilcolinas (PCs), ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, etc. Em algumas formas de realização, as composições que contêm lípido não incluem fosfatidilserina ou fosfatidilglicerol.

Em certas formas de realização, pelo menos um daqueles pelo menos dois lípidos neutros pode ser um fosfolípido. Em algumas formas de realização, o fosfolípido pode ser uma fosfatidilcolina, incluindo fosfatidilcolinas de ocorrência natural, semissintéticas ou sintéticas (por exemplo, DSPC, DMPC, etc.). Em algumas formas de realização, a fosfatidilcolina é uma fosfatidilcolina de ocorrência não natural (por exemplo, fosfatidilcolina sem ser de ovo). Em formas de realização particulares, a fosfatidilcolina é uma acil fosfatidilcolina (por exemplo, DMPC, DPPC, POPC, DSPC, etc.).

Em algumas formas de realização, pelo menos um daqueles pelo menos dois lípidos neutros pode ser colesterol ou um derivado de colesterol (por exemplo, colesterol pululana, colesterol carregado positivamente (por exemplo, DC-Col)), que incorpora uma fração de um radioisótopo (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I , etc.), com uma fração funcional (por exemplo, uma fração fluorescente, etc.).

Em certas formas de realização nas quais as composições que contêm lípido incluem um ou mais fosfolípidos, as composições podem compreender adicionalmente um lípido neutro adicional, não fosfolipídico, como o lípido adicional. Por exemplo, colesterol ou um derivado de colesterol como descrito acima.

Fosfolípidos (não PEs) para utilização nas composições que contêm lípido no presente documento descritas incluem fosfolípidos sintéticos, semissintéticos e de ocorrência natural. Fosfolípidos exemplares incluem, sem limitação, fosfatidilcolina (PC), ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, etc. Em outras formas de realização, o um ou mais fosfolípido inclui fosfatidilcolina (PC) ou ácido fosfatídico, e não inclui fosfatidilserina ou fosfatidilglicerol.

Em algumas formas de realização, o fosfolípido é uma fosfatidilcolina. Em certas formas de realização, a fosfatidilcolina pode ser, por exemplo, diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), palmitoil oleoil fosfatidilcolina (POPC), fosfatidilcolina de ovo (EPC), fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC), etc. Em formas de realização particulares, pelo menos um fosfolípido é uma fosfatidilcolina. Em algumas dessas formas de realização, a fosfatidilcolina é DMPC. Em outras formas de realização, a fosfatidilcolina é DSPC. Em outras

formas de realização, a fosfatidilcolina é DPPC. Em outras formas de realização, a fosfatidilcolina é POPC. Em outras formas de realização, a fosfatidilcolina é EPC. Em outras formas de realização, a fosfatidilcolina é HSPC. Em algumas formas de realização, é incluído um fosfolípido e é DMPC, DSPC, DPPC, POPC, EPC ou HSPC. Em formas de realização particulares nas quais a composição que contém lípido inclui um único fosfolípido (fosfolípido diferente de PE), o fosfolípido é DMPC. Em outras formas de realização nas quais a composição que contém lípido inclui um único fosfolípido (fosfolípido diferente de PE), o fosfolípido é DSPC. Em outras formas de realização nas quais a composição que contém lípido inclui um único fosfolípido (fosfolípido diferente de PE), o fosfolípido é DPPC. Em outras formas de realização nas quais a composição que contém lípido inclui um único fosfolípido (fosfolípido diferente de PE), o fosfolípido é POPC. Em outras formas de realização nas quais a composição que contém lípido inclui um único fosfolípido (fosfolípido diferente de PE), o fosfolípido é EPC. Em outras formas de realização nas quais a composição que contém lípido inclui um único fosfolípido (fosfolípido diferente de PE), o fosfolípido é HSPC.

Em certas formas de realização, os componentes lipídicos adicionais podem incluir pelo menos um fosfolípido e, opcionalmente, um lípido adicional como, por exemplo, colesterol ou um derivado de colesterol. Em formas de realização particulares, os componentes lipídicos adicionais são um único fosfolípido e colesterol. Em certas formas de realização, os componentes lipídicos adicionais incluem pelo menos uma fosfatidilcolina e colesterol. Em formas de realização particulares, os componentes lipídicos adicionais incluem uma única fosfatidilcolina e colesterol. Em certas formas de realização nas quais é incluído colesterol, o fosfolípido é DSPC, DMPC, DPPC, POPC, EPC ou HSPC. Em algumas formas de realização, os componentes

lipídicos adicionais incluem colesterol e DMPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais incluem colesterol e DSPC. Em certas formas de realização, os componentes lipídicos adicionais são colesterol e um de DMPC ou DSPC. Em certas formas de realização, os componentes lipídicos adicionais são colesterol e DMPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais são colesterol e DSPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais incluem colesterol e DPPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais incluem colesterol e POPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais incluem colesterol e EPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais incluem colesterol e HSPC. Em certas formas de realização, os componentes lipídicos adicionais são colesterol e um de DMPC, DSPC, DPPC, POPC, EPC ou HSPC. Em certas formas de realização, os componentes lipídicos adicionais são colesterol e DMPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais são colesterol e DSPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais são colesterol e DPPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais são colesterol e POPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais são colesterol e EPC. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos adicionais são colesterol e HSPC.

Em formas de realização particulares, há um fosfolípido e o fosfolípido não é HSPC ou EPC.

Em formas de realização particulares, há um ou mais fosfolípidos. Em certas formas de realização, esse ou mais fosfolípido inclui uma fosfatidilcolina. Em formas de realização particulares, estão incluídos um ou mais fosfolípidos e colesterol (ou um derivado de colesterol). Em certas formas de realização, o fosfolípido é uma

fosfatidilcolina e a composição adicionalmente inclui um colesterol (ou um derivado de colesterol). Em formas de realização particulares, a fosfatidilcolina é uma fosfatidilcolina que inclui uma fração de ácido gordo saturado (por exemplo, DMPC, DSPC ou DPPC). Em certas formas de realização a fosfatidilcolina é fosfatidilcolina sem ser de ovo. Em formas de realização particulares, a fosfatidilcolina não é HSPC.

Em formas de realização particulares, há dois lípidos neutros. Em algumas formas de realização, os dois lípidos neutros são colesterol (ou um derivado de colesterol) e uma fosfatidilcolina. Em formas de realização particulares, a fosfatidilcolina é uma fosfatidilcolina que inclui uma porção de ácido gordo saturado (por exemplo, DMPC, DSPC ou DPPC). Em certas formas de realização a fosfatidilcolina é fosfatidilcolina sem ser de ovo.

Os componentes lipídicos adicionais no presente documento descritos, e aqueles conhecidos pelos peritos na especialidade, são disponíveis comercialmente por vários fornecedores, incluindo, por exemplo, Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AK), Northern Lipid Inc. (Canadá), Lipoid GmbH (Alemanha), NOF Corporation (Japão), Nippon Fine Chemical Co., Ltd (Japão).

Fármacos

Diversos fármacos podem ser incluídos nas composições que contêm lípido descritas no presente documento, por exemplo, um composto ou um gene. Em certas formas de realização, o fármaco pode ser um agente anticâncer, por exemplo, um agente anticâncer adequado para encapsulação num lipossoma. A quantidade de fármaco a ser incluída nas composições que contêm lípido, e formulações destas, como no presente documento descritas, pode ser prontamente determinada pelos peritos na especialidade à luz dos ensinamentos no presente documento proporcionados e dependendo do fármaco selecionado e do utilização destinado

da composição ou formulação, levando-se em conta fatores específicos tanto para o fármaco quanto para o indivíduo a ser tratado, como no presente documento descrito posteriormente.

Em certas formas de realização, o fármaco pode ser um ácido nucleico, por exemplo, ácido nucleico que codifica sequências com propriedades anticâncer. Por exemplo, sem limitação, oligonucleótidos antissense, ribozimas, etc.

Em algumas formas de realização, o agente anticâncer pode ser um fármaco citotóxico, incluindo aqueles conhecidos pelos peritos na especialidade e por profissionais médicos. Agentes anticâncer exemplares incluem inibidores da topoisomerase I, alcaloides da vinca, agentes alquilantes (incluindo compostos de platina), taxanos e outros conhecidos pelos peritos na especialidade.

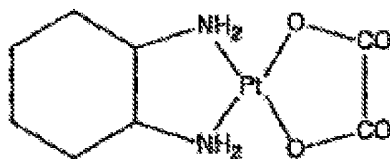
Em algumas formas de realização, o fármaco anticâncer pode ser um inibidor da topoisomerase I, por exemplo, sem limitação, topotecan, irinotecan, etc.

O fármaco anticâncer também pode ser um alcaloide da vinca, por exemplo, vincristina, vinblastina, vinleurosina, vinorelbina, vindesina, etc.

Além disso, o fármaco anticâncer também pode ser um composto de platina. Exemplos não limitantes de compostos de platina incluem biplatina, cisplatina, carboplatina, ormaplatina, oxaliplatina, zeniplatina, enloplatina, lobaplatina, espiroplatina, etc.

Oxaliplatina (platina (II) complexo cis-oxalato de trans-1-1,2-diaminociclohexano) é uma platina, mais especificamente, uma organoplatina, complexa que possui uma estrutura representada pela seguinte fórmula mostrada a seguir. Oxaliplatina também é conhecida da seguinte forma: diaminociclohexano platina, DACH-platina e cis-[(1R,2R)-1,2-ciclohexanodiamina-*N,N'*] [oxalato(2)-*O,O'*] platina ($C_8H_{14}N_2O_4Pt$; PM 397,4 g/mol). Como mencionado anteriormente, oxaliplatina é o ingrediente farmacêutico

ativo em Eloxatin™.



Oxaliplatina é útil como agente antitumoral, uma vez que tem uma atividade terapêutica similar à de cisplatina e relativamente baixa nefrotoxicidade e potencial emético (vômitos). Os processos de produção para oxaliplatina são bem conhecidos na técnica (por exemplo, documento JP-A-940685; Patentes US N° 4.169.846, 5.338.874, 5.959.133, 5.298.642 e 5.290.961. Oxaliplatina é ainda descrita em Chaney S.G. et al. "Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin ADN adducts" *Crit. Ver. Oncol. Hematol.* (2005) 53: 3-11.

Em certas formas de realização, a concentração de oxaliplatina encapsulada no lipossoma é de cerca de 1 mg/ml, por exemplo, cerca de 0,8 mg/ml.

Geralmente, a composição de lipossoma da presente invenção contém de cerca de 1 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 1 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido. Por exemplo, de cerca de 10 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de 10 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido.

Em certas formas de realização, as composições contêm de cerca de 1 a cerca de 45 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 40 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 35 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 30 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 25 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 20 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 15 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 10 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 5 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 5

a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 5 a cerca de 45 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 5 a cerca de 35 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 5 a cerca de 25 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 5 a cerca de 20 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 5 a cerca de 15 µg de oxaliplatina/mg de lípido, de cerca de 5 a cerca de 10 µg de oxaliplatina/mg de lípido, cerca de 1 µg de oxaliplatina/mg de lípido, cerca de 2 µg de oxaliplatina/mg de lípido, cerca de 4 µg de oxaliplatina/mg de lípido, cerca de 5 µg de oxaliplatina/mg de lípido, cerca de 10 µg de oxaliplatina/mg de lípido, cerca de 15 µg de oxaliplatina/mg de lípido, cerca de 20 µg de oxaliplatina/mg de lípido, cerca de 30 µg de oxaliplatina/mg de lípido, cerca de 40 µg de oxaliplatina/mg de lípido, ou cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido.

Em certas formas de realização, as composições contêm de cerca de 1 a cerca de 145 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 120 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 115 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 100 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 90 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 70 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 60 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 50 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 1 a cerca de 25 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 10 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 10 a cerca de 140 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 10 a cerca de 125 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 10 a cerca de 100 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 10 a cerca de 80 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 10 a cerca de 50 µg de TF/mg de lípido, de cerca de 10 a cerca de 25 µg de TF/mg de lípido, cerca de 1 µg de TF/mg de lípido, cerca de 5 µg de TF/mg de lípido, cerca de 10 µg de TF/mg de lípido, cerca de 25 µg de TF/mg de lípido, cerca de 40 µg

de TF/mg de lípido, cerca de 50 µg de TF/mg de lípido, cerca de 70 µg de TF/mg de lípido, cerca de 100 µg de TF/mg de lípido, cerca de 120 µg de TF/mg de lípido, cerca de 140 µg de TF/mg de lípido, ou cerca de 150 µg de TF/mg de lípido.

Em algumas formas de realização, de cerca de 0,5 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 1 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido. Em algumas formas de realização, de cerca de 5 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 10 a cerca de 100 µg/mg. Em certas formas de realização, de cerca de 2 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 5 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido; de cerca de 3 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 5 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido; de cerca de 4 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 5 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido; de cerca de 2 a cerca de 40 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 5 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido; de cerca de 3 a cerca de 40 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 5 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido; de cerca de 4 a cerca de 40 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 5 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido; de cerca de 2 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 10 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido; de cerca de 3 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 10 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido; de cerca de 4 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 10 a cerca de 150 µg de TF/mg de lípido; de cerca de 5 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 5 a cerca de 100 µg de TF/mg de lípido; de cerca de 5 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 5 a cerca de 100 µg de TF/mg de lípido; ou de cerca de 0,5 a cerca de 50 µg de oxaliplatina/mg de lípido e de cerca de 5 a cerca de 100 µg de TF/mg de lípido.

Em certas formas de realização, a concentração de oxaliplatina na formulação de lipossoma é de $0,8 \pm 10$ %mg/ml.

Em certas formas de realização nas quais o fármaco é oxaliplatina, a oxaliplatina pode ser dissolvida numa solução (por exemplo, oxaliplatina pode ser dissolvida em solução aquosa). Em algumas formas de realização, a solução inclui um açúcar (por exemplo, trehalose, maltose, sacarose, lactose, manose, manitol, glicerol, dextrose, frutose, etc.). A concentração do açúcar pode ser de vários percentuais. Por exemplo, concentrações de açúcar (v/v) de cerca de 0,1 a 12 %; 0,5 a 12 %, 1 % a 12 %, 2 % a 8 %, 2 % a 6 %, 2 % a 5 %, 2 % a 4 %, 2 % a 5 %, 2 % a 6 %, 2 % a 8 %, 2 % a 9 %, 2 % a 10 %, 4 % a 10 %, 4 % a 9 %, 4 % a 8 %, 4 % a 6 %, 3 % a 4 %, cerca de 2 %, cerca de 3 %, cerca de 4 %, cerca de 5 %, cerca de 6 %, cerca de 7 %, cerca de 8 %, cerca de 9 % ou cerca de 10 %. Em certas formas de realização, a solução inclui um açúcar e é aquosa. Espera-se que a solução na qual a oxaliplatina é dissolvida também possa conter componentes adicionais, incluindo aqueles conhecidos pelos peritos na especialidade.

Em certas formas de realização, a concentração de açúcar é de cerca de 5 %, cerca de 7 %, cerca de 8 %, cerca de 9 % ou cerca de 10 %. Em outras formas de realização, a concentração de açúcar é de cerca de 5 % a cerca de 10 %. Em algumas formas de realização, o açúcar é dextrose e a concentração de dextrose na solução de oxaliplatina é de cerca de 5 %. Em algumas formas de realização, o açúcar é dextrose e a concentração de dextrose na solução de oxaliplatina é de cerca de 9 %. Em certas formas de realização, o açúcar é sacarose e a concentração de sacarose na solução de oxaliplatina é de cerca de 9 %. Em certas formas de realização, o açúcar é sacarose e a concentração de sacarose na solução de oxaliplatina é de cerca de 10 %.

Em algumas formas de realização, a concentração de açúcar em solução pode ser, por exemplo, de cerca de 50 mg/ml a cerca de 150 mg/ml, de cerca de 50 mg/ml a cerca de 130 mg/ml, de cerca de 50 mg/ml a cerca de 120 mg/ml, de cerca de 50 mg/ml a cerca de 100 mg/ml, de cerca de 80 mg/ml a cerca de 100 mg/ml, de cerca de 90 mg/ml a cerca de 150 mg/ml, de cerca de 90 mg/ml a cerca de 130 mg/ml, cerca de 60 mg/ml, cerca de 80 mg/ml, cerca de 90 mg/ml, cerca de 100 mg/ml, cerca de 110 mg/ml, cerca de 105 mg/ml, cerca de 120 mg/ml ou cerca de 140 mg/ml.

A solução também pode conter outros ingredientes conhecidos pelos peritos na especialidade, tais como, sem limitação, sais, tampões, álcool de açúcar, etc. Em certas formas de realização, a solução na qual a oxaliplatina é dissolvida contém fosfato de sódio (por exemplo, fosfato monobásico e/ou dibásico de sódio).

Em certas formas de realização, a concentração de fosfato de sódio pode ser de cerca de 5 a cerca de 15 mM. Por exemplo, de cerca de 5 a cerca de 12 mM, de cerca de 5 a cerca de 10 mM, de cerca de 5 a cerca de 7 mM, de cerca de 7 a cerca de 12 mM, de cerca de 7 a cerca de 15 mM, de cerca de 9 a cerca de 12 mM, cerca de 5 mM, cerca de 7 mM, cerca de 10 mM, cerca de 12 mM ou cerca de 15 mM.

Em certas formas de realização, a solução de açúcar pode incluir adicionalmente cerca de 1,0 a cerca de 1,5 mg/ml de fosfato de sódio. Por exemplo, cerca de 1,2 a cerca de 1,5 mg/ml, 1,0 a cerca de 1,7 mg/ml, 1,0 a cerca de 2 mg/ml, 1,0 a cerca de 2,5 mg/ml, 1,0 a cerca de 3 mg/ml, 0,5 a cerca de 3,5 mg/ml de fosfato de sódio.

Em algumas formas de realização, o pH da solução será de cerca de 6,5 a cerca de 7,5, de cerca de 6,7 a cerca de 7,5, de cerca de 7 a cerca de 7,5, cerca de 7, cerca de 7,5, cerca de 6,8 ou cerca de 6,5.

Em algumas formas de realização, o fármaco é oxaliplatina e está contido numa solução de cerca de 9 % de

sacarose. Em algumas formas de realização, o fármaco é oxaliplatina e esta contido numa solução de cerca de 9 % de sacarose numa concentração de oxaliplatina de cerca de 1 mg/ml. Em algumas formas de realização, o fármaco é oxaliplatina e está contido numa solução de cerca de 105 mg/ml de sacarose. Em algumas formas de realização, o fármaco é oxaliplatina e está contido numa solução de cerca de 105 mg/ml de sacarose numa concentração de oxaliplatina em solução de lipossoma de cerca de 1 mg/ml. Em algumas dessas formas de realização, a solução ainda contém fosfato de sódio. Em certas formas de realização, a oxaliplatina está numa concentração de cerca de $0,8 \pm 10$ % mg/ml de solução de lipossoma.

Compostos marcados

Diversos compostos marcados também podem ser incluídos nas composições que contêm lípido da presente invenção. Geralmente, o composto marcado pode ser um agente útil para a realização de procedimentos diagnósticos *in vivo*.

Como ocorre com a incorporação e a utilização de fármacos no presente documento descritos, a quantidade de composto marcado a ser incluída nas composições que contêm lípidos, e formulações destas, como no presente documento descritas, pode ser facilmente determinada pelos peritos na especialidade à luz dos ensinamentos no presente documento proporcionados e dependendo do composto marcado selecionado e do utilização destinado da composição ou formulação, levando-se em conta fatores específicos tanto para o composto marcado quanto para o indivíduo a ser diagnosticado, como descrito mais pormenorizadamente posteriormente.

Compostos marcados exemplares incluem, por exemplo, materiais que compreendem radioisótopos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{67}Ga , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , etc.), material que compreende frações fluorescentes (por exemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, etc.),

material que compreende enzima (por exemplo, peroxidase, fosfatase alcalina, etc.), além de compostos marcados adicionais conhecidos pelos peritos na especialidade.

Como será observado pelos peritos na especialidade, a seleção do composto marcado e dos métodos usados em diagnóstico dependerá do órgão (por exemplo, fígado, pâncreas, próstata, etc.), tecido (por exemplo, maligno ou não maligno ou tipo de tecido (por exemplo, mama, etc.)) a ser investigado. Por exemplo, composições que contêm lípido (por exemplo, lipossomas direcionados, composições que contêm lipossoma, etc.) que incorporam ¹²⁵I são particularmente úteis para a identificação da presença e determinação da gravidade (por exemplo, inicialmente, durante o curso do tratamento, após tratamento) de vários cânceros (por exemplo, cancro de mama, cancro gástrico, cancro colorretal, cancro de cólon, etc.) por contador gama.

Fatores de Direcionamento

A não ser que indicado de outro modo, os termos "fator de direcionamento" e "ligando de direcionamento" podem ser no presente documento usados de forma intercambiável.

As composições que contêm lípido no presente documento descritas são caracterizadas pela incorporação de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada com um fator de direcionamento (ou seja, TF-N ω TE) direcionada a uma célula alvo em particular. O termo "fator de direcionamento" refere-se a uma porção que pode se ligar a um recetor ou um antigénio de superfície presente na superfície de uma célula alvo. Em certas formas de realização, os fatores de direcionamento são dirigidos aos recetores da superfície celular numa célula alvo em particular. O fator de direcionamento é frequentemente uma proteína ou um peptídeo que pode ser anexado a um componente lipídico da composição que contém lípido.

Mais eficazmente, os fatores de direcionamento são selecionados de forma que o recetor direcionado ou antigénio esteja presente somente em células que são direcionadas para a libertação do fármaco ou composto marcado (por exemplo, células patogénicas) e que não estão presentes em células saudáveis. Alternativamente, um número maior de recetores ou antigénios é expresso nas células alvo (por exemplo, células patogénicas ou doentes) comparado com células não direcionadas (por exemplo, saudáveis). De preferência, o recetor ou antigénio que se liga ao fator de direcionamento não está presente ou está presente em números baixos em células saudáveis, de tal forma que a ligação com o fator de direcionamento não ocorra com frequência. Em outras palavras, os fatores de direcionamento devem libertar seletivamente os lipossomas no presente documento descritos (incluindo fármaco encapsulado) às células direcionadas (por exemplo, células patogénicas, não saudáveis, etc.). Dessa forma, a libertação seletiva do fármaco encapsulado às células direcionadas reduz a ocorrência de efeitos adversos causados pelo efeito do fármaco encapsulado ou do composto marcado sobre células não alvo (por exemplo, saudáveis), reduzindo também, desse modo, os efeitos adversos apresentados pelo indivíduo ao qual a composição, ou formulação desta, é administrada.

Os fatores de direcionamento exemplares incluem, sem limitação, transferrina, ácido fólico, folato, ácido hialurónico, cadeias de açúcar (por exemplo, galactose, manose, etc.), fragmentos de anticorpos monoclonais, asialoglicoproteína, etc., além de outros fatores de direcionamento conhecidos pelos peritos na especialidade.

Em formas de realização particulares, o fator de direcionamento é uma proteína ou um peptídeo dirigido a um recetor da superfície celular (por exemplo, transferrina, folato, ácido fólico, asialoglicoproteína, etc.).

Em outras formas de realização, o fator de direcionamento é dirigido a um antigénio (por exemplo, fragmentos de anticorpos monoclonais (por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, etc.)). Não há a intenção de que fatores de direcionamento incluam anticorpos monoclonais intatos ou inteiros. O termo "anticorpo inteiro ou "anticorpo intato", e cognatos deste, como é usado no presente documento, geralmente referem-se ao anticorpo IgG de globulina imune. Um fragmento de um anticorpo monoclonal geralmente se refere a um produto de decomposição do anticorpo monoclonal, por exemplo, um fragmento obtido com a utilização de digestão por protease como, por exemplo, pepsina, etc.

Em certas formas de realização, o fator de direcionamento não é dirigido a um antigénio (por exemplo, não é um fragmento de um anticorpo monoclonal, por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, etc.).

Em certas formas de realização, o fator de direcionamento é transferrina.

Transferrina (Tf) é uma proteína de ligação de ferro com um peso molecular de 80.000, que é sintetizada em hepatócitos e encontrada no sangue. Transferrina proporciona ferro (Fe) às células através de recetores de Tf na superfície de cada célula. O recetor de transferrina é geralmente expresso em tecidos tumorais numa maior quantidade, comparado com tecidos normais, independentemente dos tipos dos tumores. As membranas celulares tumorais são conhecidas por sobreexpressarem recetores de transferrina para manter a proliferação celular. Veja-se Shindelman J.E., Ortmeyer A.E., Sussman H.H. *"Demonstration of the transferrin recetor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells"* int. J. Cancer. (1981) 27 (3): 329-34; Lloyd J.M., O'Dowd T., Driver M., Tee D.E. *"Demonstration of an epitope of the transferrin recetor in human cervical*

epithelium—a potentially useful cell marker" *J. Clin. Pathol.* (1984) 37(2): 131-5; e Habeshaw J.A., Lister T.A., Stansfeld A.G., Greaves M.F. "Correlation of transferrin recetor expression with histological class and outcome in non- Hodgkin lymphoma" *Lancet.* (1983) 1(8323): 498-501. A ligação dos agentes terapêuticos à transferrina irá, portanto, aumentar a captação do fármaco nas células tumorais através do recetor de transferrina. Sem se limitar a um mecanismo de ação, a via provável de captação dos lipossomas de transferrina no presente documento descritos é representada esquematicamente nas Figuras 2 e 3. Transferrina é disponível comercialmente ou pode ser produzida de forma recombinante como descrito, por exemplo, na Patente US N° 5.026.651.

Sem se ater a uma teoria, acredita-se que a conjugação de transferrina (Tf) à NwPE ocorra pela reação de uma amina primária com a NwPE, o que resulta na formação de uma ligação amida de ácido carboxílico entre a âncora de lípido e a proteína.

Em certas formas de realização, a proporção molar de Tf em relação ao lípido total presente no produto de lipossoma direcionado é de aproximadamente 0,00014:1 mol/mol (Tf:lípido total) (0,015; p/p). Em outras formas de realização, a proporção molar de Tf: lípido total é de cerca de 0,016 a cerca de 0,029: cerca de 126 cerca de 158 mM/mM.

Composições que Contêm Lípido

As composições que contêm lípido no presente documento descritas incluem lipossomas direcionados que incorporam lípidos derivatizados, lípidos adicionais e fármaco encapsulado ou composto marcado, além de intermediários usados para preparar os lipossomas direcionados, incluindo misturas de lípidos s composições que contêm lipossoma, como no presente documento descritas, em que as composições que contêm lípido (incluindo lipossomas direcionados) não

possuem fosfatidil etanolamina não derivatizada nem polímeros hidrofílicos, tais como, sem limitação, polietileno glicol. As composições que contêm lípido também incluem lipossomas que incorporam uma TF, mas não incluem um fármaco ou composto marcado (por exemplo, lipossomas em branco).

Como é usado no presente documento, o termo "polímero hidrofílico", e cognatos deste, referem-se aos polímeros como, por exemplo, polietileno glicol (PEG), e a outros polímeros polietoxilados que são usados no campo dos lipossomas para proteger lipossomas numa tentativa de aumentar a semivida circulatória do lipossoma. Espera-se que esse termo abranja polímeros hidrofílicos livres associados de forma não covalente aos lipossomas, além de polímeros hidrofílicos que estão de alguma forma conjugados ou ligados covalentemente a um componente particular do lipossoma (por exemplo, lípidos modificados por PEG, etc.). Tais polímeros hidrofílicos também são alternativamente citados na técnica como polímeros "hidrossolúveis". Polímeros hidrofílicos exemplares adicionais incluem, sem limitação, álcool polivinílico, ácido polilático, ácido poliglicólico, polivinilpirrolidona, poliacrilamida, poliglicerol, poliaxozlinas, etc.

Como é usado no presente documento, o termo "mistura lipídica", e cognatos deste, referem-se às misturas de componentes lipídicos no presente documento descritos, em que a mistura lipídica não incorpora solução, por exemplo, solução aquosa (por exemplo, água, tampão ou uma mistura de água e um solvente miscível na água (por exemplo, açúcar (por exemplo, trehalose, sacarose, lactose, manose, dextrose, frutose, etc.), álcool de açúcar (por exemplo, sorbitol, maltitol, lactitol, glicerol, manitol, etc.), álcool (por exemplo, etanol, t-butanol, etc.), etc.)) ou solvente orgânico.

O termo "composição que contém lipossoma", e cognatos

deste, referem-se às misturas de lípidos e, opcionalmente, fármaco(s) ou composto(s) marcado(s), nas quais uma solução aquosa (por exemplo, água, tampão (por exemplo, tampão de acetato, tampão de fosfato, tampão de citrato, tampão de borato, tampão de tartarato, etc.) ou uma mistura de água e um solvente miscível na água) foi incorporada por mistura por exemplo, um ou mais de agitação, turbilhonamento, etc.). A solução aquosa também pode incluir componentes adicionais, tais como um ou mais açúcares (por exemplo, trehalose, maltose, sacarose, lactose, manose, dextrose, frutose, etc.), álcool de açúcar (por exemplo, sorbitol, maltitol, lactitol, manitol, glicerol, etc.), álcool (por exemplo, etanol, t-butanol, etc.), etc. A solução aquosa também pode incluir solvente orgânico ((por exemplo, ésteres (por exemplo, acetato de etilo, acetato de butilo, etc.), hidrocarbonetos alifáticos (por exemplo, hexano, heptano, etc.), hidrocarbonetos aromáticos (por exemplo, tolueno, xileno, etc.), hidrocarbonetos halogenados (por exemplo, clorofórmio, diclorometano, dicloroetano, etc.), éteres (por exemplo, THF, dioxano, éter dietílico, éter isopropílico, etc.), hidrocarbonetos cíclicos (por exemplo, ciclohexano, etc.), DMF, DMSO, etc.) ou misturas destes). A composição que contém lipossoma conterá geralmente uma mistura não homogênea de lípidos, solução aquosa e lipossomas com uma ampla distribuição em torno de 100 a 10.000 nm e um diâmetro médio de 500 a 2.000 nm. A caracterização de composições que contém lipossoma exemplares será apresentada nos Exemplos.

Em certas formas de realização, as composições que contém lípido não incorporam polímeros hidrofílicos. Em formas de realização particulares, as composições que contém lípido não incorporam PEG.

Em algumas formas de realização, as misturas de lípidos intermediárias incluem pelo menos dois lípidos neutros diferentes ou um ou mais fosfolípidos, e uma

fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, em que os componentes lipídicos são no presente documento descritos mais pormenorizadamente e em que a mistura não possui fosfatidil etanolamina não-derivada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polietileno glicol. Opcionalmente, uma solução aquosa no presente documento descrita pode ser misturada com os componentes lipídicos para formar uma composição que contém lipossoma. Em certas formas de realização, a mistura lipídica não inclui um fármaco ou composto marcado. Em formas de realização particulares, a mistura lipídica pode ser tratada para formar uma composição que contém lipossoma ou uma formulação de lipossoma.

Em algumas formas de realização, as misturas de lípidos intermediárias incluem pelo menos dois lípidos neutros diferentes ou um ou mais fosfolípidos, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e um fármaco ou composto marcado, em que os componentes lipídicos e fármaco/composto marcado são no presente documento descritos mais pormenorizadamente e em que a mistura não possui fosfatidil etanolamina não-derivatizada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polietileno glicol. Opcionalmente, uma solução aquosa no presente documento descrita pode ser misturada com os componentes lipídicos para formar uma composição que contém lipossoma, por exemplo, em que o fármaco ou composto marcado é adicionado como uma solução aquosa de fármaco/composto marcado. Em certas formas de realização, a composição que contém lipossoma pode ser tratada (por exemplo, por um ou mais de extrusão, cromatografia por exclusão de tamanho, etc. ou métodos conhecidos na técnica) para formar um lipossoma.

Em algumas formas de realização, as misturas de lípidos incluem um ou mais fosfolípidos, ou pelo menos dois lípidos neutros diferentes, uma fosfatidil etanolamina

derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, em que os componentes lipídicos são no presente documento descritos mais pormenorizadamente e em que a mistura não possui fosfatidil etanolamina não derivatizada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polietileno glicol. As misturas também podem ser substancialmente livres de material de partida diferente de NHS, subproduto e/ou produto de decomposição associado à síntese do éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico (por exemplo, carbodiimidas (por exemplo, DCC, EDC, etc.), compostos de ureia acilada, etc.). Opcionalmente, uma solução aquosa no presente documento descrita pode ser misturada com os componentes lipídicos para formar uma composição que contém lipossoma.

Em algumas formas de realização, as misturas de lípidos intermediárias incluem um ou mais fosfolípidos, ou pelo menos dois lípidos neutros diferentes, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, em que os componentes lipídicos são no presente documento descritos mais pormenorizadamente e em que a mistura não possui fosfatidil etanolamina não derivatizada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polietileno glicol. As misturas também podem ser substancialmente livres de material de partida diferente de NHS, subproduto e/ou produto de decomposição associado à síntese do éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico (por exemplo, carbodiimidas (por exemplo, DCC, EDC, etc.), compostos de ureia acilada, etc.). Opcionalmente, uma solução aquosa no presente documento descrita pode ser misturada com os componentes lipídicos para formar uma composição que contém lipossoma.

Em algumas formas de realização, a mistura lipídica não inclui um fármaco ou composto marcado. A mistura lipídica pode ser tratada para formar uma composição que contém lipossoma ou uma formulação de lipossoma.

Em algumas formas de realização, as misturas de lípidos intermediárias incluem um ou mais fosfolípidos, ou pelo menos dois lípidos neutros diferentes, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e um fármaco ou composto marcado, em que os componentes de lípido e fármaco/composto marcado são no presente documento escritos mais pormenorizadamente e em que a composição não possui fosfatidil etanolamina não derivatizada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polietileno glicol. As misturas também podem ser substancialmente livres de material de partida diferente de NHS, subproduto e/ou produto de decomposição associado à síntese do éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico (por exemplo, carbodiimidas (por exemplo, DCC, EDC, etc.), compostos de ureia acilada, etc.). Opcionalmente, uma solução aquosa no presente documento descrita pode ser misturada com os componentes lipídicos para formar uma composição que contém lipossoma.

Em certas formas de realização, as composições intermediárias que contêm lípido incluem um lipossoma que contém um ou mais fosfolípidos, ou pelo menos dois lípidos neutros diferentes, uma fosfatidil etanolamina derivada de ácido-N-(ω)-dicarboxílico e um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e um fármaco encapsulado, em que os componentes de lípido e de fármaco são no presente documento descritos mais pormenorizadamente e em que o lipossoma não possui fosfatidil etanolamina não derivatizada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo,

polietileno glicol. Os lipossomas também podem ser substancialmente livres de material de partida diferente de NHS, subproduto e/ou produto de decomposição associado à síntese do éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico (por exemplo, carbodiimidas (por exemplo, DCC, EDC, etc.), compostos de ureia acilada, etc.). Em algumas formas de realização, a mistura lipídica não inclui um fármaco ou composto marcado. A mistura lipídica pode ser tratada para formar uma composição que contém lipossoma ou uma formulação de lipossoma.

Em certas formas de realização, as misturas de lípidos incluem um ou mais fosfolípidos, ou pelo menos dois lípidos neutros diferentes, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e um fármaco encapsulado ou composto marcado, em que o lípido, fator de direcionamento e fármaco/composto marcado componentes são no presente documento descritos mais pormenorizadamente e em que o lipossoma não possui fosfatidil etanolamina não derivatizada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polietileno glicol. Em algumas formas de realização das misturas de lípidos, os lipossomas são substancialmente livres de material de partida diferente de NHS, subproduto ou produtos de decomposição associados à síntese do éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico (por exemplo, carbodiimidas (por exemplo, DCC, EDC, etc.), compostos de ureia acilada, etc.). Em formas de realização particulares, a mistura lipídica é uma composição que contém lipossoma (por exemplo, em que o fármaco ou composto marcado é adicionado como uma solução aquosa). Opcionalmente, uma solução aquosa no presente documento descrita pode ser misturada com os componentes lipídicos para formar uma composição que contém

lipossoma.

Em certas formas de realização, os lipossomas direcionados incluem lipossomas que contêm um ou mais fosfolípidos, ou pelo menos dois lípidos neutros diferentes, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento e um fármaco encapsulado ou composto marcado, em que os componentes de lípido, fator de direcionamento e fármaco ou composto marcado são no presente documento descritos mais pormenorizadamente e em que o lipossoma não possui fosfatidil etanolamina não derivatizada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polietileno glicol. Em algumas formas de realização dos lipossomas direcionados, os lipossomas são substancialmente livres de material de partida diferente de NHS, subproduto ou produtos de decomposição associados à síntese do éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico (por exemplo, carbodiimidas (por exemplo, DCC, EDC, etc.), compostos de ureia acilada, etc.). No entanto, em algumas formas de realização, o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico pode estar presente nos estágios iniciais da preparação dos lipossomas direcionados (por exemplo, NHS-NG-PEs (por exemplo, NHS-NG-DOPE, NHSNG-DSPE, etc.)), por exemplo, antes da hidrólise do éster succinimidílico que pode gerar, por exemplo, NHS e NG-DOPE na formulação final. Em certas formas de realização, nas quais SuccN ω PE não é incorporada no interior do lipossoma, o lipossoma ou a composição que contém lipossoma também pode ser livre ou substancialmente livre de NHS, como quando TF-N ω PE é preformada e usada como material de partida. Em formas de realização particulares, os lipossomas alvo são substancialmente livres de DCC e EDC. Em certas formas de realização, os lipossomas direcionados

menos do que cerca de 5 % ou menos do que cerca de 6 % por peso de um material de partida, subproduto ou produto de decomposição associado à síntese do éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico em particular em relação ao teor total de lípidos. Em formas de realização particulares, as composições conterão menos do que cerca de 10 %, menos do que cerca de 7 %, menos do que cerca de 5 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 % ou menos do que cerca de 1 % de impurezas totais (por exemplo, % da soma de material de partida, subproduto e produto de decomposição associado à síntese do éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico).

Em algumas formas de realização, os lipossomas direcionados incluem lipossomas que contêm uma fosfatidilcolina (por exemplo, neutra, aniônica ou catiônica), colesterol ou um derivado de colesterol, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento e um fármaco encapsulado ou composto marcado, em que os componentes de lípido, fator de direcionamento e fármaco são no presente documento descritos mais pormenorizadamente e em que o lipossoma não possui fosfatidil etanolamina não derivatizada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polietileno glicol. Em formas de realização particulares, a fosfatidilcolina e uma fosfatidilcolina neutra.

Em formas de realização particulares, os lipossomas direcionados incluem lipossomas que contêm uma fosfatidilcolina (por exemplo, neutra, aniônica ou catiônica), colesterol ou um derivado de colesterol, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de

ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por transferrina e fármaco encapsulado ou composto marcado, em que os componentes de lípido e de fármaco ou composto marcado são no presente documento descritos mais pormenorizadamente e em que o lipossoma não possui fosfatidil etanolamina não derivatizada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polietileno glicol. Em formas de realização particulares, a fosfatidilcolina é uma fosfatidilcolina neutra.

Em formas de realização particulares, os lipossomas direcionados incluem lipossomas que contêm uma fosfatidilcolina (por exemplo, neutra, aniónica ou catiónica), colesterol ou um derivado de colesterol, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por transferrina e oxaliplatina encapsulada, em que os componentes lipídicos são no presente documento descritos mais pormenorizadamente e em que o lipossoma não possui fosfatidil etanolamina não derivatizada nem polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polietileno glicol. Em formas de realização particulares, a fosfatidilcolina é uma fosfatidilcolina neutra.

Em certas formas de realização, as composições que contêm lípido (incluindo lipossomas direcionados e lipossomas em branco) no presente documento descritas, e formulações destas, podem ainda conter lípidos obtidos por derivatização de fosfatidilglicerol, esfingosina, ceramida, um derivado de colesterol ou semelhante, com um ácido dicarboxílico. Esses derivados de ácido dicarboxílico podem ser preparados como no presente documento descrito para as fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico e de acordo com métodos de preparação conhecidos pelos peritos na especialidade.

Em algumas formas de realização, as composições contendo lípido (incluindo lipossomas direcionados e lipossomas em branco) no presente documento descritas, e

formulações destas, não incluem lípidos aniônicos (por exemplo, fosfatidilserinas, fosfatidilinositosóis, fosfatidilgliceróis, etc.) ou lípidos catiónicos (por exemplo, esfingosina, DOTAP, DOTMA, DC-CHOL, etc.). Em formas de realização particulares, as composições não possuem lípidos aniônicos. Em outras formas de realização, as composições não possuem lípidos catiónicos. Em certas formas de realização, as composições não possuem lípidos catiónicos e aniônicos.

Em algumas formas de realização das composições contendo lípido, a composição compreende um fármaco. Em outras formas de realização, as composições que contêm lípido compreendem um composto marcado.

Em certas formas de realização das composições contendo lípido, o fármaco é oxaliplatina, o fator de direcionamento (TF) é transferrina (Tf) e os componentes lipídicos incluem: DMPC ou DSPC e colesterol ou um derivado de colesterol, e uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por transferrina, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por transferrina compreende uma transferrina ligada a uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico por uma ligação amida de ácido carboxílico.

Em algumas formas de realização, a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico e a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento são NG-DOPE ou NG-DSPE.

Em formas de realização particulares, os componentes lipídicos das composições que contêm lípido são DMPC, colesterol, NG-DOPE e NG-DOPE modificada por TF. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos são DSPC, colesterol, NG-DOPE e NG-DOPE modificada por TF. Ainda em

outras formas de realização, os componentes lipídicos são DMPC, colesterol, NG-DSPE e NG-DSPE modificada por TF. Em algumas outras formas de realização, os componentes lipídicos são DSPC, colesterol, NG-DSPE e NG-DSPE modificada por TF. Em algumas dessas formas de realização, o fator de direcionamento (TF) é transferrina e o fármaco é oxaliplatina.

Em formas de realização particulares, os componentes lipídicos são DPPC, colesterol, NG-DOPE e NG-DOPE modificada por TF. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos são POPC, colesterol, NG-DOPE e NG-DOPE modificada por TF. Ainda em outras formas de realização, os componentes lipídicos são DPPC, colesterol, NG-DSPE e NG-DSPE modificada por TF. Em algumas outras formas de realização, os componentes lipídicos são POPC, colesterol, NG-DSPE e NG-DSPE modificada por TF. Em algumas dessas formas de realização, o fator de direcionamento (TF) é transferrina e o fármaco é oxaliplatina.

Em formas de realização particulares, os componentes lipídicos são HSPC, colesterol, NG-DOPE e NG-DOPE modificada por TF. Em outras formas de realização, os componentes lipídicos são EPC, colesterol, NG-DOPE e NG-DOPE modificada por TF. Ainda em outras formas de realização, os componentes lipídicos são HSPC, colesterol, NG-DSPE e NG-DSPE modificada por TF. Em algumas outras formas de realização, os componentes lipídicos são EPC, colesterol, NG-DSPE e NG-DSPE modificada por TF. Em algumas dessas formas de realização, o fator de direcionamento (TF) é transferrina e o fármaco é oxaliplatina.

Razões de Componentes Lipídicos

Geralmente, o percentual molar de materiais de partida NG-DOPE será entre cerca de 2,5 mol% a cerca de 4,5 mol%, comparado com o teor total de lípidos. Adicionalmente, o percentual molar de materiais de partida NHS-NG-DOPE será entre cerca de 0,5 mol% a cerca de 2,5 mol%, comparado com

o teor total de lípidos. Em algumas formas de realização, a proporção molar relativa de NG-DOPE para NHS-NG-DOPE será de cerca de 3,4:1. Em certas formas de realização, a proporção molar percentual relativa de NG-DOPE para NHS-NG-DOPE pode ser de cerca de 4:1. Em formas de realização particulares nas quais um fosfolípido neutro e um lípido neutro estão presentes, a proporção molar de (por exemplo, DMPC:Col:NG-DOPE:NHS-NG-DOPE) pode ser 43,0:38,5:3,42:1, o que também pode ser expresso como 50:45:4:1 por mol%.

Em certas formas de realização, o percentual molar relativo de lípidos adicionais para NωPE para SuccNωPE (por exemplo, pelo menos dois lípidos neutros: NωPE:SuccNωPE ou um ou mais fosfolípidos: NωPE:SuccNωTE ou (um ou mais fosfolípidos + lípidos(s) neutro(s)): NωPE:SuccNωPE) pode ser de cerca de 98 mol% a cerca de 87 mol% de lípidos adicionais: de cerca de 1 mol% a cerca de 12 mol% de NωPE:cerca de 0,5 mol% a cerca de 1 % de SuccNωPE; em que o mol% total de todos os componentes é 100 mol%. Por exemplo, lípidos adicionais:NωPE:SuccNωPE pode ser aproximadamente 95:4:1, 90:9:1, 92:7:1, 93:6:1, etc.

Em formas de realização particulares nas quais os lípidos adicionais incluem um fosfolípido e outro lípido como colesterol, derivados de colesterol, etc., o intervalo de mol% para cada componente lipídico é de cerca de 30 mol% a cerca de 64 %, em que o total de lípidos adicionais é de cerca de 98 mol% a cerca de 87 mol%.

Em certas formas de realização nas quais os lípidos adicionais são dois lípidos neutros diferentes, o intervalo de mol% para cada lípido neutro é de cerca de 30 mol% a cerca de 64 %, em que o total de lípidos neutros é de cerca de 98 mol% a cerca de 87 mol%.

Numa forma de realização exemplar na qual um lípido adicional é uma fosfatidilcolina e um segundo lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol, o mol% da fosfatidilcolina é de cerca de 30 a cerca de 70 mol%,

(por exemplo, de cerca de 50 a cerca de 64 mol%, de cerca de 40 a cerca de 65 mol%, de cerca de 40 a cerca de 60 mol%, de cerca de 50 a cerca de 62 mol%, de cerca de 55 a cerca de 60 mol%, de cerca de 35 a cerca de 55 mol%, cerca de 30 mol%, cerca de 40 mol%, cerca de 45 mol%, cerca de 50 mol%, cerca de 55 mol%, cerca de 60 mol%, cerca de 65 mol%, cerca de 70 mol%) e o mol% do colesterol ou derivado de colesterol é de cerca de 30 a cerca de 60 mol% (por exemplo, de cerca de 32 a cerca de 45 mol%, de cerca de 32 a cerca de 42 mol%, de cerca de 32 a cerca de 40 mol%, de cerca de 40 a cerca de 60 mol%, de cerca de 35 a cerca de 55 mol%, de cerca de 35 a cerca de 60 mol%, de cerca de 45 a cerca de 60 mol%, de cerca de 35 a cerca de 45 mol%, cerca de 30 mol%, cerca de 35 mol%, cerca de 40 mol%, cerca de 45 mol%, cerca de 50 mol%, cerca de 55 mol% ou cerca de 60 mol%). Em algumas formas de realização, a fosfatidilcolina é de cerca de 50 mol%, cerca de 52 mol%, cerca de 55 mol%, cerca de 58 mol%, cerca de 60 mol%, cerca de 62 mol% e o colesterol ou os derivados de colesterol são de cerca de 30 mol%, cerca de 32 mol%, cerca de 34 mol%, cerca de 35 mol%, cerca de 37 mol%, cerca de 38 mol%, cerca de 40 mol%, cerca de 42 mol%, cerca de 43 mol%, cerca de 45 mol%.

Em formas de realização particulares, o mol% de NwTE é de cerca de 1 a cerca de 11 mol%, cerca de 1 a cerca de 10 mol%, cerca de 1 a cerca de 8 mol%, cerca de 1 a cerca de 6 mol%, cerca de 1 a cerca de 5 mol%, cerca de 1 a cerca de 4 mol%, cerca de 1 a cerca de 3 mol%, cerca de 1 a cerca de 2 mol%, cerca de 2 a cerca de 10 mol%, cerca de 2 a cerca de 5 mol%, cerca de 1 mol%, cerca de 2 mol%, cerca de 3 mol%, cerca de 4 mol%, cerca de 5 mol%, cerca de 7 mol%, cerca de 8 mol%, cerca de 9 mol%, cerca de 10 mol%, cerca de 11 mol% ou cerca de 12 mol%.

Em certas formas de realização, o percentual molar relativo do primeiro lípido adicional:segundo lípido

adicional:NwPE:SuccNwPE é, por exemplo, 50:45:4:1. Em algumas formas de realização, o primeiro lípido adicional é uma fosfatidilcolina (por exemplo, DMPC, DOPC, DPPC, DSPC, etc.) e o segundo lípido adicional é colesterol. Em algumas formas de realização, a PE da NwPE é DOPE ou DSPE. Em formas de realização particulares, a NwPE é NG-DOPE ou NG-DSPE. Em algumas formas de realização, os lípidos são DMPC:Col:NG-DOPE:NHSNG-DOPE e sua mol% relativa é 50:45:4:1. Em outras formas de realização, os lípidos são DSPC:Col:NG-DSPE:NHS-NG-DSPE e sua mol% relativa é 50:45:4:1. Em outras formas de realização, os lípidos são DSPC:Col:NG-DSPE:NHS-NG-DSPE e sua mol% relativa é 62:33:4:1.

Em algumas formas de realização, a mol% total de NwPE e TF- NwPE (NwPE + TF-NwPE) é de cerca de 2 a cerca de 13 mol% de teor total de lípidos. Por exemplo, cerca de 2 a cerca de 12 mol%, cerca de 2 a cerca de 10 mol%, cerca de 2 a cerca de 8 mol%, cerca de 2 a cerca de 6 mol%, cerca de 2 a cerca de 4 mol%, cerca de 2 mol%, cerca de 3 mol%, cerca de 4 mol%, cerca de 5 mol%, cerca de 6 mol%, cerca de 7 mol%, cerca de 8 mol%, cerca de 9 mol%, cerca de 10 mol%, cerca de 11 mol% ou cerca de 12 mol%.

Geralmente, a mol% total de TF-NwPE é de cerca de 0,002 a cerca de 0,2 mol% em relação ao teor total de lípidos. Por exemplo, em algumas formas de realização, a mol% total de TF-NwPE é de cerca de 0,002 a cerca de 0,15 mol%, a mol% total de TF-NwPE é de cerca de 0,002 a cerca de 0,1 mol%, 0,002 a cerca de 0,05 mol%, cerca de 0,01 a cerca de 0,03 mol%, cerca de 0,005 a cerca de 0,2 mol%, cerca de 0,007 a cerca de 0,2 mol%, cerca de 0,007 a cerca de 0,05 mol%, cerca de 0,01 a cerca de 0,025 mol%, cerca de 0,015 a cerca de 0,025 mol%, cerca de 0,01 a cerca de 0,2 mol%, cerca de 0,02 a cerca de 0,2 mol%, cerca de 0,04 a cerca de 0,2 mol%, cerca de 0,06 a cerca de 0,2 mol%, cerca de 0,08 a cerca de 0,2 mol%, cerca de 0,002 mol%, cerca de

0,008 mol%, cerca de 0,01 mol%, cerca de 0,02 mol%, cerca de 0,03 mol%, cerca de 0,025 mol%, cerca de 0,015 mol%, cerca de 0,06 mol%, cerca de 0,08 mol%, cerca de 0,1 mol%, cerca de 0,15 mol% ou cerca de 0,2 mol%.

Caraterização de Lipossomas e Composições que Contêm Lipossoma

Além de caraterizar as composições que contêm lípido pelas razões de componentes (por exemplo, razões de lípidos, razão de fármaco/composto marcado em relação ao lípido, etc.), as composições que contêm lipossoma no presente documento descritas também podem ser caraterizadas (por exemplo, propriedades físico-químicas, etc.) com a utilização de métodos analíticos padronizados, como será conhecido pelos peritos na especialidade. Tais métodos analíticos incluem, sem limitação, e quando apropriado, a determinação do diâmetro médio, volume encapsulado, carga líquida (potencial zeta), quantidade de fármaco capturada (ou seja, encapsulada), tamanho de partícula, estabilidade sob várias condições (por exemplo, em armazenamento, como preparada para administração, *in vitro*), propriedades osmóticas, quantidade de fator de direcionamento conjugado, etc. Métodos analíticos exemplares para tal caraterização serão apresentados abaixo, bem como nos Exemplos, e métodos adicionais conhecidos pelos peritos na especialidade também podem ser usados para caraterizar as composições.

Como será observado pelos peritos na especialidade, o teor de fármaco dos lipossomas pode ser determinado com a utilização de métodos estabelecidos para análise HPLC, com controlos adequados, como praticado rotineiramente na técnica e, adicionalmente, como descrito nos Exemplos. Com a utilização de controlos adequados, a identidade do fármaco encapsulado também pode ser determinada por HPLC ou, para certos fármacos (por exemplo, fármacos que contêm platina), por métodos analíticos tais como ICP-MS (espetrometria de massa com fonte de plasma indutivamente

acoplada) da forma praticada pelos peritos na especialidade.

Em certas formas de realização, a quantidade de fármaco (por exemplo, oxaliplatina, etc.) ou de composto marcado encapsulado no lipossoma ou na composição que contém lipossoma pode ser de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 15 mg/ml dentro do lipossoma. Por exemplo, a concentração de fármaco pode ser de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 15 mg/ml, cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 10 mg/ml, cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 10 mg/ml, cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 5 mg/ml; cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 3 mg/ml, cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 2 mg/ml, cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 1,5 mg/ml, cerca de 0,8 mg/ml a cerca de 3 mg/ml, cerca de 0,8 mg/ml a cerca de 2 mg/ml, cerca de 0,8 mg/ml a cerca de 1,5 mg/ml, cerca de 0,7 mg/ml a cerca de 3 mg/ml, cerca de 0,7 mg/ml a cerca de 2 mg/ml, cerca de 0,7 mg/ml a cerca de 1,7 mg/ml, cerca de 0,7 mg/ml a cerca de 1,5 mg/ml, cerca de 0,7 mg/ml a cerca de 1,4 mg/ml, cerca de 0,7 mg/ml a cerca de 1,3 mg/ml, cerca de 0,5 mg/ml, cerca de 0,7 mg/ml, cerca de 0,8 mg/ml, cerca de 0,9 mg/ml, cerca de 1 mg/ml, cerca de 1,1 mg/ml, cerca de 1,2 mg/ml, cerca de 1,3 mg/ml, cerca de 1,4 mg/ml, cerca de 1,5 mg/ml, cerca de 1,6 mg/ml, cerca de 2 mg/ml, cerca de 3 mg/ml, cerca de 4 mg/ml, cerca de 5 mg/ml, cerca de 6 mg/ml, cerca de 7 mg/ml, cerca de 8 mg/ml, cerca de 9 mg/ml, cerca de 10 mg/ml ou cerca de 15 mg/ml dentro do lipossoma.

O potencial elétrico no plano de cisalhamento é chamado potencial zeta de um lipossoma. Como é do conhecimento dos peritos na especialidade, o potencial zeta dos lipossomas pode ser determinado experimentalmente com a utilização de instrumentação adequada, por exemplo, como medido por um ELS-6000 (Otsuka Electronics, Japão) com o método de microeletroforese laser-Doppler ou outra instrumentação e protocolos disponíveis aos peritos na especialidade. Por exemplo, *J. Colloid and Interface Sci.*,

39, 670-675 (1972), nitition.com/en/products/zeecom_s.htm, etc.

Em certas formas de realização, os lipossomas (incluindo os lipossomas direcionados e os lipossomas da composição que contém lipossoma) no presente documento descritos exibirão um potencial zeta global negativo. Em algumas formas de realização, o potencial zeta é de cerca de -10 mV a cerca de -200 mV. Por exemplo, de cerca de -50 mV a cerca de -150 mV, de cerca de -50 mV a cerca de -130 mV, de cerca de -60 a cerca de -120 mV, de cerca de -50 a cerca de -100 mV, de cerca de -75 mV a cerca de -90 mV, de cerca de -80 mV a cerca de -90 mV, de cerca de -80 mV a cerca de -85 mV, de cerca de -85 mV a cerca de -90 mV, de cerca de -75 mV a cerca de -85 mV, de cerca de -70 mV a cerca de -90 mV, cerca de -75 mV, cerca de -80 mV, cerca de -85 mV, cerca de -83 mV, cerca de -90 mV, cerca de -100 mV, cerca de -120 mV.

Após a injeção intravenosa de pequenos lipossomas, acredita-se que eles passem através das fenestras dos sinusoides hepáticos e entrem rapidamente em contato com os hepatócitos. Acredita-se que os lipossomas de tamanho intermediário sejam retidos dentro do compartimento sanguíneo e possam circular por um período de tempo considerável. No entanto, grandes lipossomas passam mais lentamente através dos sinusoides hepáticos, e são rapidamente captados pelas células de Kupffer. Dessa forma, o tamanho do lipossoma é muito importante para determinar o comportamento *in vivo*. Veja-se, por exemplo, Liu *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* (1992) 1104 (1): 95-101; Harashima *et al.*, *J. Drug Target.* (1995) 3(4): 253-261.

O tamanho de partícula do lipossoma pode ser obtido por função de correlação com a utilização de vários algoritmos usando Espetroscopia de Correlação de Fótons (PCS; Dispersão Dinâmica de Luz ou Dispersão Quasi-Elastica de Luz (QELS)). O tamanho de partícula obtido por essas

técnicas é comparável ao diâmetro médio determinado por PCS. PCS usa desvio padrão e χ^2 para descrever a distribuição de tamanho. Em sistemas PCS, χ^2 determina se o sistema é unimodal (distribuição gaussiana) ou multimodal (distribuição Nicomp). O tamanho de partícula médio pode ser determinado com a utilização de medidas balanceadas de intensidade e é relatado pela distribuição gaussiana se $\chi^2 \leq 5$. Se $\chi^2 > 5$, a média do pico principal está numa distribuição Nicomp. Tal análise será familiar para os peritos na especialidade, bem como serão aparelhos adequados, por exemplo, "Nicom QELS Particle Sizer", PSS Modelo 380ZLS, S/N 0103301; pssnicomp.com/zetaspec.htm.

Em certas formas de realização dos lipossomas, particularmente os lipossomas direcionados no presente documento descritos, o diâmetro médio do lipossoma será de cerca de 50 a cerca de 275 nm. Por exemplo, o diâmetro médio do lipossoma pode ser de cerca de 50 a cerca de 200 nm, de cerca de 50 a cerca de 265 nm, de cerca de 50 a cerca de 250 nm, de cerca de 50 a cerca de 225 nm, de cerca de 50 a cerca de 175 nm, de cerca de 50 a cerca de 150 nm, de cerca de 50 a cerca de 120 nm, de cerca de 50 a cerca de 100 nm, de cerca de 75 a cerca de 250 nm, de cerca de 75 a cerca de 200 nm, de cerca de 75 a cerca de 175 nm, de cerca de 75 a cerca de 150 nm, de cerca de 75 a cerca de 120 nm, de cerca de 75 a cerca de 100 nm, de cerca de 90 a cerca de 100 nm, de cerca de 90 a cerca de 120 nm, de cerca de 90 a cerca de 150 nm, de cerca de 90 a cerca de 200 nm, de cerca de 95 a cerca de 100 nm, de cerca de 95 a cerca de 120 nm, de cerca de 95 a cerca de 125 nm, de cerca de 95 a cerca de 130 nm, de cerca de 95 a cerca de 150 nm, de cerca de 95 a cerca de 175 nm, cerca de 90 nm, cerca de 95 nm, cerca de 100 nm, cerca de 120 nm, cerca de 130 nm ou cerca de 150 nm. Para uma composição de lipossoma em particular, o lipossoma direcionado será aproximadamente cerca de 15 a cerca de 25 nm maior em termos de diâmetro do que um

lipossoma formado pelos mesmos componentes, mas com o fator de direcionamento não incorporado.

Os lipossomas (por exemplo, lipossomas direcionados, lipossomas em branco, lipossomas em composições que contêm lipossoma) no presente documento descritos também podem ser caracterizados pela concentração de ligando de direcionamento que é incorporada no lipossoma. Dependendo do ligando de direcionamento selecionado, vários meios de quantificação da quantidade de ligando de direcionamento serão evidentes para os peritos na especialidade. Por exemplo, como descrito nos exemplos, o teor de transferrina (Tf) dos lipossomas pode ser determinado com a utilização de migração eletroforética (por exemplo, como medido por SDS-PAGE) do lipossoma comparada com controlos adequados.

Resumidamente, a confirmação do teor de transferrina nos lipossomas pode ser avaliada com a utilização de dois ensaios para o teor e/ou identidade de transferrina conjugada aos lipossomas. Primeiramente, a migração eletroforética de transferrina do lipossoma analisada por SDS-PAGE pode ser comparada com o padrão de migração de transferrina conjugada purificada, por exemplo, TF-N ω PE. Além disso, a migração eletroforética de transferrina conjugada também pode ser comparada com um padrão de referência de transferrina livre. Um suporte adicional para a identidade de transferrina em lipossomas pode ser obtido com a utilização de ELISA, uma formulação de grau de pesquisa que demonstra a ligação específica de anticorpo anti-transferrina aos lipossomas direcionados. A concentração de lipossomas direcionados a transferrina pode ser medida com a utilização de ensaios colorimétricos de quantificação de proteínas como, por exemplo, BCA, um ensaio bem conhecido pelos peritos na especialidade. Ao profissional experiente, à luz dos ensinamentos no presente documento apresentados, também irá ocorrer métodos similares e outros conhecidos na técnica para a

determinação da quantidade de vários fatores de direcionamento.

Resumidamente, a quantidade de transferrina num lipossoma pode ser analisada usando reagente de ensaio de ácido bicinconínico (BCA). Cobre (II) é reduzido a cobre (I) por proteína sob condições alcalinas. O íon de cobre (I) gerado forma um complexo solúvel intensamente colorido com BCA. A proteína ligada à micropartícula total é medida pela reação de uma quantidade conhecida de suspensão de micropartícula com os reagentes de BCA. Após a ocorrência da formação de cor, as micropartículas são removidas por filtração e a cor é medida por espectrometria.

Em algumas formas de realização, a concentração de ligando de direcionamento incorporada no lipossoma será de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 5,0 mg/ml, de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 2,0 mg/ml, de cerca de 1,0 mg/ml a cerca de 2,0 mg/ml, de cerca de 1,0 mg/ml a cerca de 3,0 mg/ml, de cerca de 1,0 mg/ml a cerca de 2,5 mg/ml, de cerca de 1,0 mg/ml a cerca de 2,0 mg/ml, ou de cerca de 1,3 mg/ml a cerca de 2,5 mg/ml.

O papel do ião férrico é muito importante na ligação da transferrina à superfície de células tumorais. Portanto, o teor de ião férrico dos lipossomas direcionados que incorporam Tf é outra forma significativa de caracterizar os lipossomas. Embora diversos métodos para determinação do teor de ião férrico sejam do conhecimento dos peritos na especialidade, um método é ICP-MS.

Quando um lipossoma contém transferrina, o teor de ião férrico do lipossoma pode ser, por exemplo, de cerca de 0,25 µg/ml a cerca de 3 µg/ml, 0,4 µg/ml a cerca de 3 µg/ml, 0,25 µg/ml a cerca de 2 µg/ml, 0,25 µg/ml a cerca de 1,5 µg/ml, 0,25 µg/ml a cerca de 1 µg/ml, 0,4 µg/ml a cerca de 2 µg/ml, 0,4 µg/ml a cerca de 1,5 µg/ml, 0,5 µg/ml a cerca de 2 µg/ml, cerca de 0,5 µg/ml a cerca de 1,4 µg/ml ou cerca de 0,5 µg/ml a cerca de 1,5 µg/ml.

Os lipossomas, incluindo lipossomas direcionados e lipossomas em branco, também podem ser caracterizados por sua pressão osmótica em certa temperatura. A pressão osmótica em certa temperatura depende da concentração molar da solução de açúcar (sacarose), e também depende da densidade iônica total e do tamanho das moléculas dentro da solução. A pressão osmótica normalmente pode ser medida com a utilização de um instrumento conhecido como osmómetro, que mede a pressão osmótica em unidades de pressão adequadas, como será observado pelos peritos na especialidade.

Em certas formas de realização, a pressão osmótica dos lipossomas, particularmente dos lipossomas direcionados e lipossomas em branco, em temperatura ambiente, será de cerca de 310 a cerca de 410 mOsm/kg. Por exemplo, a pressão osmótica pode ser de cerca de 310 a cerca de 400 mOsm/kg, de cerca de 310 a cerca de 380 mOsm/kg, de cerca de 320 a cerca de 360 mOsm/kg, de cerca de 315 a cerca de 375 mOsm/Kg, de cerca de 320 a cerca de 375 mOsm/Kg, de cerca de 315 a cerca de 370 mOsm/Kg, de cerca de 320 a cerca de 370 mOsm/Kg, cerca de 360 mOsm/Kg, cerca de 350 mOsm/Kg, cerca de 340 mOsm/Kg, cerca de 370 mOsm/Kg ou cerca de 380 mOsm/Kg em temperatura ambiente.

Sob as várias condições no presente documento descritas (por exemplo, condições para armazenamento, preparadas para condições de administração e/ou *in vitro*), a pressão osmótica pode variar menos do que cerca de 25 %, menos do que cerca de 20 %, menos do que cerca de 15 %, quando monitorizada ao longo de um período de tempo específico associado às várias condições no presente documento descritas. Por exemplo, 360 ± 50 mOsm/kg.

Produção de Composições que Contêm Lípido

Há três exigências principais para fármacos e compostos marcados destinados à administração a indivíduos no curso da terapêutica, especificamente, eficácia,

segurança, e garantia de qualidade. Apesar de eficácia e segurança comprovadas, a habilidade de usar um fármaco em terapêutica é indeterminada caso sua qualidade (por exemplo, pureza, homogeneidade, reprodutibilidade de dosagem, estabilidade ao longo do tempo, etc.) não possa ser consistentemente garantida durante o fabrico e distribuição. Métodos de produção de fármacos ou de composto marcado que não garantam consistentemente um fármaco de alta qualidade também aumentam a probabilidade de reações adversas nos indivíduos que recebem a administração do fármaco. Por toda a vida útil de um fármaco ou de composto marcado, é importante que o produto que é fabricado e distribuído atinja os mesmos padrões que o produto que inicialmente recebeu a aprovação das agências reguladoras. Dessa forma, a capacidade de produzir consistentemente fármacos ou compostos marcados de alta qualidade é necessária para a produção de produtos seguros de fármacos ou compostos marcados, e fármacos ou compostos marcados que possam ser rotineira e facilmente fabricados e purificados são vantajosos tanto do ponto de vista comercial quanto de segurança. Por exemplo, a eficácia de um composto marcado refere-se à sua capacidade de ser útil no diagnóstico de uma doença ou de condições específicas em conjuntamente com os métodos diagnósticos específicos (por exemplo, a atividade do composto marcado (por exemplo, habilidade de ser visualizado por contador gama, etc.)) que não deve ser prejudicada por um nível inaceitável de variação de lote para lote ou durante armazenamento.

Serão descritos a seguir métodos gerais para a produção das composições no presente documento descritas que podem ser usados para produzir consistentemente lipossomas direcionados (e intermediários destes) e lipossomas em branco de alta qualidade (por exemplo, de alta pureza, homogeneidade, etc.). Esses métodos também são representados esquematicamente nas Figuras 4 (método de

produção A) e 5 (método de produção B).

Os ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico e fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico no presente documento descritos são úteis como componentes de complexos fosfolipídicos tais como lipossomas, micelas de polímero, micro- e nanoesferas, emulsões e polímeros hidrossolúveis. A preparação desses derivados de PE é no presente documento descrita e métodos para sua produção também são conhecidos na técnica, como mencionado previamente.

Em particular, os ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico e fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico também são úteis como componentes das composições que contêm lípido no presente documento descritas. As composições que contêm lípido podem ser preparadas de acordo com os métodos no presente documento descritos, embora modificações desses métodos também sejam evidentes para os peritos na especialidade. Por exemplo, vários métodos conhecidos pelos peritos na especialidade podem ser usados na formação de lipossoma a partir de componentes lipídicos (por exemplo, sonicação, agitação, extrusão, desidratação, etc.). Como, por exemplo, como descrito na Publicação do Pedido de Patente US N° 2004/0142025.

O utilização dos métodos gerais no presente documento descritos, incluindo nos Exemplos, para a produção dos lipossomas direcionados também abrange métodos para a produção das outras composições que contêm lípido (por exemplo, misturas de lípidos, composições que contêm lipossoma, lipossomas em branco e lipossomas intermediários), como no presente documento descritos.

Método de Produção A

O método de produção A é representado esquematicamente

na Figura 4.

A: Produção de Mistura de NwPE:SuccNwPE:Lípido Adicional (Intermediário 1)

Os ésteres succinimidílicos de fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico (SuccNwPE) e fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico (NwPE) no presente documento descritos são misturados com lípidos adicionais (por exemplo, pelo menos um fosfolípido(s) (por exemplo, PC (por exemplo, DMPC, DSPC, etc.), PI, esfingomielina, ácido fosfatídico, etc.) e pelo menos um outro lípido adicional (por exemplo, colesterol)), e depois dissolvidos num solvente adequado (por exemplo, etanol, t-BuOH, clorofórmio, éter isopropílico, etc.). A quantidade do solvente é geralmente 1 a 100 v/p (vs. peso total de lípidos). Em certas formas de realização, isso equivale a 2 a 20 v/p.

O SuccNwPE e o NwPE usados como descrito no parágrafo precedente podem ser preparados e purificados por métodos no presente documento descritos ou por métodos conhecidos pelos peritos na especialidade. O SuccNwPE e o NwPE, além de outros componentes no presente documento descritos para a produção dos lipossomas direcionados e intermediários destes, devem ter pureza e homogeneidade suficientes, para no final, gerarem lipossomas direcionados de pureza e homogeneidade suficientes para atenderem às diretrizes reguladoras para a administração dos lipossomas direcionados aos indivíduos e de acordo com diretrizes de boas práticas laboratoriais (GLP) e de fabrico (GMP).

Quando um lípido adicional (além do um ou mais fosfolípidos) for usado em combinação com o fosfolípido, a razão de fosfolípido(s) em relação aos outros lípidos adicionais será de cerca de 2:1. Uma razão de mistura dos derivados de SuccNwPE em relação aos fosfolípidos é de cerca de 1 a cerca de 12 % (1:99 a 12:88) ou cerca de 3-6 % (3:97 a 6:94) da concentração/razão total de (NHS-NGPE +

NGPE) para (CHOL + Fosfolípido). Por exemplo, razões exemplares incluem 50:45:4:1 (por exemplo, PC:Col:NG-PE:NHS-NG-PE), em que, por exemplo, 17,5 mg de NHS-NG-DOPE, 63,1 mg de NG-DOPE, 312 mg de Col e 607 mg de fosfolípidos em 1 g de mistura.

B: Produção de Mistura de Fármaco:N ω PE:SuccN ω PE:Lípido Adicional (Intermediário 2)

A mistura de N ω PE:SuccN ω PE:lípido adicional preparada na etapa A é então misturada com solução aquosa (por exemplo, tampão, etc.) que contém o fármaco ou composto marcado a ser encapsulado (por exemplo, agente anticâncer (por exemplo, oxaliplatina, inibidor da topoisomerase I, alcaloide da vinca, etc.)) para obter a mistura de fármaco:N ω PE:SuccN ω PE:lípido neutro (Intermediário 2).

Quando o fármaco for oxaliplatina (l-OHP), a concentração da solução de oxaliplatina será de cerca de 8 mg/ml numa solução de sacarose de aproximadamente 9s. Por exemplo, a concentração de oxaliplatina no lipossoma direcionado é de cerca de 0,8 mg/ml \pm 10 %.

C: Produção de Lipossoma de Fármaco:N ω PE:SuccN ω PE:Lípido Adicional (Intermediário 3)

A mistura de fármaco:N ω PE:SuccN ω PE:lípido adicional (Intermediário 2) obtida na etapa B é então sonificada ou agitada, seguido por evaporação do solvente, para formar o lipossoma de fármaco:N ω PE:SuccN ω PE:lípido adicional (Intermediário 3). Métodos e condições para a realização de sonicação, agitação e evaporação, e meios para a execução dessas etapas são bem conhecidos pelos peritos na especialidade e são também adicionalmente descritos nos Exemplos. Veja-se, por exemplo, métodos de produção por métodos de vesícula de fase reversa (REV), Patente US N° 4.235.871. Métodos gerais de produção de lipossomas, tais como métodos simples de hidratação e métodos de injeção de etanol, conhecidos pelos peritos na especialidade, também podem ser utilizados.

O lipossoma de fármaco:N ω PE:SuccN ω PE:lípido adicional formado como descrito acima é então extrudado por tamanho e o lipossoma de fármaco:N ω PE:SuccN ω PE:lípido adicional é isolado. Opcionalmente, pode então ser usada ultrafiltração para concentrar a solução de lipossoma.

Quando o lipossoma contiver l-OHP (fármaco), DMPC (lípido/fosfolípido adicional (neutro)), colesterol (CHOL, lípido adicional/lípido neutro), N-glutaril-DOPE (NG-DOPE) e NHS-NG-DOPE, um lipossoma com um diâmetro médio de cerca de 0,2 micrómetro (200 nm) poderá ser isolado. Da mesma forma, também podem ser obtidos lipossomas dimensionados para lipossomas que contêm l-OHP (fármaco), DSPC (lípido/fosfolípido adicional (neutro), colesterol, N-glutaril-DSPE (NG-DSPE) e NHS-NG-DSPE). Quantidades alvo exemplares dos componentes lipídicos são, por exemplo, cerca de 40 mg/ml de DMPC (um lípido adicional/fosfatidilcolina/fosfolípido/lípido neutro), cerca de 20 mg/ml de CHOL (lípido adicional/lípido neutro) e cerca de 5 mg/ml de NG-DOPE (quantidade combinada de NG-PE e NHS-NG-PE). Uma razão exemplar para os componentes lipídicos é de 50:45:5 (lípido adicional 1 (por exemplo, uma fosfatidilcolina)):lípido adicional 2 (por exemplo, CHOL):NG-PE (por exemplo, NG-DOPE + NHSNG-DOPE).

D: Produção de Lipossoma de Fármaco:N ω PE:TF-N ω PE:Lípido Adicional (Lipossoma Direcionado)

O lipossoma de fármaco:N ω PE:SuccN ω PE:lípido adicional formado como descrito na etapa C pode então ser funcionalizado com o fator de direcionamento de escolha para produzir o lipossoma de fármaco:N ω PE:TF-N ω PE:lípido adicional (também citado como o "lipossoma direcionado").

A adesão do fator de direcionamento (TF) (por exemplo, funcionalização do lipossoma intermediário (Intermediário 3) com fator de direcionamento) é obtida ligando-se covalentemente o fator de direcionamento ao SuccN ω PE por reação da fração succinimidilo com o fator de

direcionamento. Através de condições de reação apropriadas, grupos succinimidilo na superfície exposta do lipossoma (no exterior da bicamada lipídica, onde o fármaco ou composto marcado é encapsulado no interior do lipossoma) podem ser modificados covalentemente para formar fosfatidil etanolaminas derivatizadas de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificadas por fator de direcionamento (TF-N ω PE). A adesão do fator de direcionamento ao lipossoma resulta na formação do lipossoma de fármaco:N ω PE:TF-N ω PE:lípido adicional (lipossoma direcionado).

Mais especificamente, sob condições apropriadas, a fração succinil carboxilo do SuccN ω PE no presente documento descrita é funcionalizada. Caso o fator de direcionamento tenha um(ns) grupo(s) amino, o(s) grupo(s) amino no fator de direcionamento é feito reagir com a fração succinil carboxilo e forma a ligação amida de ácido carboxílico. Condições apropriadas para essa reação serão no presente documento descritas posteriormente, incluindo nos Exemplos, e também serão do conhecimento dos peritos na especialidade. Os peritos na especialidade também serão capazes de modificar as condições de reação para otimizar as condições para combinações específicas de fator de direcionamento e lipossomas, sem experimentação desnecessária à luz dos ensinamentos no presente documento apresentados.

Vários fatores de direcionamento no presente documento descritos e conhecidos pelos peritos na especialidade podem ser obtidos comercialmente ou produzidos por métodos conhecidos pelos peritos na especialidade.

Quando, por exemplo, é selecionada transferrina como o fator de direcionamento, a transferrina pode ser obtida comercialmente como proteína purificada, por exemplo, de Celliance Corp., GA, EUA. A transferrina também pode ser obtida usando métodos recombinantes conhecidos na técnica (por exemplo, pela utilização de célula procariótica (*E.*

coli, etc.), pela utilização de célula eucariótica (CHO, BHI, etc.), etc.). Como é sabido, transferrina pode ser obtida e usada nos lipossomas direcionados tanto na sua forma apo quanto na forma holo. Alternativamente, lipossomas direcionados que incorporam apo-transferrina podem ser tratados com compostos férricos, tais como citrato férrico, cloreto de ferro (III), etc., para a produção de lipossomas direcionados que incorporam lipossoma derivatizado de holo-transferrina.

Uma quantidade exemplar de transferrina como fator de direcionamento é, por exemplo, cerca de 2 mg/ml de transferrina. Uma quantidade como essa seria adequada para um lipossoma direcionado exemplar contendo cerca de 40 mg/ml de DMPC, cerca de 20 mg/ml de CHOL e cerca de 5 mg/ml de NG-DOPE (quantidade combinada de NG-PE e NHS-NG-PE).

Com a funcionalização do lipossoma (intermediário 3) com fator de direcionamento como descrito acima para obter os lipossomas direcionados, os lipossomas resultantes podem opcionalmente ser adicionalmente purificados com a utilização de métodos conhecidos pelos peritos na especialidade, incluindo aqueles métodos de purificação no presente documento descritos, particularmente aqueles descritos em relação à etapa C, acima.

Quando o lipossoma contiver *l*-OHP (fármaco), DMPC, colesterol (CHOL), N-glutaril-DOPE (NG-DOPE) e Tf-NG-DOPE, um lipossoma com um diâmetro médio de cerca de 0,05 micrómetro a cerca de 0,2 micrómetro (cerca de 50 nm a cerca de 200 nm) poderá ser isolado. Da mesma forma, também podem ser obtidos lipossomas dimensionados para lipossomas que contêm *l*-OHP (fármaco), DSPC, colesterol, N-glutaril-DSPE (NG-DSPE) e NHS-NG-DSPE.

A produção dos lipossomas direcionados pelo método descrito acima (citado por conveniência como método de produção A) produz de forma reprodutível lipossomas direcionados de alta pureza e homogeneidade. Em particular,

os lipossomas direcionados são substancialmente livres dos materiais de partida diferentes de NHS (no presente documento descritos) e subprodutos (por exemplo, compostos de ureia acilada, etc.) associados à geração de SuccN ω PEs. Em particular, a preparação e a purificação de SuccN ω PEs antes da formação do lipossoma geram lipossomas (intermediário 3) e lipossomas direcionados substancialmente livres de materiais de partida de carbodiimida (por exemplo, DCC, EDC, etc.) usados para funcionalizar N ω PEs para formar SuccN ω PEs. Como mencionado anteriormente, fármacos e compostos marcados, incluindo lipossomas direcionados que incorporam fármacos, ou compostos marcados, que se destinam à administração aos indivíduos no curso da terapêutica ou do diagnóstico, devem necessariamente ser de alta qualidade.

Opcionalmente, as misturas de lípidos descritas em A (intermediário 1) podem ser tratadas com fator de direcionamento para formar uma mistura lipídica contendo TF-N ω PE. Além disso, essa mistura lipídica pode ser misturada com uma solução aquosa para formar uma composição que contém lipossoma. Finalmente, a composição que contém lipossoma pode ser tratada para produzir uma formulação de lipossoma. Opcionalmente, a solução aquosa pode incluir um fármaco ou composto marcado.

Método de Produção Alternativo (Método B)

O método de produção B é representado esquematicamente na Figura 5.

A. Produção de Lipossoma de Fármaco:N ω PE:Lípidos Adicionais

Os lipossomas direcionados no presente documento descritos também podem ser produzidos dissolvendo-se os lípidos adicionais e N ω PE num solvente adequado (por exemplo, etanol, t-BuOH, clorofórmio, éter isopropílico, etc.), dispersando-se a solução resultante numa solução aquosa contendo opcionalmente um fármaco ou composto marcado, e depois realizando-se ultra-sonicação ou vesícula

de fase reversa da dispersão resultante para formar um lipossoma (fármaco:NwPE:lípidos neutros). A solução de lipossoma pode ser concentrada por ultrafiltração.

Como exemplo não limitativo, os lipossomas podem ser produzidos pelo método de vesícula de fase reversa (REV) (Patente US N° 4.235.871). Evidentemente, podem ser utilizados métodos gerais de composição de lipossoma, tais como métodos simples de hidratação e métodos de injeção de etanol.

A fim de reter estavelmente a(s) NwPE(s) na bicamada lipídica, a (s) NwPE(s) pode ser preparada e purificada, e depois NwPE(s), juntamente com os lípidos adicionais (por exemplo, fosfolípido(s), colesterol, etc.) é usada para preparar o lipossoma de acordo com métodos conhecidos pelos peritos na especialidade.

Como exemplo não limitativo, lípidos adicionais (por exemplo, um ou mais fosfolípidos (por exemplo, DSPC, DMPC, etc.) e, opcionalmente, outro lípido adicional (por exemplo, colesterol, etc.)) e pelo menos uma NwPE são misturados juntos e dissolvidos num solvente orgânico adequado.

Quando os lípidos adicionais são um fosfolípido e colesterol, a razão de mistura do fosfolípido e do colesterol pode ser, por exemplo, cerca de 1:1, por exemplo, cerca de 1,1:1, cerca de 1,2:1, cerca de 0,9:1 (por exemplo, DMPC e colesterol, 50:45 (mol%)). O teor da(s) NwPE (s) como uma razão de teor total de lípidos é, por exemplo, 6 % em relação ao fosfolípido. A seguir, a solução resultante é misturada com uma solução de oxaliplatina num tampão aquoso. A NwPE pode ser cerca de 0,8 mol% a cerca de 12 mol% em relação ao teor total de lípidos. Por exemplo, de cerca de 1 mol% a cerca de 10 mol%, cerca de 1 mol% a cerca de 8 mol%, cerca de 1 mol% a cerca de 6 mol%, cerca de 1 mol% a cerca de 5 mol%, cerca de 1 mol% a cerca de 4 mol%, cerca de 1 mol% a cerca de 3

mol%, cerca de 1 mol% a cerca de 2 mol%, cerca de 2 mol% a cerca de 12 mol%, cerca de 2 mol% a cerca de 10 mol%, cerca de 3 mol% a cerca de 8 mol%, cerca de 1 mol%, cerca de 2 mol%, cerca de 3 mol%, cerca de 4 mol%, cerca de 5 mol%, cerca de 6 mol%, cerca de 8 mol%, cerca de 10 mol% ou cerca de 12 mol%.

A concentração de fármaco ou composto marcado em solução pode ser como no presente documento descrita e, em particular, como acima para o método de produção A. Da mesma forma, a solução que contém o fármaco ou composto marcado inclui os componentes da solução no presente documento descritos.

Lipossomas que incorporam 1-OHP (fármaco), DSPC, colesterol e N-glutaril-DSPE (NG-DOPE) preparados por esse método podem ser isolados para fornecerem um lipossoma contendo oxaliplatina (por exemplo, por filtração em gel, por cromatografia por exclusão de tamanho, por ultrafiltração, por ultracentrifugação, etc.) com um diâmetro médio de cerca de 0,2 µm.

B. Produção de Lipossoma de Fármaco:SuccNωPE:NωPE:Lípidos Adicionais

Após a etapa A, uma porção da NωPE presente no lipossoma preparado na etapa A (lipossoma de fármaco:NωPE:lípidos adicionais) é funcionalizada para gerar um lipossoma que incorpora SuccNωPE (ou seja, lipossoma fármaco:SuccNωPE:NωPE:lípidos adicionais), que pode posteriormente ser modificado para formar TF- NωPE.

A fim de formar SuccNωPE, o grupo carboxilo num terminal da NωPE é modificado para formar um grupo succinimidilo. Tal funcionalização pode ser obtida com a utilização dos métodos descritos para a produção de SuccNωPE(s).

Por exemplo, uma carbodiimida (por exemplo, EDC, DCC, etc.) e N-hidroxissulfosuccinimida (NHS) são regidos na presença do lipossomo para gerar lipossomo

fármaco:SuccN ω PE:N ω PE:lípídeos adicionais.

C. Produção de Lipossoma de Fármaco:TF-N ω PE:N ω PE:Lípídeos Adicionais

Após a etapa B, o lipossoma de fármaco:SuccN ω PE:N ω PE:lípídeos adicionais preparado na etapa B é feito reagir com fator de direcionamento para formar lipossoma de fármaco:TF-N ω PE:N ω PE:lípídeos adicionais. Os métodos e as condições para a reação são como descritos para o método de produção A, etapa D.

Os lipossomas de fármaco:TF-N ω PE:N ω PE:lípídeos adicionais obtidos pelo método de produção B podem ser purificados e concentrados com a utilização de métodos no presente documento descritos e conhecidos pelos peritos na especialidade.

Comparação dos Métodos de Produção

O método de produção A tem várias vantagens em relação ao método de produção B, embora ambos possam ser usados para se obter lipossomas de fármaco:TF-N ω PE:N ω PE:lípídeos adicionais (lipossomas direcionados, contendo opcionalmente fármaco ou composto marcado). Mais notavelmente, os lipossomas obtidos pelo método A serão livres ou substancialmente livres de impurezas (por exemplo, materiais de partida diferentes de NHS e/ou subprodutos) relacionadas à produção dos SuccN ω PEs. Em particular, como observado previamente, os lipossomas direcionados preparados pelo método de produção A serão livres, ou substancialmente livres, por exemplo, de carbodiimidas (por exemplo, EDC, DCC, etc.) e ureias aciladas. Em certas formas de realização nas quais SuccN ω PE não é incorporado no interior do lipossoma, o lipossoma ou a composição que contém lipossoma também pode ser livre ou substancialmente livre de NHS. Adicionalmente, quanto maior a escala da reação, maior o tempo de preparação. O tempo para o método de produção A é substancialmente menor do que o do método de produção B.

Embora a purificação dos lipossomas de fármaco:TF-NwPE:NwPE:lípidos adicionais preparados pelo método de produção B reduza a quantidade de tais impurezas, é mais difícil purificar lipossomas (por exemplo, os lipossomas de fármaco:SuccNwPE:NwPE:lípidos adicionais obtidos na etapa B do método de produção B) do que lípidos (por exemplo, SuccNwPEs preparados e purificados antes da etapa A do método de produção A). Como alguns dos SuccNwPEs estão provavelmente orientados para o interior dos lipossomas (por exemplo, a funcionalidade éster succinimidílico está no interior da bicamada lipídica e inacessível à reação com fator de direcionamento), é provável que lipossomas direcionados preparados pelo método de produção A possam ter algum SuccNwPE residual neles incorporado.

Uma vantagem adicional do método de produção A é que o teor relativo de TF-NwPE vs. NwPE nos lipossomas de fármaco:TF-NwPE:NwPE:lípidos adicionais finais pode ser controlado com mais precisão quando é usado o método de produção A. As quantidades relativas desses lípidos estão diretamente relacionadas às quantidades relativas do SuccNwPE e da NwPE usadas como materiais de partida na etapa A do método de produção A. Dessa forma, a quantidade de SuccNwPE modificada por TF também pode ser controlada com mais precisão.

Quando é usado o método de produção B, as quantidades relativas de NwPE vs. SuccNwPE dependem da eficiência de reação da etapa B do método B. Acredita-se que essa reação seja finalizada por cerca de aproximadamente 10 % da NwPE presente no lipossoma, mas são esperadas variações experimentais de lote para lote. A baixa eficiência de reação é provavelmente causada, em parte, pelo obstáculo estérico do lipossoma preformado. Quando SuccNwPE é formado a partir de NwPE isolada (somente lípido), há bem menos obstáculos estéricos e a reação vai além da finalização. Além disso, subsequente à formação do SuccNwPE (na forma de

somente lípido), o produto resultante pode ser purificado da mistura de reação removendo, dessa forma, NwPE não feita reagir, carbodiimida e NHS, além de outros subprodutos que podem se formar durante a reação.

Os lipossomas formados por um dos métodos parecem ser mais homogêneos (e, portanto, podem ser usados para produzir um produto farmacológico/diagnóstico mais reprodutível) do que lipossomas que incorporam PEG ou outros polímeros hidrofílicos, tais como aqueles descritos na seção "Antecedentes" da presente memória descritiva. Em geral, quando PEG ou outros polímeros hidrofílicos são usados para aumentar o tempo de circulação dos lipossomas (por exemplo, para proteger os lipossomas da captação pelo RES), sua utilização resulta em lipossomas com uma distribuição de tamanho molecular em função da ampla distribuição do PEG ou dos próprios polímeros hidrofílicos. Essa distribuição aumenta as dificuldades associadas à fabricação (por exemplo, reprodutibilidade e/ou purificação) e também pode aumentar a variabilidade na eficácia clínica. Lipossomas direcionados preparados pelos métodos A ou B devem ser superiores nesses aspetos.

Métodos de Produção Adicionais

Misturas de lípidos e composições que contêm lipossoma (que podem ser usadas para a preparação de lipossomas) também podem ser preparadas por modificação dos métodos de produção A e B. Por exemplo, em algumas formas de realização, misturas de lípidos e composições que contêm lipossomas que incorporam componentes lipídicos adicionais: NwPE:TF-NwPE ou componentes lipídicos adicionais:NwPE:TF-NwPE:fármaco/composto marcado (em que "componentes lipídicos adicionais" refere-se a um ou mais fosfolípidos (por exemplo, um ou mais fosfolípidos neutros, um ou mais fosfolípidos aniônicos, um ou mais fosfolípidos catiónicos ou combinações de dois ou mais dos citados anteriormente)) opcionalmente compreendem ainda um ou mais lípidos

adicionais no presente documento descritos (por exemplo, colesterol ou um derivado deste); ou pelo menos dois lípidos neutros diferentes como no presente documento descritos (por exemplo, pelo menos um(ns) fosfolípido(s) (por exemplo, PCs (por exemplo, DMPC, DSPC, etc.), PI, esfingomielina, ácido fosfatídico, etc.) e pelo menos um outro lípido neutro (por exemplo, colesterol)) podem ser preparados pelos métodos de produção descritos abaixo, além de outras modificações dos métodos previstas pelos peritos na especialidade à luz dos ensinamentos da presente memória descritiva. Os componentes de lípidos adicionais, NωPE, TF-NωPE e, onde estiver presente, fármacos ou compostos marcados, podem ser como descritos ao longo da presente memória descritiva. Da mesma forma, as quantidades relativas dos componentes também são como descritas através da presente memória descritiva.

Em certas formas de realização, a mistura lipídica produzida na primeira etapa do método de produção B (a mistura lipídica produzida dissolvendo-se os lípidos adicionais e NωPE num solvente orgânico adequado) pode ser modificada para incorporar NHS e depois modificada com uma TF para produzir uma mistura lipídica de componentes lipídicos adicionais:NωPE:TF-NωPE. Essa mistura lipídica pode então ser misturada com uma solução aquosa (contendo opcionalmente fármaco ou composto marcado) para formar uma composição que contém lipossoma. Alternativamente, um fármaco ou composto marcado pode ser incorporado após a composição que contém lipossoma ter sido preparada. Em algumas formas de realização, fármaco ou composto marcado livre de solução aquosa pode ser incorporado na mistura lipídica, formada após modificação com NHS e TF, para formar uma mistura lipídica de componentes lipídicos adicionais:NωPE:TF-NωPE:fármaco/composto marcado. Essa mistura lipídica pode subsequentemente ser misturada com uma solução aquosa para formar uma composição que contém

lipossoma.

Em algumas formas de realização, a mistura lipídica produzida na primeira etapa do método de produção B (a mistura lipídica produzida dissolvendo-se o(s) componente(s) lipídico(s) adicional e NwPE num solvente adequado) pode ser misturada com uma solução aquosa para formar uma composição que contém lipossoma (componentes lipídicos adicionais:NwPE). Essa composição que contém lipossoma pode então ser tratada com NHS e TF e subsequentemente misturada com fármaco ou composto marcado para formar uma composição que contém lipossoma de componentes lipídicos adicionais:NwPE:TF-NwPE:fármaco/composto marcado. Alternativamente, a composição que contém lipossoma de componente(s) lipídico(s) adicional(is):NwPE pode ser tratada com fármaco ou composto marcado e depois modificada com NHS seguido por TF.

Em algumas formas de realização, a mistura lipídica produzida na primeira etapa do método de produção B (a mistura lipídica produzida dissolvendo-se o(s) componente(s) lipídico(s) adicional(is) e NwPE num solvente adequado) pode então ser misturada com fármaco ou composto marcado (incluindo opcionalmente solução aquosa) para formar uma mistura lipídica (na qual o fármaco ou composto marcado não inclui solução aquosa) ou composição que contém lipossoma. Quando for formada uma mistura lipídica, a mistura lipídica poderá então ser tratada com NHS e TF para formar uma mistura lipídica de componentes lipídicos adicionais:NwPE:TF-NwPE:fármaco/composto marcado, que pode então ser misturada com solução aquosa para formar uma composição que contém lipossoma. Alternativamente, quando for formada uma composição que contém lipossoma (por exemplo, quando o fármaco ou composto marcado for incorporado em solução aquosa), essa composição que contém lipossoma poderá subsequentemente ser tratada com NHS e TF

para também gerar uma composição que contém lipossoma de componentes lipídicos adicionais: NωPE:TF-NωPE:fármaco/composto marcado.

Num método de produção alternativo adicional, método C, componentes individuais são misturados simultaneamente em solvente orgânico para formar uma mistura lipídica (C-1) (por exemplo, componentes: componentes lipídicos adicionais: NωPE:TF-NωPE ou componentes: componentes lipídicos adicionais: NωPE:TF-NωPE:fármaco ou composto marcado), em que a TF-NωPE é preparada e opcionalmente purificada, antes da mistura. A mistura lipídica C-1 pode então ser misturada com solução aquosa para formar uma composição que contém lipossoma C-2 (componentes lipídicos adicionais: NωPE:TF-NωPE (contendo opcionalmente fármaco ou composto marcado)). Quando a composição que contém lipossoma assim formada não contiver fármaco ou composto marcado, o fármaco ou composto marcado poderá ser adicionado após a formação da composição que contém lipossoma (C2-A). Alternativamente, quando um fármaco ou composto marcado, incluindo uma solução aquosa, for usado como componente de partida inicial, a composição que contém lipossoma poderá ser formada simultaneamente mediante a mistura de todos os componentes de partida.

C-2 (contendo opcionalmente fármaco ou composto marcado) ou C2-A pode então ser tratada para formar um lipossoma (C-3). Quando C-3 não incluir um fármaco ou composto marcado, o lipossoma será um lipossoma direcionado, como descrito previamente (por exemplo, lipossoma de componentes lipídicos adicionais: NωPE:TF-NωPE). Quando C-3 incluir um fármaco ou composto marcado, o lipossoma será um lipossoma direcionado como no presente documento descrito. Quando C-3 for um lipossoma direcionado, um fármaco ou composto marcado, como descrito previamente, poderá ser adicionado ao lipossoma direcionado numa etapa subsequente para formar um lipossoma

direcionado, o que pode ser feito imediatamente após a preparação de C-3 ou após um intervalo, o que pode incluir a armazenamento do lipossoma direcionado de C-3 por um período de tempo.

Num método de produção alternativo adicional, método D, os componentes individuais são misturados simultaneamente em solvente orgânico para formar uma mistura lipídica (D-1) (por exemplo, componentes: componentes lipídicos adicionais; NwPE; ou componentes: componente(s) lipídico(s) adicional(is):NwPE:fármaco ou composto marcado). A mistura lipídica D-1 pode então ser misturada com solução aquosa para formar uma composição que contém lipossoma D-2 (componente(s) lipídico(s) adicional(is):NwPE: (contendo opcionalmente fármaco ou composto marcado)). A composição que contém lipossoma D-2 pode então ser misturada com TF-NwPE para formar uma composição que contém lipossoma D-3 (componente(s) lipídico(s) adicional(is):NwPE:TF-NwPE (contendo opcionalmente fármaco ou composto marcado)), em que a TF-NwPE é preparada e opcionalmente purificada, antes da mistura. Quando a composição que contém lipossoma assim formada não contiver fármaco ou composto marcado, o fármaco ou composto marcado poderá ser adicionado após a formação da composição que contém lipossoma (D3-A). Alternativamente, quando um fármaco ou composto marcado, incluindo uma solução aquosa, for usado como um componente de partida inicial, a composição que contém lipossoma poderá ser formada simultaneamente mediante a mistura de todos os componentes.

D-3 (contendo opcionalmente fármaco ou composto marcado) ou D3-A pode então ser tratado para formar um lipossoma (D-4). Quando D-4 não incluir um fármaco ou composto marcado, o lipossoma será um lipossoma direcionado, como descrito previamente (por exemplo, lipossoma de componente(s) lipídico(s)

adicional(is):N ω PE:TF-N ω PE). Quando D-4 incluir um fármaco ou composto marcado, o lipossoma será um lipossoma direcionado como no presente documento descrito. Quando D4 for um lipossoma direcionado, um fármaco ou composto marcado, como descrito previamente, poderá ser adicionado ao lipossoma direcionado numa etapa subsequente para formar um lipossoma direcionado, o que pode ser realizado imediatamente após a preparação de D-4 ou após um intervalo, o que pode incluir a armazenamento do lipossoma direcionado de D-4 por um período de tempo.

Como ocorre com misturas de lípidos, composições que contêm lipossoma e lipossomas (incluindo lipossomas direcionados, lipossomas em branco, etc.) formados pelo método de produção A, as composições que contêm lípido preparadas pelo método de produção C ou pelo método D serão substancialmente livres de material de partida diferente de NHS, subproduto e/ou produto de decomposição associado à síntese do éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico (por exemplo, carbodiimidas (por exemplo, DCC, EDC, etc.), compostos de ureia acilada, etc.), desde que o material de partida (por exemplo, TF-NG-PE) seja substancialmente livre dessas substâncias antes da etapa inicial do método de produção C ou método D. Quando SuccNooPE não for incorporado como um material de partida (e, portanto, não for incorporado no interior do lipossoma), o lipossoma ou a composição que contêm lipossoma também poderá ser livre ou substancialmente livre de NHS, como ocorre quando TF-N ω PE é realizada e usada como material de partida. Em formas de realização particulares, as composições que contêm lípido preparadas pelo método de produção C ou pelo método D são substancialmente livres de DCC e EDC. Em certas formas de realização, as composições que contêm lípido preparadas pelo método de produção C ou pelo método D são substancialmente livres de DCC.

Em certas formas de realização, o(s) componente(s) lipídico(s) adicional(is) inclui(em) um ou mais fosfolípidos (por exemplo, uma fosfatidilcolina, etc.) e um colesterol ou derivado de colesterol. Em formas de realização particulares, a fosfatidilcolina é DMPC, POPC, DSPC, etc., como no presente documento descrito. Em certas formas de realização, a fosfatidilcolina é DMPC ou DSPC. Em formas de realização particulares, os lípidos adicionais são um fosfolípido e colesterol. Em certas formas de realização, o fosfolípido é um fosfolípido neutro.

Em certas formas de realização, os componentes lipídicos adicionais incluem pelo menos dois lípidos neutros diferentes, o que inclui um fosfolípido (por exemplo, uma fosfatidilcolina, etc.) e um colesterol ou derivado de colesterol. Em formas de realização particulares, a fosfatidilcolina é DMPC, POPC, DSPC, etc., como no presente documento descrito. Em certas formas de realização, a fosfatidilcolina é DMPC ou DSPC. Em formas de realização particulares, esses pelo menos dois lípidos neutros diferentes são um fosfolípido e colesterol.

Em algumas formas de realização, a N ω PE é uma NG-PE. Em formas de realização particulares, a N ω PE é N ω -DOPE ou N ω -DSPE. Em certas formas de realização, a N ω PE é NG-DOPE ou NG-DSPE.

Em formas de realização particulares, o TF é, por exemplo, asialoglicoproteína, folato, transferrina, etc. Em certas formas de realização, o TF é transferrina (Tf). Em algumas formas de realização, a TF-N ω PE é a TF-N ω PE (por exemplo, Tf-NG-DOPE ou Tf-NG-DSPE).

Em formas de realização particulares, o fármaco é, por exemplo, um agente anticâncer (por exemplo, oxaliplatina, inibidor da topoisomerase I, alcaloide da vinca, etc.). Em outras formas de realização, a mistura lipídica ou composição que contém lipossoma inclui um composto marcado. Em algumas formas de realização, a mistura lipídica ou

composição que contém lipossoma não inclui um composto marcado ou fármaco.

Como mencionado anteriormente, cada uma das misturas de lípidos pode ser misturada com uma solução aquosa para formar composições que contém lipossoma, e cada uma das composições que contém lipossoma pode ser tratada para formar os lipossomas correspondentes (por exemplo, lipossomas direcionados (por exemplo, que incorporam fármaco ou composto marcado), lipossomas intermediários, lipossomas em branco, etc.), como no presente documento descrito pormenorizadamente.

Com relação às variações dos métodos de produção no presente documento descritos, deseja-se que a modificação de NwPE com NHS, a modificação de NHS-NwPE com TF, a preparação de composições contendo lipossoma a partir de misturas lipídicas e a preparação de lipossomas a partir de composições que contém lipossoma possam ser efetuadas pelos peritos na especialidade como no presente documento descritas, sem experimentação desnecessária, à luz dos ensinamentos proporcionados na presente memória descritiva, incluindo, em particular, a descrição pormenorizada dos métodos de produção A e B e como apresentado nos exemplos.

Formulações Farmacêuticas

Também se descrevem no presente documento formulações farmacêuticas para tratamento ou de diagnóstico de indivíduos que delas necessitam, que compreendem composições que contém lípido no presente documento descritas e um ou mais veículos, excipientes, diluentes, estabilizantes, conservantes farmaceuticamente aceitáveis, ou outros ingredientes inativos, incluindo combinações dos citados anteriormente, conhecidos pelos peritos na especialidade, no presente documento descritos posteriormente.

Em certas formas de realização das formulações farmacêuticas, a composição que contém lípido é um

lipossoma direcionado como no presente documento descrito. Em outras formas de realização, a composição que contém lípido é uma composição que contém lipossoma. Em algumas formas de realização, a composição que contém lípido é um lipossoma direcionado. Em certas formas de realização, a composição compreende um fármaco. Em outras formas de realização, a composição compreende um composto marcado.

Em certas formas de realização, o veículo pode incluir um ou mais de água estéril, uma solução tampão ou soro fisiológico, diluente, e combinações destes.

As formulações farmacêuticas podem ainda compreender um ou mais de sais diferentes, açúcares, proteínas, amido, gelatina, óleos de plantas, polietileno glicol e semelhantes, incluindo combinações de dois ou mais dos citados anteriormente.

Também se descreve no presente documento a utilização das composições e formulações destas, como no presente documento descritas, no fabrico de um medicamento. Particularmente, o fabrico de um medicamento para utilização no tratamento ou de diagnóstico de condições no presente documento descritas. Além disso, as composições ativas e formulações destas, no presente documento descritas de várias formas, também se destinam à utilização no fabrico de um medicamento para utilização no tratamento ou de diagnóstico das condições e de acordo com os métodos no presente documento descritos, a não ser que indicado de outro modo.

Utilização das Composições

Administração

Também se descrevem no presente documento métodos de tratamento ou de diagnóstico das condições no presente documento descritas com a utilização das composições que contém lípido que possuem fármaco ou composto marcado (por exemplo, lipossomas direcionados, composições que contém lipossoma que possuem fármaco ou composto marcado) e

formulações farmacêuticas, como no presente documento descritas.

Numa forma de realização, os métodos podem ser praticados como uma abordagem terapêutica em direção ao tratamento das condições no presente documento descritas. Dessa forma, numa forma de realização específica, as composições que contêm lípido que possuem fármaco ou formulações farmacêuticas podem ser usadas para tratar as condições no presente documento descritas em indivíduos que delas necessitam, incluindo seres humanos. Os métodos geralmente compreendem a administração ao indivíduo de uma quantidade de uma composição, ou formulação no presente documento descrita, eficaz para tratar a condição.

Em outra forma de realização, os métodos podem ser praticados como uma abordagem diagnóstica em direção ao diagnóstico das condições no presente documento descritas. Dessa forma, numa forma de realização específica, as composições que contêm lípido que possuem composto marcado, ou formulações farmacêuticas, podem ser usadas para o diagnóstico das condições no presente documento descritas em indivíduos que delas necessitam, incluindo seres humanos. Os métodos geralmente compreendem a administração ao indivíduo de uma quantidade de uma composição ou formulação no presente documento descrita eficaz para o diagnóstico da condição. Tal administração é geralmente efetuada em conjuntamente com métodos para detetar a condição.

Em algumas formas de realização, o indivíduo é um mamífero, incluindo, sem limitação, seres humanos, bovinos, cavalos, felinos, caninos, roedores ou primatas. Em outras formas de realização, o indivíduo é um ser humano.

Os termos "quantidade farmaceuticamente eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" referem-se a uma quantidade de uma composição suficiente para tratar um distúrbio, condição ou doença especificada, ou um ou mais

de seus sintomas e/ou para evitar a ocorrência da doença ou do distúrbio. Em reação aos cancros, uma quantidade farmacêuticamente ou terapeuticamente eficaz compreende uma quantidade suficiente para, dentre outras coisas, fazer com que um tumor encolha ou diminuir a taxa de crescimento do tumor.

Os termos "uma quantidade eficaz para diagnosticar" ou "quantidade diagnosticamente eficaz" ou "quantidades eficazes para diagnóstico", e cognatos destes, referem-se a uma quantidade de uma composição suficiente para diagnosticar um distúrbio, condição ou doença especificada e/ou uma ou mais de suas manifestações, em que o diagnóstico inclui a identificação da existência da doença e/ou detecção da extensão ou gravidade da doença. Por exemplo, em relação aos cancros, uma "quantidade diagnosticamente eficaz" compreende uma quantidade suficiente para detetar, por exemplo, a presença e/ou concentração de uma ou mais de células malignas, tumor (tumores) ou outra manifestação do cancro. Frequentemente, o diagnóstico será realizado com relação a um nível de detecção de base ou de fundo observado para indivíduos sem a condição. Níveis de detecção acima dos níveis de fundo ou de base (níveis de detecção elevados) são indicativos da presença e, em alguns casos, da gravidade da condição.

Quando usado em relação aos métodos de tratamento e ao utilização de composições que contêm lípido que possuem fármaco, um indivíduo "que dela necessite" pode ser um indivíduo que foi diagnosticado com, ou previamente tratado para, a condição a ser tratada. Com relação aos métodos de diagnóstico e à utilização de composições que contêm composto marcado, um indivíduo "que delas necessite" pode ser um indivíduo suspeito de ter uma condição, esteja em risco de adquirir uma condição (por exemplo, uma história familiar da condição, fatores de estilo de vida indicativos do risco para a condição (por exemplo, o fumo como um fator

de risco para cancro de pulmão, etc.)) ou que tenha previamente sido diagnosticado com a condição (por exemplo, diagnóstico pode incluir o monitoramento da gravidade (por exemplo, progressão/regressão) da doença ao longo do tempo e/ou em conjuntamente com terapêutica).

Em certas formas de realização, a condição a ser tratada ou diagnosticada é cancro. Em algumas formas de realização, o cancro pode ser um cancro gástrico, de cólon, colorretal ou de mama. Em certas formas de realização, o cancro é um cancro de cólon. Em outras formas de realização, o cancro é um cancro de mama. Ainda em outras formas de realização, o cancro é um cancro gástrico. Em algumas formas de realização, o cancro é cancro do pâncreas, cancro de pulmão de célula não pequena, cancro de pulmão de célula pequena, cancro cerebral, cancro hepático, cancro renal, cancro de próstata, cancro de bexiga, cancro de ovário ou malignidades hematológicas (por exemplo, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo, etc.).

As composições que contêm fármaco, incluindo formulações no presente documento descritas, podem ser usadas isoladamente ou em conjuntamente com (por exemplo, antes, concomitantemente ou após) outros modos de tratamentos (por exemplo, terapêutica anticancro adjuntiva, tratamentos de modalidade combinada). Por exemplo, em combinação com outros agentes terapêuticos (por exemplo, agentes quimioterápicos anticancro, como no presente documento descritos e conhecidos pelos peritos na especialidade (por exemplo, agentes alquilantes, taxanos, antagonista metabólico, antibiótico antitumoral, alcaloides de plantas, fármaco de terapêutica hormonal, fármaco de alvo molecular, etc.)), cirurgia e/ou radioterapia. Quando a condição que está a ser tratada for cancro, as composições no presente documento descritas poderão ser administradas em conjuntamente com um ou mais outros agentes anticancro ou compostos citotóxicos no presente

documento descritos e conhecidos na técnica, um ou mais agentes adicionais para reduzir a ocorrência e/ou gravidade de reações adversas e/ou manifestações clínicas destas, cirurgia (por exemplo, para remover um tumor ou nódulos linfáticos, etc.) ou radiação. Quando um ou mais de cirurgia ou radiação forem parte do regime de tratamento, as composições poderão ser administradas antes, concomitantemente ou após a radioterapia ou cirurgia. Da mesma forma, as composições e formulações destas, como no presente documento descritas, podem ser administradas antes, concomitantemente ou após a administração de um ou mais agentes anticâncer. Os lipossomas direcionados e formulações destes no presente documento descritos também podem ser administrados em conjuntamente com (por exemplo, antes, concomitantemente ou após) fármacos para alívio dos sintomas associados à condição ou ao regime de tratamento (por exemplo, fármacos para redução dos vômitos, da queda do cabelo, imunossupressão, diarreia, erupção cutânea, distúrbios sensoriais, anemia, fadiga, estomatite, síndrome mão-pé, etc.). Os lipossomas direcionados também podem ser administrados em mais de um estágio (incluindo por todo) do regime de tratamento (por exemplo, após e concomitantemente à cirurgia e após radioterapia, etc.).

As composições que contêm composto marcado, incluindo formulações no presente documento descritas, podem ser usadas isoladamente ou em conjuntamente com (por exemplo, antes, concomitantemente ou após) modos de tratamentos (por exemplo, terapêutica anticâncer acessória, tratamentos de modalidade combinada). Por exemplo, as composições podem ser usadas para monitorizar o progresso do tratamento. Por exemplo, para determinar se a condição que está a ser tratada é detetável antes, após ou concomitantemente a um regime de tratamento (como descrito acima em relação aos métodos de tratamento).

Em certas formas de realização, as composições são

administradas antes ou depois de cirurgia (por exemplo, remoção de um tumor ou nódulos linfáticos, etc.). Em outras formas de realização, as composições são administradas após cirurgia e antes, concomitantemente ou após radioterapia. A combinação ótima de um ou mais de cirurgia e/ou radioterapia, em conjuntamente com administração das composições no presente documento descritas e, opcionalmente, um ou mais agentes quimioterápicos adicionais, pode ser determinada por um médico assistente com base no indivíduo e levando-se em consideração os vários fatores relacionados ao indivíduo em particular, incluindo aqueles no presente documento descritos.

Em formas de realização particulares, as composições que contêm fármaco ou formulações farmacêuticas podem ser administradas em combinação com um ou ambos de 5-fluorouracil e/ou leucovorin. Em outras formas de realização, a composição que contém fármaco ou as formulações farmacêuticas podem ser administradas em combinação com um ou mais outros fármacos anticancerígenos, tais como capecitabina, UFT/LV (tegafur-uracil e leucovorin), irinotecan, anticorpo anti-EGFR (por exemplo, cetuximab, etc.), anticorpo anti-VEGF (por exemplo, avastin, etc.), inibidor de tirosina quinase (por exemplo, erlotinib), etc. Essa administração também pode ser combinada com um regime de tratamento que inclui radioterapia e/ou cirurgia. Em certas formas de realização, o fármaco encapsulado no lipossoma direcionado e oxaliplatina.

Em conjuntamente com os métodos de utilização no presente documento descritos, as composições que contêm lípido ou formulações farmacêuticas descritas no presente documento podem ser administradas parentericamente. A administração parentérica pode ser efetuada por meio de injeção em bolo (IV), infusão (IV), injeção intraperitoneal, ou por meio de injeção local (por exemplo,

injeção intracraniana). Em algumas formas de realização, a administração é por meio de injeção em bolo ou infusão contínua.

A infusão intravenosa contínua pode ser administrada ao longo de um período de minutos ou horas. Por exemplo, sem limitação, de cerca de 10 minutos a cerca de 5 horas, de cerca de 15 minutos a cerca de 4 horas; de cerca de 30 minutos a cerca de 4 horas; de cerca de 45 minutos a cerca de 4 horas, de cerca de 60 minutos a cerca de 4 horas, de cerca de 45 minutos a cerca de 3 horas, de cerca de 60 minutos a cerca de 2 horas, de cerca de 90 minutos a cerca de 3 horas, de cerca de 90 minutos a cerca de 2 horas, cerca de 10 minutos, cerca de 15 minutos, cerca de 20 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 45 minutos, cerca de 50 minutos, cerca de 60 minutos, 80 minutos, cerca de 1,5 horas, cerca de 2 horas, cerca de 2,5 horas, cerca de 3 horas, cerca de 3,5 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 12 horas, cerca de 24 horas, cerca de 36 horas ou cerca de 48 horas.

Formulação e Dosagem

Como previamente observado, as composições que contêm lípido e as formulações farmacêuticas no presente documento descritas podem ser administradas aos indivíduos que delas necessitam para o tratamento ou de diagnóstico de condições no presente documento descritas em conjuntamente com os métodos de utilização no presente documento descritos.

As composições que contêm lípido no presente documento descritas e, em particular, os lipossomas direcionados no presente documento descritos, serão usados geralmente numa quantidade eficaz para obter o resultado desejado, por exemplo, numa quantidade eficaz para tratar ou evitar a condição em particular que está a ser tratada. A composição (composições) pode ser administrada terapeuticamente para se obter o benefício terapêutico. Benefício terapêutico significa a erradicação ou melhora do distúrbio subjacente

que está a ser tratado e/ou a erradicação ou melhora de um ou mais dos sintomas associados ao distúrbio subjacente, de tal modo que o paciente relate uma melhora dos sintomas ou da condição, apesar de o paciente ainda estar afetado pelo distúrbio subjacente. Benefício terapêutico também inclui a interrupção ou diminuição da progressão da doença, independentemente se essa melhora é ou não percebida.

Em algumas formas de realização, quando a condição que está a ser tratada for um cancro, uma quantidade eficaz será uma quantidade suficiente para reduzir o crescimento tumoral (por exemplo, como medido pela taxa de aumento do volume tumoral médio antes e/ou depois do tratamento). Em certas formas de realização, uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para diminuir o volume tumoral médio (por exemplo, quando o volume tumoral médio após tratamento for reduzido, comparado com o volume tumoral médio antes do tratamento).

A quantidade de composições administrada a fim de administrar uma quantidade eficaz de fármaco encapsulado (por exemplo, oxaliplatina) dependerá de vários fatores, incluindo, por exemplo, da condição em particular que está a ser tratada, do modo de administração, da gravidade da condição que está a ser tratada e da idade e do peso do paciente, da biodisponibilidade da composição, dos efeitos adversos apresentados pelo indivíduo que está a ser tratado, etc. A determinação de uma dosagem eficaz está incluída nos conhecimentos dos peritos na especialidade à luz dos ensinamentos no presente documento proporcionados.

Em certas formas de realização, a dose de oxaliplatina encapsulada administrada num ponto no tempo em particular estará no intervalo de cerca de 1 a cerca de 400 mg/m²/dia. Por exemplo, no intervalo de cerca de 1 a cerca de 350 mg/m²/dia, 1 a cerca de 300 mg/m²/dia, 1 a cerca de 250 mg/m²/dia, 1 a cerca de 200 mg/m²/dia, 1 a cerca de 150 mg/m²/dia, 1 a cerca de 100 mg/m²/dia, de cerca de 5 a

cerca de 80 mg/m²/dia, de cerca de 5 a cerca de 70 mg/m²/dia, de cerca de 5 a cerca de 60 mg/m²/dia, de cerca de 5 a cerca de 50 mg/m²/dia, de cerca de 5 a cerca de 40 mg/m²/dia, de cerca de 5 a cerca de 20 mg/m²/dia, de cerca de 10 a cerca de 80 mg/m²/dia, de cerca de 10 a cerca de 70 mg/m²/dia, de cerca de 10 a cerca de 60 mg/m²/dia, de cerca de 10 a cerca de 50 mg/m²/dia, de cerca de 10 a cerca de 40 mg/m²/dia, de cerca de 10 a cerca de 20 mg/m²/dia, de cerca de 20 a cerca de 40 mg/m²/dia, de cerca de 20 a cerca de 50 mg/m²/dia, de cerca de 20 a cerca de 90 mg/m²/dia, de cerca de 30 a cerca de 80 mg/m²/dia, de cerca de 40 a cerca de 90 mg/m²/dia, de cerca de 40 a cerca de 100 mg/m²/dia, de cerca de 80 a cerca de 150 mg/m²/dia, de cerca de 80 a cerca de 140 mg/m²/dia, de cerca de 80 a cerca de 135 mg/m²/dia, de cerca de 80 a cerca de 130 mg/m²/dia, de cerca de 80 a cerca de 120 mg/m²/dia, de cerca de 85 a cerca de 140 mg/m²/dia, de cerca de 85 a cerca de 135 mg/m²/dia, de cerca de 85 a cerca de 135 mg/m²/dia, de cerca de 85 a cerca de 130 mg/m²/dia ou de cerca de 85 a cerca de 120 mg/m²/dia. A dose administrada num ponto no tempo em particular também pode ser de cerca de 130 mg/m²/dia, cerca de 120 mg/m²/dia, cerca de 100 mg/m²/dia, cerca de 90 mg/m²/dia, cerca de 85 mg/m²/dia, cerca de 80 mg/m²/dia, cerca de 70 mg/m²/dia, cerca de 60 mg/m²/dia, cerca de 50 mg/m²/dia, cerca de 40 mg/m²/dia, cerca de 30 mg/m²/dia, cerca de 20 mg/m²/dia, cerca de 15 mg/m²/dia ou cerca de 10 mg/m²/dia.

A dose administrada pode ser maior ou menor do que os intervalos de dosagens no presente documento descritas, dependendo, dentre outros fatores, da biodisponibilidade da composição, da tolerância do indivíduo aos efeitos secundários adversos, do modo de administração e de vários fatores discutidos acima. A quantidade e o intervalo das dosagens podem ser ajustados individualmente para fornecerem níveis plasmáticos da composição que sejam

suficientes para manter o efeito terapêutico, de acordo com a avaliação do médico responsável. Os peritos na especialidade serão capazes de aperfeiçoar as dosagens locais eficazes sem experimentação desnecessária à luz dos ensinamentos no presente documento proporcionados.

As dosagens também podem ser estimadas com a utilização de modelos animais *in vivo*, como será observado pelos peritos na especialidade.

Doses múltiplas (por exemplo, contínuas ou em bolo) das composições no presente documento descritas também podem ser administradas aos indivíduos que delas necessitam no curso de horas, dias, semanas ou meses. Por exemplo, sem limitação, diariamente, em dias alternados, a cada 10 dias, semanalmente, mensalmente, duas vezes por semana, três vezes por semana, duas vezes ao mês, três vezes ao mês, quatro vezes ao mês, cinco vezes ao mês, em meses alternados, a cada três meses, a cada quatro meses, etc.

Kits

Também são proporcionados kits para administração das composições no presente documento descritas, incluindo formulações farmacêuticas que compreendem as composições.

Em certas formas de realização, os kits podem incluir uma quantidade de dosagem (por exemplo, como usada para terapêutica ou de diagnóstico) de pelo menos uma composição que contém lípido, ou formulação farmacêutica desta, como no presente documento revelado. Os kits podem ainda compreender embalagem e/ou instruções adequadas para utilização da composição. Os kits também podem compreender um meio para a libertação da composição, ou formulação farmacêutica desta, como, por exemplo, uma seringa para injeção ou outro dispositivo como no presente documento descrito e conhecido pelos peritos na especialidade.

Em algumas formas de realização, os kits podem incluir uma quantidade de dosagem (por exemplo, como usada para terapêutica ou de diagnóstico) de um lipossoma direcionado,

ou formulação farmacêutica deste, como no presente documento revelado. Os kits podem ainda compreender embalagem e/ou instruções adequadas para utilização da composição. Os kits também podem compreender um meio para a libertação da composição, ou formulação farmacêutica desta, como, por exemplo, uma seringa para injeção ou outro dispositivo como no presente documento descrito e conhecido pelos peritos na especialidade. Adicionalmente, em certas formas de realização, o kit pode conter uma quantidade de dosagem separada do fármaco ou do composto marcado a ser incorporada no lipossoma direcionado.

Adicionalmente, a composição que contém lípido, ou formulação farmacêutica desta, pode ser montada na forma de kits. O kit proporciona a composição que contém lípido, ou formulação farmacêutica desta, e reagentes para o preparo de uma composição para administração. A composição pode estar numa forma seca ou liofilizada, ou numa solução, particularmente uma solução estéril. Quando a composição estiver numa forma seca, o reagente poderá compreender um diluente farmacêuticamente aceitável para a preparação de uma formulação líquida. Tais diluentes incluem aqueles conhecidos pelos peritos na especialidade, por exemplo, soluções de açúcar, por exemplo, dextrose, sacarose, etc. Em certas formas de realização, os kits podem incluir soluções de açúcar de cerca de 1 % a cerca de 20 %, cerca de 1 % a cerca de 18 %, cerca de 1 % a cerca de 15 %, cerca de 1 % a cerca de 10 %, cerca de 3 % a cerca de 10 %, cerca de 3 % a cerca de 6 %, cerca de 1 %, cerca de 2 %, cerca de 3 %, cerca de 4 %, cerca de 5 %, cerca de 6 %, cerca de 7 %, cerca de 8 %, cerca de 9 %, cerca de 10 %, cerca de 12 %, cerca de 15 %, cerca de 18 % ou cerca de 20 % de açúcar. Em certas formas de realização, a solução pode ser uma solução de dextrose (por exemplo, cerca de 1 %, cerca de 2 %, cerca de 5 % de dextrose, etc.). Em certas formas de realização, a composição que contém lípido pode ser, por

exemplo, um lipossoma direcionado, um lipossoma direcionado, uma mistura lipídica ou composição que contém lipossoma (contendo opcionalmente fármaco ou composto marcado).

O kit também pode conter um dispositivo para administração ou para a libertação das composições, incluindo, sem limitação, seringa, pipeta ou outro dispositivo conhecido pelos peritos na especialidade. Quando em forma húmida, a composição pode ser armazenada numa ampola ou outro recipiente estéril selado, incluindo aqueles conhecidos pelos peritos na especialidade.

Os kits podem incluir outros compostos terapêuticos para utilização em conjuntamente com os compostos no presente documento descritos. Numa forma de realização, os agentes terapêuticos são outros agentes anticâncer. Esses agentes podem ser proporcionados numa forma separada, ou misturados com os compostos descritos no presente documento, desde que a mistura não reduza a eficácia do agente terapêutico adicional das composições e formulações no presente documento descritas. Da mesma forma, os kits podem incluir agentes adicionais para terapêutica auxiliar. Por exemplo, agentes para redução dos efeitos adversos do fármaco (por exemplo, agentes antiemético, agentes antialopecia, agentes imunoestimulantes, etc.).

Os kits incluirão instruções apropriadas para a preparação e administração da composição, os efeitos secundários das composições e qualquer outra informação relevante. As instruções podem estar num formato adequado, incluindo, sem limitação, material impresso, fita de vídeo, disco legível por computador ou disco ótico.

Também se descrevem no presente documento kits para o tratamento de um indivíduo que sofre ou está sujeito às condições no presente documento descritas, que compreendem um primeiro recipiente que compreende uma quantidade de dosagem de uma composição que contém lípido, ou formulações

destas, como no presente documento reveladas, e instruções para utilização. O recipiente pode ser qualquer um dos conhecidos na técnica e adequados para armazenamento e libertação de formulações intravenosas. Em certas formas de realização, o kit ainda compreende um segundo recipiente que compreende um veículo, diluente, adjuvante farmacologicamente aceitável, etc. para a preparação da composição a ser administrada ao indivíduo.

Também podem ser proporcionados kits que contêm dosagens suficientes das composições, ou formulações destas, como no presente documento reveladas, para proporcionar tratamento eficaz para um indivíduo por um período prolongado, por exemplo, uma semana, 2 semanas, 3, semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses ou mais.

Os kits também podem incluir múltiplas doses da composição que contém lípido, ou formulações desta, e instruções para utilização e embalagem em quantidades suficientes para armazenamento e utilização em farmácias, por exemplo, farmácias hospitalares e farmácias de medicamentos.

EXEMPLOS

A presente invenção é ainda descrita com referência aos seguintes Exemplos.

Exemplo 1: Teste de Citotoxicidade para Oxaliplatina

Uma solução de oxaliplatina (l-OHP) foi preparada dissolvendo-se oxaliplatina numa solução de sacarose a 9 % (sacarose/água destilada) numa concentração de 8 mg/ml. A viabilidade celular foi determinada com a utilização de um kit de ensaio de citotoxicidade disponível comercialmente (kit WST-1, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japão).

Células AsPC-1 (proporcionadas pelo Dr. Hironobu Yanagie do "Research Center for Advanced Science and Technology", Universidade de Tóquio, Japão) cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com FCS 10 % (soro fetal de

bezerro; SIGMA, USA) foram tratadas com concentrações de soluções de l-OHP [$200 \times (1/2)^{(0-10)}$ nm] a 37 °C em CO₂ 5 % durante 48 horas. A seguir, o meio foi removido e um substrato (WST-1, "Cell Counting Kit", Dojindo Laboratories, Japão) foi adicionado às células que foram incubadas a 37 °C em CO₂ 5 % durante 2 horas para o desenvolvimento do produto colorido. A cor desenvolvida foi medida numa absorvância de 450 nm (comprimento de onda de referência: 620 nm) num Immuno Mini NJ-2300 (Cosmo Bio Co., Ltd., Japão).

Os resultados são mostrados na Figura 6. Verificou-se que a citotoxicidade de l-OHP era de LD₅₀ > 8 µg/ml.

Exemplo 2: Determinação do Número de Recetores de Transferrina na Superfície Celular

Leucócitos humanos normais e linhas celulares humanas malignas derivatizadas de tumores (K562, MKN45P e HL60) foram usados na experiência e obtidos da seguinte forma: K562:TKGO 210 (*Cell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Department, Aging and Cancer, Universidade de Tohoku, Japão*); MKN45P: Dr. Hisae Iinuma, Escola de Medicina da Universidade de Teikyo, Japão; HL60:TKG0345 (*Cell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Department, Aging and Cancer, Universidade de Tohoku, Japão*).

O número de recetores de Tf (transferrina) na superfície celular de cada foi determinado por análise de Scatchard (*Comp. Biochem. Physiol.*, 116B, 137-160 (1949), usando o programa Excel da Microsoft). Uma solução de Tf marcada com ¹²⁵I (Na-¹²⁵I (PerkinElmer Japan Co., Ltd., Japão) e h-Tf (T-4132, SIGMA, EUA) foi combinada pelo método iodogen (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 319-325 (1984)) e foi adicionada a cada cultura de células em diferentes concentrações variando de [$300 \times (1/2)^{(0-9)}$ nm] a 4 °C e incubada durante 1 hora.

A concentração de Tf marcada com ¹²⁵I foi determinada

por ensaio de quantificação de proteínas pelo método de Lowry (*J. Biol. Chem.*, 193, 265-270 (1951)) e a radioatividade foi medida usando um contador gama (Auto Well Gamma System ARC-300, Aloka Co., Ltd., Japão). Resumidamente, a solução foi centrifugada para precipitar as células, e a fração celular foi lavada com um PBS arrefecido em gelo (180 x g (gravidade)), durante 3 minutos, o que foi repetido 3 vezes, seguido pela medida de radioatividade com um contador gama para determinar a concentração de Tf ligada à superfície celular. O número de células foi determinado por ensaio de quantificação de proteínas, usando o método de Lowry (*J. Biol. Chem.*, 193, 265-270 (1951)).

Para cada ponto de dados, a concentração de Tf não ligada foi determinada subtraindo-se a concentração de Tf ligada da concentração conhecida de Tf adicionada. O gráfico de Scatchard foi desenhado colocando-se a concentração de Tf ligada no eixo horizontal e a razão da concentração de Tf ligada em relação à concentração de Tf não ligada no eixo vertical. O número de Tf ligada (isto é, o número dos recetores) foi determinado a partir da interceptação de x do gráfico, como descrito em *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 2.263-2.266 (1983); *J. Cell Physiol.*, 132, 492-500 (1987); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 3.318-3.322 (1995); *J. Pharm. Sci.*, 84, 216-220 (1995); *Eur. J. Biochem.*, 186, 367-373 (1989); *J. Biol. Chem.*, 258, 4.715-4.724 (1983).

Os números de ^{125}I -Tf ligada a superfície celular nos diferentes tipos celulares são mostrados na Figura 7. Foi determinado que o número de recetores de transferrina (Tf) na superfície celular das linhas celulares derivatizadas de tumores humanos malignos foi significativamente maior do que em leucócitos normais.

Exemplo 3: Preparação de NHS-NG-DOPE

Uma massa de 200 mg de NG-DOPE (Avanti Polar Lipids,

Inc., EUA; N° de Catálogo 870242, PM 880.13) foi pesada num balão cônico com 2 pernas. Ao balão, foram adicionados 39,2 mg de NHS (Sigma, EUA, PM = 115,09). A seguir, 5 ml de clorofórmio/acetato de etilo (1:1 (v/v) Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japão) foram adicionados e turbilhonados até começar a dissolver a NG-DOPE e NHS. Observou-se uma ligeira turvação.

Após a mistura inicial, foi adicionada uma barra de agitação e o balão preparado (balão preenchido com gás de azoto) para soprar gás de azoto gentilmente numa perna do balão, e selado com uma rolha de borracha. A agitação sob azoto foi efetuada usando-se uma barra de agitação e uma placa de agitação. A segunda perna foi selada com um tubo. A reação foi executada em temperatura ambiente (20-23 °C). A mistura foi agitada durante 5-10 minutos. Uma amostra de 20 µl de mistura de reação lípido + NHS foi deixada de lado para utilização como um controlo de TLC.

Num balão separado, uma solução de DCC (99 %, Aldrich, EUA, PM: 206,33 g/mol) foi preparada dissolvendo-se 70 mg de DCC em 5 ml de acetato de etilo. A DCC se dissolveu rapidamente no solvente para gerar uma solução transparente. A solução de DCC assim preparada (aproximadamente 5 ml) foi então adicionada gota a gota na mistura de reação lípido/NHS ao longo de um período de 10 15 minutos. A mistura de reação tornou-se mais turva com a adição de DCC.

TLC foi realizada no controlo (lípido/NHS) e numa alíquota de lípido/NHS/DCC no momento 0 para referência, como se segue. A amostra foi colocada a 50 µg (2,5 µl de 20 mg/ml) na placa de TLC (folha de alumínio/sílica gel 60F254 de EM Science (Gibbstown, NJ, EUA) N° de Catálogo SP05554M), seca e depois posicionada na câmara de desenvolvimento, onde foi permitido que o solvente (clorofórmio 70 %, metanol 28 %, água 2 %) migrasse. A frente de solvente foi marcada, e depois a placa de TLC foi

mergulhada em molibdato de amónio (molibdato de amónio 5 % em H_2SO_4 10 %) e desidratada com secador.

A mistura de reação lípido/NHS/DCC foi agitada sob fluxo de azoto e a formação de produto foi monitorizada (R_f 0,3-0,4) ao longo do tempo.

Após 18 horas, a conversão em NHS-NG-DOPE não era uma conversão completa, e mais NHS (26 mg em 2 ml de acetato de etilo) e DCC (47 mg em 1 ml de acetato de etilo) foram adicionados. A progressão da reação foi novamente testada por TLC em $T = 20$ horas.

Permitiu-se que a reação prosseguisse ao longo do fim de semana em temperatura ambiente com fluxo de azoto e agitação (protegida da luz). Alguns materiais de partida permaneceram antes da purificação.

Purificação: As misturas de reação foram arrefecidas em gelo durante ~30 minutos. A mistura de reação arrefecida foi então filtrada através de um funil de Buckner e depois lavada 3 vezes com 2 x 5 ml de clorofórmio. Todo o líquido obtido foi colhido e seco por evaporação giratória. Uma pasta semissólida foi obtida após evaporação. A pasta foi então ressuspensa em 2-3 ml de clorofórmio.

A sílica gel para purificação da pasta suspensa foi preparada usando 4 g de sílica (trama 400), hidratada em clorofórmio. A sílica gel foi compactada numa coluna de 1 cm x 28 cm com válvula reguladora. O tamanho aproximado do leito foi de 1 cm x 14 cm. A coluna foi equilibrada com clorofórmio (compactado por gravidade).

A amostra foi carregada na coluna equilibrada (mas não seca) de sílica gel. Foram adicionados 10 ml de clorofórmio à coluna (5 x 2 ml), e foram colhidas frações de 5 x 2 ml. A taxa de fluxo era função da gravidade, mas frações de 5 x 10 ml foram colhidas em 10-20 minutos e designadas frações 1-5.

A seguir, foram adicionados 50 ml de clorofórmio/metanol (90/10, vol/vol) à coluna (5 x 10 ml),

e foram colhidas frações de 5 x 10 ml e designadas frações 6-10.

Após a coleta das frações 6-10, um volume de 100 ml de clorofórmio/metanol (5/1 (v/v)) foi adicionado à coluna (10 x 10 ml), e foram colhidas frações adicionais de 10 x 10 ml, e designadas frações 11-15.

As frações 6-15 foram testadas (alíquota de 5 µl) por TLC da forma descrita acima.

Após TLC das frações 6-15, as frações 7-11 foram reunidas em *pool* e secas até uma película fina usando evaporação giratória. O produto final obtido após a evaporação era de 130 mg (65 % de rendimento), como determinado por TLC contra o produto de reação não purificado e comparação com um produto-padrão (NHS-NG-DOPE) obtido de NOF (Japão).

Exemplo 4: Preparação de NHS-NG-DOPE

NG-DOPE pré-preparada e purificada (200 mg) (NOF Corporation, Japão) e NHS (N-hidroxissulfosuccinimida; 34 mg) foram pesadas e colocadas num balão cônico de 5 ml com 2 aberturas. Uma abertura foi selada com uma rolha de borracha e foi adicionada uma barra de agitação através da abertura restante.

O balão foi então colocado sob vácuo e preenchido com gás azoto com fluxo suave (repetido três vezes). O balão foi então mantido sob azoto com a utilização de um balão de azoto.

Após colocação sob azoto, foram adicionados ao balão 2,5 ml de clorofórmio seco, que foram agitados com a utilização da barra de agitação e da placa de agitação. A reação foi executada em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos e o turbilhonamento foi utilizado para dissolver os materiais de partida. Uma amostra de 20 µl de lípido + NHS foi colocada de lado para utilização no controlo de TLC/monitoramento da reação.

Uma solução de 61 mg de DCC (1,3-

diciclohexilcarbodiimida) dissolvida em 2,5 ml de clorofórmio seco (transparente, dissolvido rapidamente) foi então preparada. A solução de DCC foi adicionada gota a gota à mistura lípido/NHS ao longo de um período de 15 minutos. A solução tornou-se nebulosa mediante a adição de DCC.

No momento 0, foi realizada uma TLC (clorofórmio 70 %, 30 % metanol, água 5 %) no lípido/NHS e lípido/NHS/DCC para monitorizar a reação colocando-se 50 mg de clorofórmio na placa de TLC, permitindo-se que secasse, e foi então colocada na câmara de reação (clorofórmio 70 %, 30 % metanol, água 5 %) para migrar.

A mistura de reação continuou com agitação sob fluxo de azoto, e a formação de produto (R_f 0,3 - 0,4) foi monitorizada ao longo do tempo.

Permitiu-se que a reação prosseguisse ao longo de um período de tempo de 2-3 dias em temperatura ambiente com fluxo de azoto e agitação.

A mistura de reação foi então filtrada através de um funil de Bruchner e lavada duas vezes com 2 x 5 ml de clorofórmio. Toda a solução foi colhida e seca por evaporação giratória. Foi obtida uma pasta semissólida.

A pasta semissólida foi ressuspensa em 2 x 3 ml de clorofórmio, e depois filtrada e seca. Esse processo foi repetido três vezes. Finalmente, após três vezes, o produto foi ressuspensa em 2 x 3 ml de clorofórmio.

Uma coluna de sílica gel foi preparada misturando-se sílica em clorofórmio, e foi então compactada numa coluna de 1 cm x 28 cm com válvula reguladora. O tamanho aproximado do leito da coluna era de 1 cm x 14 cm. A coluna foi equilibrada com clorofórmio (compactado por gravidade).

As amostras foram carregadas na coluna de sílica gel equilibrada (mas não seca). A seguir, foram acrescentados 100 ml de clorofórmio à coluna, e foram colhidas alíquotas em frações de 100 ml. A taxa de fluxo era função da

gravidade (Fração 1).

Fração 1. Adicionados 100 ml de clorofórmio/metanol (90/10, vol/vol) à coluna. Colhidas frações de 100 ml (Fração 2).

Adicionados 200 ml de clorofórmio/metanol (50/10, vol/vol) à coluna (20 x 10 ml). Colhidas frações de 20 x 10 ml (Fração 3 - 23).

As frações 1 a 23 foram testadas usando alíquotas de 5 ml por meio de TLC.

As frações 9 a 22 foram reunidas em *pool* e secas até uma película fina usando evaporação giratória e liofilização. O peso final de NHS-NG-DOPE dessas frações foi de 61,9 mg (27,9 % de rendimento).

Exemplo 5: Preparação de Mistura Lipídica (NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH)

583 mg de DMPC (NOF Corporation, Japão), 299 mg de colesterol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japão) e 75,7 mg de NG-DOPE (NOF Corporation, Japão) foram misturados e dissolvidos em t-BuOH (10 v/p vs. lípidos (10 ml)) a 45-50 °C.

A solução resultante foi deitada num balão e congelada durante cerca de 8 horas numa prateleira a -40 °C. Ela foi despressurizada a cerca de 0,1 mmHg e mantida em pressão reduzida durante 2 dias com elevação da temperatura de -40 °C a 25 °C em etapas, e, por esse processo, foi obtida uma mistura lipídica liofilizada.

Um pó da mistura lipídica liofilizada obtida acima foi misturado com 2 0 mg de Tf-NG-DOPE em pó (como preparado no Exemplo 29) e triturado. Desse modo, foi obtido um pó homogêneo da mistura, com uma razão lipídica de 50:45:5 (DMPC:Col:NG-DOPE+Tf-NG-DOPE).

Exemplo 6: Preparação de Composições que Contêm Lipossoma

Foram preparadas misturas de lípidos de acordo com os exemplos prévios com os componentes pormenorizados abaixo:

Entrada 1: DMPC/Col/NG-DOPE (155 mg/79,4 mg/16,1 mg)

Entrada 2: DMPC/Col/NG-DOPE (155 mg/79,4 mg/16,1 mg)

Entrada 3: DMPC/Col/NG-DOPE/NHS-NG-DOPE (152 mg/77,9 mg/15,8 mg/4,38 mg)

Entrada4: DMPC/Col/NG-DOPE/NHS-NG-DOPE (152mg/77,9 mg/15,8 mg/4,38 mg)

Entrada5: DMPC/Col/NG-DOPE/Tf-NG-DOPE (148 mg/76,0 mg/15,4 mg/4,8 mg)

Entrada6: DMPC/Col/NG-DOPE/Tf-NG-DOPE (148 mg/76,0 mg/15,4 mg/4,8 mg)

Cada uma das entradas 1, 3 e 5 foi hidratada e agitada com 3 00 mM de solução aquosa de sacarose (20 v/p vs. lípidos (5 ml)) (5 ml de solução de sacarose (20 v/p) foram adicionados à mistura lipídica seca e agitados) durante 3 0 minutos a 40-45 °C. Cada uma das entradas 2, 4 e 6 foi hidratada e agitada com uma solução aquosa de l-OHP (8 mg l-OHP/ml, 20 v/p vs. lípidos (5 ml) numa solução 300 mM de sacarose) durante 30 minutos a 40-45 °C. Desse modo, foi obtida uma mistura contendo lipossoma.

O diâmetro do lipossoma foi determinado por QELS e os resultados são mostrados na Figura 8. Os lipossomas presentes na mistura contendo lipossoma têm um diâmetro médio de 500-2.000 nm e uma ampla distribuição de tamanhos em torno de 100-10.000 nm.

Exemplo 7: Preparação de Lipossoma que Contêm Oxaliplatina (NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH)

A composição do lipossoma foi como se segue:

Dimiristoil fosfatidilcolina (1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina : DMPC) (NOF Corporation, Japão)

Colesterol (CH) (Solvay Pharmaceuticals B.V., Holanda)

N-glutaril-dioleoil fosfatidil etanolamina (N- glutaril-1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, sal sódico: DOPE-CO-(CH₂)₃-COOH; a seguir no presente documento representado por NG-DOPE) (NOF Corporation, Japão)

Succ-N-glutaril-dioleoil fosfatidil etanolamina (N-(succinimidil-glutaril)-1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-

fosfoetanolamina, sal sódico: DOPE-CO- $(CH_2)_3$ -CO-OSu; a seguir no presente documento representado por NHS-NG-DOPE) (NOF Corporation, Japão) DMPC:CH:NG-DOPE:NHS-NG-DOPE = 50:45:4:1(m/m).

Como a fase aquosa, foi usada uma solução aquosa de 2-OHP (8 mg/ml, numa solução de sacarose 300 mM).

Uma mistura de DMPC, CH, NG-DOPE e NHS-NG-DOPE (na razão molar de 50:45:4:1) foi dissolvida em 4 v/p (vs. peso total de lípidos) de solvente etanol/t-butanol/água morna. A solução lipídica foi injetada em solução de sacarose 300 mM contendo cerca de 8 mg/ml de 1-OHP a aproximadamente 45 °C, de tal forma que a concentração do solvente tornou-se cerca de 14 % v/v.

A suspensão foi passada através de um Extrusor que foi embalado sobre cinco pedaços de filtros de 100 nm (N° de Catálogo 112105, Whatman plc, GB) sob pressão de cerca de 1.378,95-5.515,80 kPa a aproximadamente 45 °C. O lipossoma foi assim obtido, tendo um diâmetro médio de aproximadamente 100 nm. O diâmetro do lipossoma foi determinado usando QELS.

Seis litros de soro fisiológico tamponado com fosfato (pH 7,9), 6 litros de solução de transferrina (N° de Catálogo 4455, Selorogicals, GA, EUA) (20 mg/ml) e 18 litros de suspensão de lipossomas foram misturados e agitados a 30 °C durante 15-60 minutos. Isso resultou numa mistura de reação que continha 4 mg/ml de transferrina e 20 mg/ml de lípidos.

A análise quantitativa de transferrina foi realizada pelos ensaios de ácido bicinconínico (BCA) de acordo com instruções proporcionadas pelo vendedor.

O aumento do peso molecular após a incorporação de transferrina foi investigado por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida Sódio Dodecil Sulfato). A análise de NG-DOPE foi realizada por cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) com detetor de dispersão de luz

evaporativa (ELSD2000, Alltech, MD, EUA) usando uma coluna Silicagel (YMC PVA Silica Column, 4,6 x 250 mm, 5 µm).

Exemplo 8: Preparação de Lipossoma que Contêm Oxaliplatina (NG-DSPE:TF-NG-DSPE:DSPC:CH)

A composição do lipossoma foi como se segue:

Diestearoil fosfatidilcolina (1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina: DSPC) Colesterol (CH)

N-glutaril-diestearoil fosfatidil etanolamina (N-glutaril-1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, sal sódico: DSPE- (CH₂)₃-COOH; a seguir no presente documento representado por NGDSPE)

DSPC:CH:NG-DSPE = 2:1:0,2 (mol/mol).

Como a fase aquosa, foi usada uma solução aquosa de 1-OHP (8 mg/ml, numa solução de sacarose a 9 %), como descrito no Exemplo 1.

Uma mistura de DSPC (MC8080, NOF, Japão), colesterol (038-03005, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japão) e NG-DSPE (Dr. Kazuo Maruyama, Universidade de Teikyo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Japão) na razão de 2:1:0,2 (m/m) foi dissolvida em clorofórmio e éter isopropílico.

À solução resultante, foi adicionada uma solução de 1-OHP (numa solução de sacarose a 9 %), e depois a mistura resultante foi sonificada durante cerca de 15-30 minutos. A solução foi então evaporada por evaporação giratória a 60 °C para remover o solvente e o congelamento/descongelamento foi repetido cinco vezes. A suspensão foi congelada (por meio de imersão em banho de gelo seco/acetona) e descongelada (deixando-a em repouso e por meio de imersão em água morna). Isso foi repetido cinco vezes.

A seguir, o produto resultante foi dimensionado a 60 °C usando filtros de Extrusor (duas vezes a 400 nm e depois cinco vezes a 100 nm), (Lipex™ Extruder, Modelo N° T001, Northern Lipids Inc., Canadá) e ultracentrifugado (200.000 x g, 60 minutos, cerca de 4 °C). O precipitado foi

ressuspenso numa solução de sacarose a 9 % ou tampão MES (pH 5,5) (tampão MES. N° de Catálogo 345-01625, Dojindo Laboratories, Japão) para obter lipossoma NG-DSPE:DSPC:CH com 1-OHP encapsulada.

Subsequentemente, o lipossoma NG-DSPE:DSPC:CH com 1-OHP encapsulada foi derivatizado com transferrina (Tf). Ao lipossoma NG-DSPE com 1-OHP encapsulada assim obtido, foram adicionados cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC; N° de Catálogo #22980, Pierce Biotechnology, Inc., EUA) (numa quantidade de 2,7 % em relação ao peso do lípido) e N-hidroxissulfossuccineimida (S-NHS; 038-0432, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japão) (numa quantidade de 7,3 % em relação ao peso do lípido), e a mistura foi deixada em temperatura ambiente durante 10 minutos.

A seguir, à solução resultante, foi adicionada transferrina (Tf) (numa quantidade de 20 % em relação ao peso do lípido); (N° de Catálogo T4132, SIGMA, EUA) e agitada em temperatura ambiente durante 3 horas. Uma solução 1 mM em PBS (soro fisiológico tamponado com fosfato) de transferrina (Tf) (numa quantidade de 20 % em relação ao volume da mistura de reação total) e PBS 1 mM foram adicionados (numa quantidade de 20 % em relação ao volume da mistura de reação total), e a solução resultante agitada em temperatura ambiente durante 1 hora.

À forma apo assim obtida do lipossoma Tf-NG-DSPE, 10-40 eq. (vs. transferrina) de citrato de ferro-citrato de sódio (Wako Pure Chemical Industries; Ltd., Japão) foram adicionados à suspensão e agitados em temperatura ambiente durante 15 minutos. A solução resultante foi ultrafiltrada como acima. O precipitado foi então ressuspenso numa solução de sacarose a 9 %, através da qual foi obtida uma forma holo do lipossoma Tf-NG-DSPE. A solução foi ultrafiltrada (200.000 x g, 60 minutos, cerca de 4 °C) e depois o precipitado foi ressuspenso numa solução de

sacarose a 9 %.

A análise quantitativa de transferrina foi realizada pelos ensaios de ácido bicinconínico (BCA), realizados de acordo com as instruções do vendedor (Nº de Catálogo 23227, BCA™ Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Inc., EUA).

O aumento do peso molecular mediante derivatização foi investigado por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida Sódio Dodecil Sulfato). A análise de NG-DSPE foi realizada por cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) com detetor de dispersão de luz evaporativa (ELSD2000, Alltech, MD, EUA) usando uma coluna Silicagel (YMC PVA Silica Column, 4,6 x 250 mm, 5 µm).

Exemplo 9: Preparação de Lipossomas que Contêm Oxaliplatina PEGuilados

Após o protocolo experimental no Exemplo 8, foram preparados lipossomas DSPC:colesterol:DSPE-PEG(2K)-OMe:DSPE-PEG(3,4K)-COOH (lipossomas Tf-PEG). Nesses lipossomas, a razão de componentes foi como se segue: DSPC:colesterol:DSPE-PEG(2K)-OMe:DSPE-PEG(3,4K)-COOH = 2:1:0,16:0,03.

Esse lipossoma continha 6 % por mol de PEG-lípido e 1 % por mol de PEG-COOH-lípido, e Tf é ligada ao lipossoma através de PEG-COOH.

Também foram feitos pelo método de Exemplo 8 lipossomas Tf/PEG-DSPE (lipossomas Tf/PEG-NG-DSPE).

Nesses lipossomas, a razão de componentes foi como se segue: DSPC:colesterol:DSPE-PEG(2K)-OMe:NG-DSPE = 2:1:0,16:0,03.

Esse lipossoma é derivatizado com PEG, e a Tf foi ligada ao lipossoma através de NG-DSPE. Lipossomas derivatizados com PEG também podem ser produzidos pelos métodos descritos nas Publicações de Pedidos de Patente US Nº 2003/0224037 e 2004/0022842.

Exemplo 10: Preparação de Lipossoma em Branco

Uma mistura de DMPC, Col (Wako Pure Chemical

Industries, Ltd., Japão), NG-DOPE (NOF Corporation, Japão) e NHS-NG-DOPE (NOF Corporation, Japão) (na razão molar de 50:45:4:1; 410 g de DMPC, 211 g de Col, 43 g de NG-DOPE e 12 g de NHS-NG-DOPE, respetivamente) foi dissolvida em 4 v/p (vs. peso total de lípidos) de solvente etanol/t butanol/água morna. A suspensão resultante, com um volume de 20 litros, foi incubada a 45 °C com agitação e passada através de um Extrusor (Stevested Machinery & Engineering Ltd., Canadá) que foi embalado com uma pilha de cinco filtros de polycarbonato 100 nm (N° de Catálogo 112105, Whatman pie, UK) sob pressão de cerca de 1.378,95-5.515,80 kPa, a aproximadamente 45 °C. Dessa forma, foram obtidos os lipossomas, com um diâmetro médio de aproximadamente 100 nm. O diâmetro dos lipossomas foi determinado por QELS.

Suspensão de lipossomas, tampão de PBS (pH 7,9) e solução de transferrina em PBS (N° de Catálogo 4455, Selorogicals, GA, EUA) (pH 7,0) foram misturados na razão de 3:1:1 (v/v), e depois agitados durante 15-60 minutos a 30 °C. Aproximadamente 6 litros de lipossomas direcionados foram obtidos desse modo.

Vinte gramas (cerca de 19 ml) de solução de lipossoma foram deitados num balão, e congelados por cerca de 8 horas numa prateleira a -40 °C. Ela foi despressurizada a cerca de 0,1 mmHg e mantida na pressão reduzida durante 2 dias com elevação da temperatura de -40 °C a 25 °C em etapas, ao longo de um período de 2 dias. Ao término desse processo, cerca de 3,5 g de lipossoma direcionado liofilizado foram obtidos. Os lipossomas foram subsequentemente armazenados a 4 °C.

Exemplo 11: Encapsulação de Oxaliplatina em Lipossoma Direcionado Pré-Preparado

Uma solução aquosa de l-OHP (8 mg/ml, numa solução de sacarose 300 mM) foi adicionada a cerca de 3,5 g de lipossomas em branco liofilizados, e reidratada por agitação por 2 horas a 40 °C. Após agitação, a 2-OHP

lipossômica foi separada da 1-OHP livre por fracionamento usando Sephadex G-25 ($\varnothing 1 \times 45$ cm). A 1-OHP lipossômica e a 1-OHP livre foram monitorizadas por VIS 600 nm e UV 210 nm, respetivamente.

A quantidade de 1-OHP e de colesterol foi medida. A concentração de 1-OHP foi calculada para o caso de condensação da fração lipossômica até a concentração original de colesterol; finalmente, o rendimento de 2-OHP foi medido por comparação da concentração de 1-OHP do lipossoma e uma concentração de alimentação de 1-OHP.

A concentração total de 1-OHP para o caso de condensação da fração lipossômica até a concentração original de colesterol foi de 210 $\mu\text{g/ml}$, e o rendimento de 1-OHP foi de 2,6 %.

Isso indica que 210 $\mu\text{g/ml}$ de 1-OHP foram encapsulados no lipossoma direcionado liofilizado.

Exemplo 12: Comparação dos Níveis de Lipossomas no Sangue e Órgãos

Foi realizado um estudo comparativo para avaliar a retenção sanguínea e o acúmulo em órgãos de composições de lipossomas com 2-OHP encapsulada modificadas por Tf em ratinhos que apresentam tumor. Machos de ratinhos BALB/c com idade de 5 semanas foram usados como os modelos animais, e células de Cólon 26 (derivatizadas de cancro de cólon de ratinho) foram utilizadas como as células tumorais. As células foram obtidas do *Laboratory of Biopharmaceutics*, Universidade de Teikyo, Escola de Ciências Farmacêuticas, Japão.

As células de Cólon 26 (2×10^6 células) subcultivadas *in vitro* foram implantadas por via subcutânea na região dorsal dos ratinhos. Um ratinho com um tumor com um diâmetro de cerca de 8 a 10 mm (após crescimento de 8 a 10 dias, em média) foi usado como o ratinho que apresenta cancro de cólon. Uma solução de cada um dos lipossomas preparada nos Exemplos 5 e 6 ou 1-OHP (8 mg/ml numa solução

de sacarose a 9 %) foi injetada na veia do rabo. A concentração de oxaliplatina foi ajustada a 5 mg de l-OHP/kg de peso corporal em cada caso. Como lipossomas, foram usados lipossomas Tf-NG-DSPE ((■); Exemplo 5), lipossomas Tf/PEG-NG-DSPE ((▲); Exemplo 6) e lipossomas Tf-PEG-DSPE ((◆); Exemplo 6).

Sangue, plasma, fígado, baço, rim, coração, pulmão e tecidos tumorais foram colhidos de 3 ratinhos em cada ponto no tempo para cada grupo em 1, 3, 6, 24, 48 e 72 horas após a administração. A concentração de Pt no sangue, em cada órgão e em tecidos tumorais foi determinada usando absorção atômica (AA), e a concentração de l-OHP foi calculada e registada como a razão (%) para a dose. As concentrações no sangue são mostradas na Figura 9.

O lipossoma Tf-NG-DSPE mostrou substancialmente a mesma retenção sanguínea até 3 horas após a administração, comparado com o lipossoma Tf-PEG-DSPE e com o lipossoma Tf/PEG-NG-DSPE. No entanto, após 6 horas, o lipossoma Tf-NG-DSPE mostrou alguma retenção sanguínea, mas ela desapareceu mais rapidamente do sangue, comparado com os lipossomas de PEG. As concentrações nos tecidos tumorais são mostradas na Figura 10. O lipossoma Tf-NG-DSPE mostrou substancialmente o mesmo acúmulo em tecidos tumorais que o lipossoma Tf-PEG-DSPE e que o lipossoma Tf/PEG-DSPE, apesar de ser retido numa menor concentração no sangue ao longo do tempo.

A partir dos resultados acima, verificou-se que cerca de 6 horas de tempo de retenção no sangue após administração são necessárias e suficientes para libertar uma concentração suficiente de um fármaco ao tecido tumoral num nível significativo ou maior em ratinhos. Considera-se que um tempo de retenção no sangue maior do que esse pode aumentar a possibilidade de causar um efeito adverso num tecido normal.

Exemplo 13: Preparação de Lipossoma de Diagnóstico e Acúmulo de ^{125}I em Tecido Tumoral

Foram preparados lipossomas da mesma forma que no Exemplo 7, com a exceção de que [^{125}I]-Tiraminil inulina (em solução de PBS) substituiu l-OHP, e foram obtidos lipossomas de DMPC/CH/NG-DOPE/Tf-NG-DOPE/[^{125}I]-Tiraminil inulina. Os componentes lipídicos também foram obtidos como descrito no Exemplo 7. Foram preparadas duas formulações de lipossomas, com os componentes mostrados a seguir. O lipossoma desprovido de Tf-NG-DOPE serviu como controle para a distribuição não direcionada do lipossoma.

Lipossoma Direcionado: DMPC/CH/NG-DOPE/Tf-NG-DOPE (63,3/31,7/4/1 (m/m))

Lipossoma Não Direcionado (controle): DMPC/CH/NG-DOPE (63,3/31,7/5 (m/m))

^{125}I estava ligado à tiraminil inulina por combinação de Na- ^{125}I (PerkinElmer Japan Co., Ltd., Japão) e tiraminil inulina (Dr. Kazuo Maruyama, Universidade de Teikyo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Japão) usando o método *iodogen* (Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 319-325 (1984)). Dessa forma, foi obtida ^{125}I -Tiraminil inulina. Solução de ^{125}I -Tiraminil inulina/PBS(-) numa concentração de cerca de 1 mg/ml foi então encapsulada no lipossoma, como descrito no Exemplo 7.

100 µl de cada uma das soluções de lipossomas foram injetados na veia do rabo de ratinhos murídeos que apresentam cancro de cólon descritos no Exemplo 12. Foi colhido tecido tumoral e do rabo de 5 ratinhos em cada ponto no tempo para cada grupo em 1, 6, 24 e 48 horas após a administração. O peso do tecido tumoral foi medido, e a radioatividade (unidade: cpm) no tecido tumoral e no rabo foi medida usando um contador gama ("Aloka Auto Gamma System ARC-300", Japão). Os resultados foram avaliados como a quantidade de distribuição no tecido tumoral (% de dose/g-tumor) = [(valor da contagem no tecido tumoral) -

$(\text{valor de b.g.}) \times 100 / [(\text{valor da contagem do padrão}) - (\text{valor da contagem no rabo})] / (\text{peso de tecido tumoral (g)})$. A semivida radioativa de ^{125}I é de aproximadamente 60 dias.

A radioatividade de 100 μl da solução administrada (padrão: Std.) foi definida como 100 %, e o valor da contagem de um tubo de ensaio vazio foi definido como o valor do nível de fundo (b.g.). Os resultados são mostrados na Figura 11. Como fica evidente pela análise da Fig. 11, lipossoma modificado com Tf mostra alto acúmulo para um tecido tumoral, enquanto lipossomas não direcionados não exibem um acúmulo elevado. Esses resultados demonstram que lipossomas que encapsulam um composto radioativo são úteis para a detecção de tecido tumoral.

Exemplo 14: Comparação de Efeitos Antitumorais de Lipossomas

Foi realizado um estudo comparativo para avaliar os efeitos antitumorais sobre ratinhos com cancro de cólon. Cólon 26 para composições de lipossomas com l-OHP encapsulada modificadas por Tf (lipossomas Tf-PEG preparados no Exemplo 9, lipossomas Tf-NG-DSPE:NG-DSPE:DSPC:CH preparados no Exemplo 8, lipossomas Tf/PEG-NG-DSPE preparados no Exemplo 9; 9 ratinhos em cada grupo) e para cada uma das composições de lipossomas às quais transferrina não está ligada ((-) TF6 ratinhos em cada grupo).

Os ratinhos que apresentam tumor foram preparados da mesma forma que no Exemplo 12. Como controlo, foi usada uma solução de l-OHP (8 mg/ml numa solução de sacarose a 9 %). A data quando l-OHP foi administrada em doses de 5 mg/kg foi definida como a data de partida e, no 4º dia, l-OHP foi administrada em doses de 5 mg/kg novamente. O tamanho do tumor no dia 0 foi definido como 1, e o tamanho foi mostrado como a razão com base nesse tamanho de partida. O tamanho do tumor foi medido no dia 0 e nos 2º, 5º, 7º, 10º,

13°, 15°, 18° e 21° dias e os dias de sobrevivência foram avaliados.

Os resultados são mostrados na Figura 12.

Como pode ser observado na Figura 12, as composições de lipossomas às quais transferrina está ligada exibiram um efeito inibidor sobre o crescimento tumoral. Por outro lado, as composições de lipossomas às quais transferrina não está ligada tiveram um efeito mais fraco sobre o crescimento tumoral, comparadas com aquelas composições de lipossomas às quais transferrina foi ligada. A partir dos resultados revelados nas Figuras 9 e 10, verificou-se que cerca de 6 horas do tempo de retenção no sangue após administração são necessárias e suficientes para que um lipossoma ao qual transferrina está ligada tenha um efeito inibidor sobre o crescimento tumoral e faça com que a concentração de um fármaco que se acumula num tecido tumoral seja significativa e substancialmente o mesmo nível. Considera-se que um tempo de retenção no sangue mais longo do que esse possa aumentar a possibilidade de causar um efeito adverso sobre um tecido normal.

Exemplo 15: Otimização do Teor de NG-DSPE

A fim de determinar a razão de mistura ótima de NG-DSPE num lipossoma, foi investigada a retenção sanguínea de NG-DSPE na qual um agente anticâncer não era encapsulado em ratinhos normais. Foram preparadas composições de lipossomas nas quais um agente anticâncer não foi encapsulado da mesma forma que no Exemplo 8, mas usando água em vez de uma solução de 1-OHP como a fase aquosa, com quantidades diferentes de NG-DSPE.

A quantidade molar total dos componentes lipídicos totais que constituem um lipossoma é definida como 100 %, e os teores de NG-DSPE são mostrados como a razão (% por mol) de NG-DSPE em relação aos componentes lipídicos totais. Além disso, um lipossoma que contém 6 % por mol de lípido MPB (MPB-DSPE) ou lípido PDP (PDP-DSPE) como o constituinte

lipídico também foi preparado. O lipossoma MPB é obtido por formação de um lipossoma ligando-se maleimida-fenilbutirato (MPB) ao grupo amino da etanolamina do lípido, e ligando-se Tf ao lipossoma através de MPB (870013(16:0), Avanti Polar Lipids, Inc, EUA). O lipossoma PDP (870205 (16:0, "Avanti Polar Lipids", Inc, EUA)) é obtido por formação de um lipossoma ligando-se 2-piridiltio propionato (PDP) ao grupo amino da etanolamina do lípido, e ligando-se Tf ao lipossoma através de PDP.

Na experiência, foram usados 105 ratinhos (machos ICR, 6 semanas de idade) (Tokyo Laboratory Animal Science Co., Ltd., Japão). Como rastreador, ^{125}I foi ligado à tiraminil-inulina, (preparada como descrito no Exemplo 13) e essa solução de inulina numa concentração de cerca de 1 mg/ml foi encapsulada no lipossoma. O peso do sangue e dos órgãos colhidos para cada caso foi medido, e a radioatividade (unidade: cpm) do lipossoma marcador foi medida usando um contador gama (Aloka Auto Gamma System ARC-300, Japão). Além disso, a radioatividade de cada solução administrada (100 μl) à veia do rabo foi medida. A radioatividade de 100 μl da solução administrada (padrao: Std.) foi definida como 100 %, e o valor (% de dose) para cada órgão foi expresso como uma percentagem. A quantidade total de sangue foi estimada como sendo 7,3 % do peso corporal, e a quantidade de lipossoma no sangue foi expressa como a quantidade no sangue total. O valor da contagem de um tubo de ensaio vazio foi definido como o valor do nível de fundo (b.g.), que foi subtraído do valor da contagem para cada amostra.

Quantidade de distribuição no sangue (%) = [(valor da contagem do sangue) - (valor de b.g.)] x (peso corporal do ratinho (g)) x 0,073 x 100 / [(valor da contagem do padrão) - (valor da contagem do rabo) x (peso de sangue (g))].

Os resultados são mostrados na Figura 13. Com relação à concentração no sangue após 6 horas, o lipossoma NG-DSPE mostra alta retenção sanguínea quando o teor lipídico é de

3 % por mol ou maior. Como ocorre para o lipossoma de maleimida (MPB 6 %), a retenção sanguínea foi baixa.

Exemplo 16: Efeito de Tf e Ácido Dicarboxílico na Retenção Sanguínea

A fim de investigar os efeitos da presença ou ausência da transferrina ligada ao lipossoma e dos tipos de ácidos dicarboxílicos (por exemplo, glutarilo, succinilo, etc.), foi examinada a retenção sanguínea de um lipossoma ligado à transferrina em que um agente anticâncer não era encapsulado em ratinhos normais. O método experimental foi o mesmo como descrito no Exemplo 15.

Foi preparado um lipossoma contendo um fosfolípido ao qual ácido succínico foi ligado em vez de ácido glutárico.

NG-DSPE (glutárico) foi preparada da seguinte forma. No escuro, sob um jato de gás de azoto, DSPE (ME-8080, NOF Corporation, Japão) foi suspensa em clorofórmio desidratado de 10 vezes o volume de DSPE. A seguir, 1,3 quantidades equivalentes de trietilamina (208-02643, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japão) foram adicionadas, e uma solução em clorofórmio desidratado de ácido glutárico anidro (G0071, Tokyo Chemical Industry, Japão) (dissolvido em clorofórmio desidratado do mesmo volume que DSPE) foi adicionada gota a gota em temperatura ambiente. Após o término, a solução foi feita reagir a 30 °C durante 2 horas durante agitação.

A seguir, a solução de reação foi lavada 3 vezes com um tampão de acetato (pH 4,5), e a camada orgânica foi desidratada com sulfato de magnésio e filtrada por filtração por sucção com um aspirador de fluxo de água. A seguir, o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida a 30 °C. Quando ela tornou-se oleosa (cerca de 2 vezes o volume de DSPE), foi adicionado metanol para formar cristais, e depois filtrada. Ela foi dissolvida em clorofórmio novamente, e esse procedimento foi repetido duas vezes. A seguir, o cristal foi seco sob pressão

reduzida em temperatura ambiente, através do qual foi obtido um produto alvo como um cristal branco. O lipossoma NG-DSPE foi preparado pelo mesmo método que no Exemplo 8.

Os resultados são mostrados na Figura 14. O lipossoma ao qual transferrina está ligada através de ácido dicarboxílico (NG-DSPE: N-glutaril-diestearoil fosfatidil etanolamina, NS-DSPE: N-succinil-diestearoil fosfatidil etanolamina) mostra alta retenção sangüínea. No entanto, no caso do lipossoma ao qual transferrina está ligada através de uma ligação S-S por maleimida (MPB), a retenção sangüínea foi baixa, embora o mesmo ligando, transferrina, estivesse ligado.

Exemplo 17: Análise Eletroforética de Lipossomas

Como um exemplo dos métodos analíticos para caracterização dos lipossomas, é mostrado um exemplo de eletroforese. O lipossoma foi dissolvido e desnaturado a 95 °C durante 5 minutos em tampão de amostra contendo 25 % de SDS e 5 % de 2-mercaptoetanol. Usando gel de poliacrilamida de cerca de 75 % a 10 % (Funakoshi, Easy gel (II), gel pré-moldado, Japão), 5 µl de cada amostra foram aplicados no gel, e a eletroforese foi realizada sob uma corrente constante de 20 mA durante 1 a 2 horas.

Após a eletroforese, o gel foi corado com prata com um kit de coloração com prata (Wako Pure Chemical Industries, Silver Staining II Kit Wako, Japão). Os resultados são mostrados na Figura 15 para os seguintes lipossomas: pista 6 (lipossoma transferrina-N-glutaril-diestearoil fosfatidil etanolamina (lipossoma Tf-NG-DSPE)); pista 5 (lipossoma transferrina-polietilenoglicol-diestearoil fosfatidil etanolamina (lipossoma Tf-PEG-DSPE)). As pistas 1-4 contêm h-apo-Tf (240 ng), h-apo-Tf (120 ng), h-apo-Tf (60 ng) e h-apo-Tf (30 ng), respectivamente.

No caso do exemplo comparativo, o lipossoma Tf-PEG-DSPE, como o polietilenoglicol tem alguma distribuição de peso molecular, surgiu uma imagem complicada de

eletroforese com várias bandas. No caso do lipossoma Tf-NG-DSPE, apareceu uma única banda, que é bem mais facilmente analisada e aumenta a habilidade para purificar o lipossoma. Esses resultados indicam que, para a composição de lipossoma de acordo com a presente invenção, um método de ensaio analítico é mais simples do que para uma composição de lipossoma derivada por PEG.

Exemplo 18: Efeito de PE Livre sobre Composições de Lipossoma

A fim de investigar os efeitos da presença de fosfatidil etanolamina livre (não-NG-PE) num lipossoma, a capacidade de ligação de Tf foi medida para o lipossoma Tf-NG-DSPE e para um lipossoma preparado por adição de diestearoil fosfatidil etanolamina (DSPE) (sem NG presente). O lipossoma Tf-NG-DSPE foi preparado a partir de DSPC (64 partes), CH (32 partes) e NG-DSPE (4 partes), e o lipossoma Tf-NG-DSPE + DSPE foi preparado a partir de DSPC (64 partes), CH (32 partes), NG-DSPE (4 partes) e DSPE (10 partes) da mesma forma que no Exemplo 8.

Subsequentemente, Tf foi ligada à NG-DSPE pela utilização de 10 quantidades equivalentes de NHS e ECD/HCl e 0,05 quantidades equivalentes de Tf. A seguir, as amostras de lipossoma numa quantidade que corresponde a 1 mg de lípido foram separadas por SDS-PAGE, e as bandas foram visualizadas por coloração por prata como descrito no Exemplo 17.

Os resultados são mostrados na Figura 16. Verificou-se que, no caso do lipossoma NG-DSPE + DSPE ao qual 10 % por mol de DSPE foram adicionados, a quantidade ligada de Tf era significativamente baixa, comparada com a do lipossoma NG-DSPE que não continha não-NG-DSPE. É provável que isso ocorra porque o grupo amino de Tf e o grupo amino de DSPE competem entre si na reação, em que Tf é ligada ao grupo carboxilo de NG-DSPE.

Exemplo 19: Comparação de Níveis de Lipossoma no Sangue e nos Órgãos

Com a utilização dos protocolos descritos no Exemplo 12, foram comparados os níveis de lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH (Tf-NG-DOPE:NG-DOPE) (preparados como no Exemplo 7) e lipossomas Tf-PEG-DSPE (preparados como no Exemplo 9) no sangue e no tumor. Os resultados para a quantidade de lipossoma retida no sangue são revelados na Figura 17, e a quantidade de lipossoma detetada em tumores é mostrada na Figura 18.

Os resultados nas Figuras 17 e 18 mostram que, embora os lipossomas Tf-NG-DOPE:NG-DOPE mostrem um menor acúmulo no sangue (Fig. 17) do que os lipossomas Tf-PEG-DSPE, eles foram capazes de libertar uma quantidade maior de oxaliplatina ao tumor (Fig. 18). Provavelmente, o acúmulo menor de lipossomas no sangue reduz os efeitos sistêmicos adversos da oxaliplatina.

Exemplo 20: Comparação dos Efeitos Antitumorais dos Lipossomas em Ratinhos com Tumor de Cólon 26

Com a utilização dos protocolos descritos no Exemplo 14, foram comparados os efeitos de lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH (preparados como no Exemplo 7) e lipossomas Tf-PEG-DSPE (preparados como no Exemplo 9) sobre tumores de cólon 26 em ratinhos. Os resultados são revelados na Figura 19.

Como pode ser observado na Figura 19, ambos os lipossomas mostram uma inibição do crescimento tumoral comparados com a solução de oxaliplatina; no entanto, como observado no Exemplo 19, o menor acúmulo de NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH no sangue (plasma) significa provavelmente que esses lipossomas são mais bem tolerados pelos indivíduos aos quais são administrados.

Exemplo 21: Efeitos Antitumorais dos Lipossomas sobre o Modelo de Xenoenxerto de Tumor de Cólon HCT-116

Foi estudada a eficácia antitumoral dos lipossomas NG-

DOPE :Tf-NG-DOPE:DMPC:CH (preparados como no Exemplo 7) quando administrados contra xenoenxertos de tumor de colon humano HCT-116 implantados por via subcutânea. O teste foi realizado no Southern Research Institute, AL, EUA, em machos de ratinhos atímicos NCr-nu (02/A/08F17T9, Frederick Cancer Research and Development Center, MD, EUA; 50 ratinhos), com oxaliplatina em solução usada como um composto de referência. A atividade antitumoral dos lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH é resumida na Figura 20.

Os lipossomas de NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH foram administrados por via intravenosa (i.v.) a cada quatro dias por quatro injeções (q4d x 4) como doses de 15 e 10 mg/kg/injeção. A oxaliplatina foi administrada no mesmo esquema, numa dose de 15 mg/kg/injeção. Grupos de controlo de veículo (cerca de 10,3 % de sacarose) e de lipossoma direcionado foram injetados na mesma proparação.

O volume tumoral médio para o modelo de tumor de cólon HCT-116, após tratamento com lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH a cada 4 dias, foi de 28,9 % do volume tumoral de controlo para o grupo de 15 mg/kg, e 35,9 % do volume tumoral de controlo para o grupo de 10 mg/kg. A atividade antitumoral dos lipossomas de NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH também foi comparada com oxaliplatina não lipossómica no modelo de HCT-116, em que os lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH mostraram maior eficácia em termos de volume tumoral relativo, quando administrados a 15 mg/kg (28,9 % do volume tumoral de controlo) a cada quatro dias (4x). Oxaliplatina não lipossómica libertada a 15 mg/kg a cada quatro dias (4x) gerou 39,3 % do volume tumoral de controlo.

Exemplo 22: Efeitos Antitumorais dos Lipossomas sobre o Modelo de Xenoenxerto de Tumor de Cólon HT-29

Foi estudada a eficácia antitumoral de lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH (preparados como no Exemplo 7)

quando administrados contra xenoenxertos de tumor de colon humano HT-29 implantados por via subcutânea. O teste foi realizado no Panapharm Laboratories Co., Ltd., Japão, em fêmeas de ratinhos atímicos BALB/cA Jcl nu (CLEA Japan, Inc., Japão; 50 ratinhos), e os resultados estão resumidos na Figura 21. Grupos de 4 ratinhos receberam a administração de lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH em doses de 6,7, 10 ou 15 mg/kg, ou controlo de veículo. O veículo e os grupos tratados com 6,7 e 10 mg/kg foram injetados no 10º, 14º e 19º dias, e o grupo tratado com 15 mg/kg foi injetado no 10º e 14º dias.

O volume tumoral médio para o modelo de tumor de cólon HT-29 após tratamento com lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH foi de 66,3 % do volume tumoral de controlo para o grupo de 6,7 mg/kg, e 395 % do volume tumoral de controlo para o grupo de 10 mg/kg (valor $p \leq 0,01$).

Exemplo 23: Efeitos Antitumorais dos Lipossomas sobre Modelo de Xenoenxerto de Tumor Gástrico MKN45

Foi estudada a eficácia antitumoral de lipossomas NG-DOPE :Tf-NG-DOPE:DMPC:CH (preparados como no Exemplo 7) quando administrados contra xenoenxertos de tumor gástrico humano MKN45 implantados por via subcutânea. O teste foi realizado no Panapharm Laboratories Co., Ltd., Japão, em machos de ratinhos atímicos BALB/cA Jcl-nu (CLEA Japan, Inc., Japão; 50 ratinhos) e está resumido Fig. 22.

Os grupos de 4 ratinhos receberam a administração de lipossomas de NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH em doses de 6,7, 10 ou 15 mg/kg, ou controlo de veículo. O grupo de veículo e os grupos tratados com 6,7 e 10 mg/kg foram injetados no 7º, 12º e 24º dias, e o grupo tratado com 15 mg/kg foi injetado no 7º e 24º dias. O volume tumoral médio para o modelo de tumor gástrico MKN45 após tratamento com lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH foi de 65,4 % do volume tumoral de controlo para o grupo de 6,7 mg/kg (valor $p 0,05$), 49,6 % do volume tumoral de controlo para o grupo

de 10 mg/kg (valor $p = 0,01$), e 485 % do volume tumoral de controlo para o grupo de 15 mg/kg (valor $p \leq 0,01$; libertado a cada 17 dias).

Exemplo 24: Efeitos Antitumorais dos Lipossomas sobre o Modelo de Xenoenxerto de Tumor de Cólon COLO 205

Foi estudada a eficácia antitumoral de lipossomas de NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH (preparados como no Exemplo 7) quando administrados contra xenoenxertos de tumor de colon humano COLO 205 implantados por via subcutânea. O teste foi realizado no Southern Research Institute, AL, EUA, em machos de ratinhos atímicos NCr-nu (01/A/09F3T8, Federic Cancer Research and Development Center, MD, EUA), com oxaliplatina em solução usada como composto de referência, e ele é resumido na Fig. 23.

Em 40 ratinhos, lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH foram administrados por injeção i.v. a cada quatro dias por três injeções (q4d x 3) em doses de 10 e 5 mg/kg/injeção. A oxaliplatina foi administrada numa dose de 5 mg/kg/injeção no mesmo esquema. O grupo de controlo foi injetado no mesmo esquema. Tumores em estágio avançado foram tratados de novo começando no 47º dia para todos os grupos.

Os lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH foram administrados em dias alternados por duas injeções em doses de 15 e 10 mg/kg/injeção, seguido por tratamento em dias alternados por seis injeções em doses de 4 e 2 mg/kg/injeção, respetivamente. A oxaliplatina foi administrada no mesmo esquema, em doses de 10 e 2 mg/kg/injeção. O grupo de controlo foi tratado no mesmo esquema.

O volume tumoral médio para o modelo de tumor de cólon COLO 205 após tratamento com lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH administrados inicialmente em doses de 10 e 5 mg/kg, com tratamento subsequente de estágio avançado, tumor tratado previamente com lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-

DOPE:DMPC:CH em doses de 15 e 10 mg/kg, seguido por lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH em doses de 4 e 2 mg/kg usando vários esquemas de tratamento, foi entre 53,2 % e 695 % do volume tumoral de controlo (valor $p \leq 0,05$ ou $0,01$).

Exemplo 25: Encapsulação de Oxaliplatina em Lipossomas Direcionados

A fim de medir a razão de oxaliplatina encapsulada em lipossomas de NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH (Tf-NG-DOPE:NG-DOPE) preparados como no Exemplo 7, foi usado o seguinte procedimento.

A extensão da encapsulação foi determinada passando-se uma alíquota da amostra por uma coluna em espiral de 3.000 MWCO (valor de corte do peso molecular) (coluna de membrana ultrafiltro de celulose 30K MWCO, N° de Catálogo 42410, Millipore Corp., EUA) e medindo-se a concentração de oxaliplatina no eluente usando HPLC com eluição isocrática de acetonitrilo 1 % em solução aquosa diluída de ácido fosfórico (pH 3,0).

O nível de oxaliplatina foi determinado após filtração em membrana usando análise HPLC para quantificar os níveis de fármaco não encapsulado (livre). As eficiências de captura de 3 lotes, preparados como no Exemplo 7, foram maiores do que 98 % (veja-se Quadro 1).

Quadro 1 A Razão de Encapsulação de Oxaliplatina em Lipossomas

Lote	I	II	III
% de encapsulação	98,8	99,6	99,1

Exemplo 26: pH dos Lipossomas Direcionados

O pH dos lipossomas direcionados pode ser determinado colocando-se os lipossomas da invenção em água destilada e medindo-se com um medidor padrão de pH, como descrito a seguir.

O pH dos lipossomas de NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH (preparados como no Exemplo 7) foi determinado por medidor de pH (VWR Modelo 8000), com um eletrodo preenchido com gel Ag/AgCl. Os valores de pH para 4 lotes de lipossomas variaram de pH 7,17-7,23, como mostrado no Quadro 2 a seguir.

Quadro 2 pH do Lipossoma

Lote	1	2	3	4
pH	7,17	7,17	7,23	7,20

A aparência dos lipossomas em pHs variados é resumida no Quadro 3. Esses resultados indicam que um pH baixo levou à agregação, sedimentação e precipitação, o que pode ser causado por protonação de NG-DOPE e Tf, seguida por agregação da bicamada e desnaturação de transferrina.

Quadro 3 Condição de Lipossoma em Vários Valores de pH

pH	Observações
7,19	Líquido, translúcido, rosa claro
6,98	Líquido, translúcido, sem alterações, comparado com nenhuma adição, rosa claro
6,83	Líquido, translúcido, sem alterações, comparado com nenhuma adição, rosa claro
6,37	Líquido, pequenos precipitados brancos mediante adição, que se limpa num minuto, comparado com nenhuma adição, rosa claro
5,53	Líquido, precipitados brancos mediante adição, que se limpa dentro de um minuto, mas é ligeiramente mais turvo, com cor ligeiramente branca
5,07	Líquido, pequenos precipitados brancos, turvo, de cor branca

4,33	Viscosidade aumentada, quantidade significativa de precipitados brancos, muito turvo, de cor branca
3,72	Muito viscoso, amostra não se move quando o tubo da microcentrífuga é acionado, de cor branca de cabeça para baixo, opaco, de cor branca

Exemplo 27: Identificação de Transferrina Conjugada e Padrão de SDS-PAGE de Transferrina em Lipossomas Direcionados

Esse estudo foi realizado para confirmar a conjugação de transferrina à NG-DOPE nos lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH preparados como no Exemplo 7. Quando a transferrina é conjugada à NG-DOPE, o complexo mostra um peso molecular maior do que transferrina não conjugada nesse método.

O lipossoma foi dissolvido e desnaturado a 95 °C durante 5 minutos em tampão de amostra contendo 25 % de SDS e 5 % de 2- mercaptoetanol. As amostras foram então aplicadas a um gel de poliacrilamida de gradiente 5-10 %, e depois foram submetidas à eletroforese na presença de SDS. As bandas de proteína migrada foram visualizadas com a utilização de um azul brilhante G-coloidal (B2025, SIGMA, EUA).

A transferrina no lipossoma foi detetada como transferrina conjugada à NG-DOPE, o que mostrou um peso molecular maior do que a de transferrina intata (veja-se a Fig. 24). Uma banda menor com um peso molecular menor foi detetada como transferrina livre.

A razão de transferrina livre em relação à transferrina conjugada à NG-DOPE na SDS-PAGE (Fig. 24) foi calculada como a área do pico usando Scion Image software (disponível livremente em www.microsoft.com/DirectX). A razão de Tf livre em Tf total do lipossoma NG-DOPE:Tf- NG-DOPE:DMPC:CH foi de aproximadamente 4,7 %.

Exemplo 28: Análise da Pressão Osmótica

A pressão osmótica em certa temperatura depende de sacarose e sais, tais como cloreto de sódio e tampão fosfato. Ela não depende do soluto, mas da densidade iônica total e do tamanho das moléculas dentro da solução. Normalmente, a pressão osmótica pode ser medida usando um instrumento conhecido como osmómetro, que mede a pressão osmótica em unidades de pressão adequadas.

A pressão osmótica de lipossomas NG-DOPE:Tf-NG-DOPE:DMPC:CH preparados como no Exemplo 7 em temperatura ambiente foi medida usando um osmómetro (Vapro Vapor Pressure Osmometer Modelo 5520, Wescor, Inc., EUA). Os valores de osmolaridade para 3 preparações de lipossomas variaram de 360-370 mOsm/kg, como registado no Quadro 4.

Quadro 4 Pressão de Osmolaridade

Lote	A	B	C
Osmolaridade (mOsm/Kg)	360	370	368

Exemplo 29: Isolamento de Tf-NG-DOPE

900 ml de EtOH foram adicionados a 100 ml de lipossoma direccionado (DMPC/Col/NG-DOPE/Tf-NG-DOPE) (como preparado no Exemplo 10, antes da liofilização), e agitados completamente. A mistura foi então centrifugada (9.000 rpm, 10 minutos, 20 °C; CF16RX, Hitachi Koki Co., Ltd., Japão) e foi obtido um pélete.

100 ml de EtOH foram então adicionados a esse pélete e agitados completamente. A mistura foi centrifugada (9.000 rpm, 10 minutos, 20 °C; CF16RX, Hitachi Koki Co., Ltd., Japão) novamente, e foi obtido um pélete esbranquiçado (laranja claro). Esse processo de lavagem foi repetido mais uma vez.

O pélete obtido acima foi seco com gás N₂ durante 30 minutos. O material seco foi então dissolvido em 10 ml de água destilada e passado através de um filtro estéril (0,22

µm) (Millipore Corp., EUA).

O filtrado foi deitado num balão e congelado por cerca de 8 horas numa prateleira a -40 °C. A amostra foi despressurizada a cerca de 0,1 mmHg e mantida sob pressão reduzida durante 2 dias com elevação da temperatura de -40 °C a 25 °C em etapas. Aproximadamente 444 mg de Tf-NG-DOPE (cerca de 45 % de teor de transferrina do lipossoma direcionado) foram obtidos dessa forma.

Exemplo 30: Preparação de Tf-NG-DSPE

200 µl de solução aquosa de NHS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japão) (0,1 mol/l), 200 µl de solução aquosa de EDC (cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Japão) (0,25 mol/l) e 1 ml de solução de NG-DSPE (2 mmol/l) contendo 2 % (p/v) de OG (n-octil-D-glucopiranosida) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japão) em 50 mmol/l de tampão MES (pH 5,5) foram misturados e agitados durante 10 minutos.

O excesso de reagentes foi eliminado por coluna Sephadex G-15 (1,5 cm x 20 cm, 0,1 % (p/v) de OG em 50 mmol/l de tampão HEPES (pH 8,0), GE Healthcare Bio-Sciences Corp., EUA) e fracionado a cerca de 1 ml/tubo.

5 ml de solução aquosa de transferrina a 1 % (Sigma, EUA) foram adicionados gota a gota às frações que contêm NG-DSPE, e agitados gentilmente durante 20 horas a 4 °C. A identificação foi por determinação MS de cada fração.

O produto de reação foi então fracionado a cerca de 1,7 ml/tubo por coluna TOYOPEARL HW-55S (1,5 cm x 45 cm, NaCl a 0,9 %, Tosoh Bioscience LLC, EUA); Tf-NG-DSPE foi estimado por espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS) e SDS-PAGE com coloração de CBB (Azul Brilhante Coomassie, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japão).

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 4169846 A [0012] [0338]
- US 5338874 A [0012] [0338]
- US 5298642 A [0012] [0338]
- US 5959133 A [0012] [0338]
- US 5420319 A [0012]
- US 5716988 A [0012]
- US 5290961 A [0012] [0338]
- US 4983397 A [0019] [0022]
- US 6476068 A [0019]
- US 5834012 A [0019]
- US 5756069 A [0019]
- US 6387397 A [0019]
- US 5534241 A [0019]
- US 4789633 A [0019]
- US 4925661 A [0019]
- US 6153596 A [0019]
- US 6057299 A [0019]
- US 5648478 A [0019]
- US 6723338 A [0019]
- US 6627218 A [0019]
- US 20030224037 A [0019] [0022] [0026] [0581]
- US 20040022842 A [0019] [0022] [0026] [0581]
- US 20010033860 A [0019]
- US 20030072794 A [0019]
- US 20030082228 A [0019]
- US 20030212031 A [0019]

- US 20030203865 A [0019]
- US 20040142025 A [0019] [0424]
- US 20040071768 A [0019]
- WO 0074646 A [0019]
- WO 9613250 A [0019]
- WO 9833481 A [0019]
- US 5013556 A [0022]
- US 6316024 A [0022] [0026]
- US 6056973 A [0022] [0026]
- US 5945122 A [0022]
- US 5891468 A [0022]
- US 6126966 A [0022]
- US 5593622 A [0022]
- US 5676971 A [0022]
- US 6586559 A [0022]
- US 5846458 A [0022]
- US 20030113262 A [0022]
- US 20020136707 A [0022]
- WO 9930686 A [0022]
- WO 0241870 A [0022]
- US 6228391 B [0022]
- US 6197333 B [0022]
- US 6046225 B [0022]
- US 5292524 B [0022]
- US 20050271588 A [0022]
- US 20040213833 A [0022]
- US 20040029210 A [0022]
- US 20030175205 A [0022]
- US 20030162748 A [0022]
- US 20030130190 A [0022]
- US 20030059461 A [0022]
- US 20020034537 A [0022]
- WO 9301828 A [0023] [0282]
- US 6936272 B [0024]
- US 6897196 B [0024]

- US 6077834 B [0024]
- US 20050136064 A [0024]
- US 20040234588 A [0024]
- US 20030215490 A [0024]
- US 20030166601 A [0024]
- US 20010038851 A [0024]
- US 5049390 A [0026]
- US 5780052 A [0026]
- US 5786214 A [0026]
- US 6245427 A [0026]
- US 6524613 A [0026]
- US 6749863 A [0026]
- US 6177059 A [0026]
- US 6530944 A [0026]
- US 2003143742 A [0026]
- US 20030228285 A [0026]
- US 20020198164 A [0026]
- US 20030220284 A [0026]
- US 20030165934 A [0026]
- US 20030027779 A [0026]
- WO 9533841 A [0026]
- WO 9519434 A [0026]
- WO 2001037807 A [0026]
- WO 9633698 A [0026]
- WO 200149266 A [0026]
- WO 9940789 A [0026]
- WO 9925320 A [0026]
- WO 9104014 A [0026]
- WO 9207959 A [0026]
- EP 1369132 A [0026]
- JP 2001002592 B [0026]
- EP 1209469 A1 [0029]
- WO 9604232 A1 [0030]
- JP H7501316 A [0282]
- US 5804552 A [0282]

- US 5554728 A [0282]
- JP 001261688 A [0283]
- US 4534899 A [0285]
- JP 9040685 A [0338]
- US 5026651 A [0365]
- US 4235871 A [0432] [0447]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **WILKES GM.** New therapeutic options in colon, cancer: focus on oxaliplatin. *Clin J Oncol Nurs*, 2006, vol. 6, 131-137 [0012]
- **PAPAHADJOPOLULOS D ; ALLEN TM ; GBIZON A et al.** Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1991, vol. 88, 11460-11464 [0019]
- **ALLEN TM ; MARTIN FJ.** Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Semin Oncol*, 2004, vol. 31 (13), 5-15 [0019]
- **WEISSIG et al.** *Pharm. Res.*, 1998, vol. 15, 1552-1556 [0019]
- **VAIL DM ; AMANTEA MA ; COLBERN GT et al.** Pegylated Liposomal Doxorubicin: Proof of Principle Using Preclinical Animal Models and Pharmacokinetic Studies. *Semin Oncol.*, 2004, vol. 31 (13), 16-35 [0021]
- **ALIMINANA et al.** *Prep. Biochem. Biotech.*, 2004, vol. 34 (1), 77-96 [0022]
- **PARK YS ; MARUYAMA K ; HUANG L.** Some negatively charged phospholipids derivatives prolong the liposome circulation in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, vol. 1108, 257-260 [0023]
- **AHL et al.** *Biochimica Biophys. Acta*, 1997, vol. 1329, 370-382 [0023]
- **IINUMA H ; MARUYAMA K et al.** Intracellular ''targeting

therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int J Cancer*, 2002, vol. 99, 130-137 [0026]

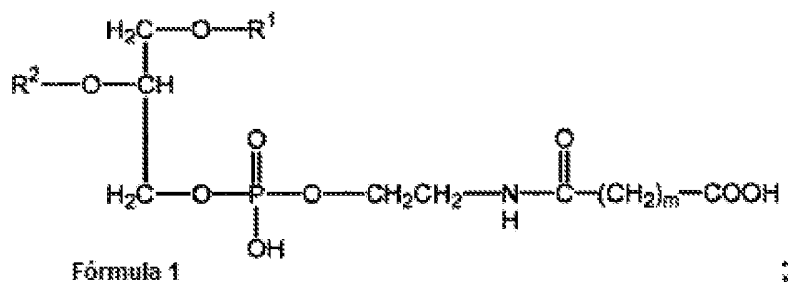
- **ISHIDA O ; MARUYAMA K ; TANAHASHI H ; IWATSURU M ; SASAKI K et al.** Liposomes bearing polyethylene glycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. *Pharmaceutical Research*, 2001, vol. 18, 1042-1048 [0026]
- **HOLMBERG et al.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1989, vol. 165 (3), 1272-1278 [0026]
- **NAM et al.** *J. Biochem. Mol. Biol.*, 1998, vol. 31 (1), 95-100 [0026]
- **NAG et al.** *J. Drug Target.*, 1999, vol. 6 (6), 427-438 [0026]
- **CHANEY SG et al.** Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 2005, vol. 53, 3-11 [0338]
- **SHINDELMAN JE ; ORTMEYER AE ; SUSSMAN HH.** Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer, tissue. Potential marker for identifying dividing cells. *Int J Cancer*, 1981, vol. 27 (3), 329-34 [0365]
- **LLOYD JM; O'DOWD T ; DRIVER M ; TEE DE.** Demonstration of an epitope of the transferrin receptor in human cervical epithelium--a potentially useful cell marker. *J Clin Pathol.*, 1984, vol. 37 (2), 131-5 [0365]
- **HABESHAW JA ; LISTER TA ; STANSFELD AG ; GREAVES MF.** Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, 1983, vol. 1 (8323), 498-501 [0365]
- European Pharmacopoeia [0382]
- *J. Colloid and Interface Sci.*, 1972, vol. 39, 670-675 [0407]
- **LIU et al.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, vol. 1104

- (1), 95-101 [0409]
- **HARASHIMA et al.** *J. Drug Target.*, 1995, vol. 3 (4), 253-261 [0409]
 - *Comp. Biochem. Physiol.*, 1949, vol. 116B, 137-160 [0521]
 - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, vol. 122, 319-325 [0521] [0595]
 - *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, 265-270 [0522]
 - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 2263-2266 [0523]
 - *J. Cell Physiol.*, 1987, vol. 132, 492-500 [0523]
 - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 3318-3322 [0523]
 - *J. Pharm. Sci.*, 1995, vol. 84, 216-220 [0523]
 - *Eur. J. Biochem.*, 1989, vol. 186, 367-373 [0523]
 - *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, 4715-4724 [0523]

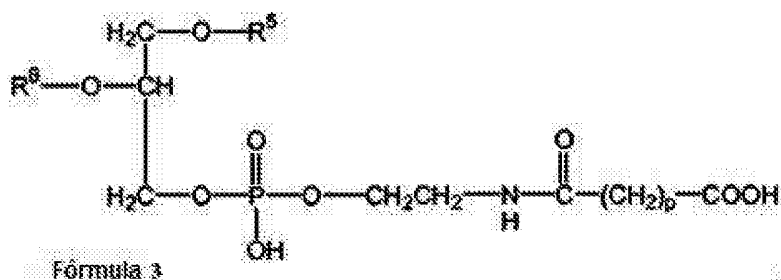
Lisboa, 3 de Fevereiro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um lipossoma direcionado que compreende:
 um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina,
 uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
 uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento,
 um fármaco encapsulado ou composto marcado e,
 pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol, em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico; em que o fator de direcionamento está presente numa quantidade de 10 a 50 μg por mg de lípido;
 e em que:
 a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



- e
 a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



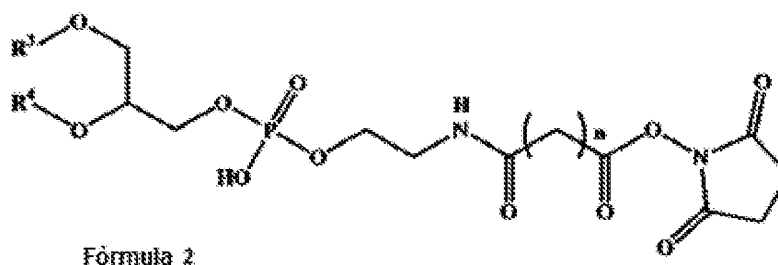
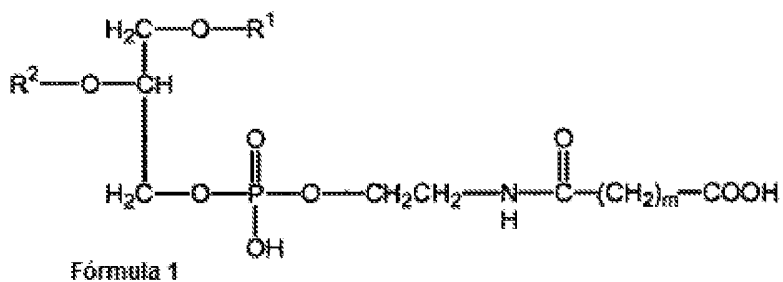
em que:

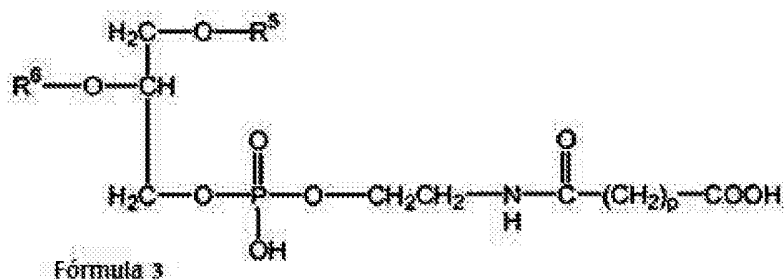
R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que o lipossoma não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, fosfatidil etanolamina(s) semissintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,





em que:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e

m, n, e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10;

e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

2. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 1, em que a fosfatidilcolina inclui uma fração de um ácido gordo saturado.

3. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 1, em que a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC.

4. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 1, em que o lipossoma compreende DMPC e colesterol, DSPC e colesterol, POPC e colesterol, ou DPPC e colesterol.

5. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 1, em que o lipossoma compreende DMPC e colesterol.

6. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que m e p são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4.

7. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 6, em que m e p são iguais.

8. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 7, em que m e p são 3.

9. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo.

10. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que R^1 e R^2 são iguais, e R^5 e R^6 são iguais.

11. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são iguais.

12. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo.

13. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 1, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo, e m e p são 3.

14. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 13, em que a fosfatidilcolina é DMPC ou DSPC, e o pelo menos um lípido adicional é colesterol.

15. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, em que o ligando de direcionamento é selecionado a partir de transferrina, ácido fólico, ácido hialurônico, uma cadeia de açúcar, e um fragmento de um anticorpo monoclonal.

16. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, em que o ligando de

direcionamento é selecionado a partir de transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico e uma cadeia de açúcar.

17. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, em que o ligando de direcionamento é transferrina.

18. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 17, em que a transferrina é numa forma holo, mas não numa forma apo.

19. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 17, em que a transferrina é numa forma holo.

20. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 1, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo, m e p são 3, o ligando de direcionamento é transferrina, a fosfatidilcolina é DMPC, e o pelo menos um lípido adicional é colesterol.

21. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, em que o diâmetro médio do lipossoma é de 50 nm a 250 nm.

22. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, em que o fármaco está presente.

23. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 22, em que o fármaco é um agente anticâncer.

24. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 22, em que o fármaco é um fármaco citotóxico.

25. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 22, em que o fármaco é um composto de platina.

26. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 25, em que o composto de platina é biplatina, cisplatina, carboplatina, ormaplatina, oxaliplatina, zeniplatina, enloplatina, lobaplatina ou espiroplatina.

27. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 22, em que o fármaco é oxaliplatina.

28. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 1, em que o fármaco é oxaliplatina; R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo; m e p são 3; o ligando de direcionamento é transferrina; a fosfatidilcolina é DMPC; e o pelo menos um lípido adicional é colesterol.

29. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 27 ou 28, em que a oxaliplatina é dissolvida numa solução aquosa de um açúcar selecionado a partir de trehalose, maltose, sucrose, manose, lactose, manitol, glicerol e dextrose.

30. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 29, em que o açúcar é numa concentração de desde cerca de 1 até cerca de 20 por cento de açúcar (v/v).

31. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 30, em que a concentração de oxaliplatina é de 0,1 mg/ml a 25 mg/ml dentro do lipossoma.

32. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 22, em que o fármaco é um inibidor de topoisomerase I.

33. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 32, em que o inibidor de topoisomerase I é topotecano ou irinotecano.

34. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 22, em que o fármaco é um alcaloide da vinca.

35. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 34, em que o alcaloide da vinca é vincristina, vinblastina, vinleurosina, vinrodisina, vinorelbina ou vindesina.

36. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 22, em que o fármaco é um ácido nucleico.

37. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 36, em que o ácido nucleico é um oligonucleótido antissense ou uma ribozima.

38. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 22, em que o fármaco é um agente alquilante.

39. Um lipossoma direcionado de acordo com a reivindicação 22, em que o fármaco é um taxano, um antagonista metabólico, um antibiótico antitumoral, um fármaco de terapêutica hormonal, ou um fármaco de alvo molecular.

40. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, em que o lipossoma não compreende um lípido catiónico.

41. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, em que o lipossoma não compreende um lípido aniônico.

42. Um método de produção de um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais fosfolípidos,

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento,
e,
o pelo menos um lípido adicional, para formar uma mistura de lípidos;

- (b) adicionar o fármaco ou composto marcado à mistura de lípidos formada na etapa (a);
- (c) formar um lipossoma.

43. Um método de acordo com a reivindicação 42, que compreende ainda uma etapa de:

- (d) purificar o lipossoma da etapa (c).

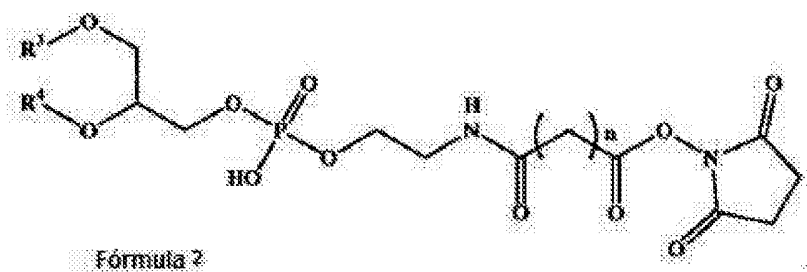
44. Um método de acordo com a reivindicação 42 ou 43, em que o fármaco na etapa (b) está em solução aquosa antes da mistura.

45. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 42 a 44, em que a etapa (c) compreende sonicação, agitação, ou extrusão.

46. Um método de produção de um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, que compreende as etapas de:

- (a) misturar:
 - o um ou mais fosfolípidos,
 - a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
 - um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e,
 - o pelo menos um lípido adicional, para formar uma mistura de lípidos,
 - em que o éster succinimidílico de uma fosfatidil

etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



em que:

R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

n é, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

(b) adicionar o fármaco ou composto marcado à mistura de lípidos formada na etapa (a);

(c) formar um lipossoma; e,

(d) ligar um ligando de direcionamento ao éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

47. Um método de acordo com a reivindicação 46, que compreende ainda uma etapa de:

(e) purificar o lipossoma da etapa (d).

48. Um método de acordo com a reivindicação 46 ou 47, em que o fármaco na etapa (b) está em solução aquosa antes da mistura.

49. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 48, em que a etapa (c) compreende sonicação, agitação, ou extrusão.

50. Uma formulação farmacêutica que compreende um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41 e um ou mais portadores, excipientes, diluentes, estabilizantes, ou conservantes farmaceuticamente aceitáveis.

51. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, para utilização num método de tratamento do corpo humano ou animal por meio da terapêutica.

52. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, em que o lipossoma direcionado compreende um fármaco, e o fármaco é um agente anticâncer, para utilização num método de tratamento do câncer.

53. Utilização de um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, em que o lipossoma direcionado compreende um fármaco, e o fármaco é um agente anticâncer, no fabrico de um medicamento para o tratamento do câncer.

54. Um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, 40, e 41, em que o lipossoma direcionado compreende um composto marcado, para utilização num método de diagnóstico.

55. Utilização de um lipossoma direcionado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, 40, e 41, em que o lipossoma direcionado compreende um composto marcado, no fabrico de um agente de diagnóstico.

56. Um lipossoma em branco que compreende:
um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina, uma fosfatidil etanolamina

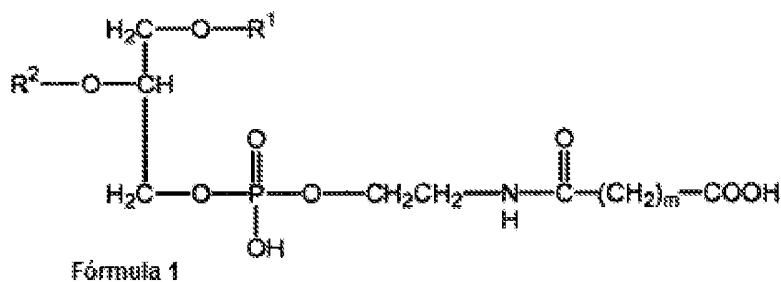
derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
 uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-
 dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e,
 pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um
 lípido adicional é colesterol ou um derivado de
 colesterol,

em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-
 (ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento
 compreende um ligando de direcionamento ligado a uma
 segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-
 (ω)-dicarboxílico;

em que o fator de direcionamento está presente numa
 quantidade de 10 a 50 μ g por mg de lípido;

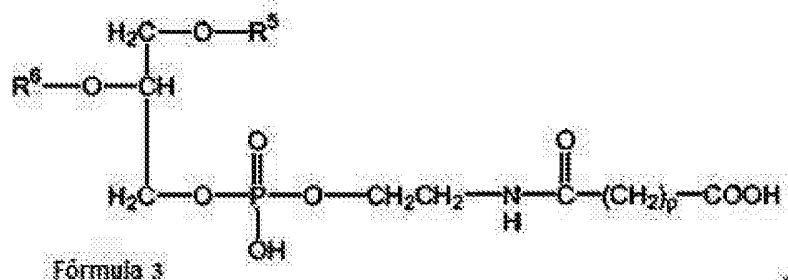
e em que:

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-
 dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido
 N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



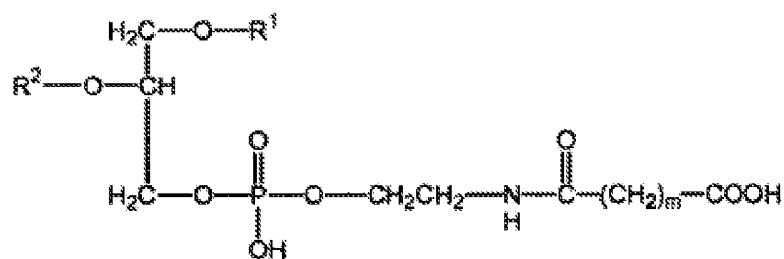
em que:

R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um
 grupo acilo, e m e p são, independentemente, um

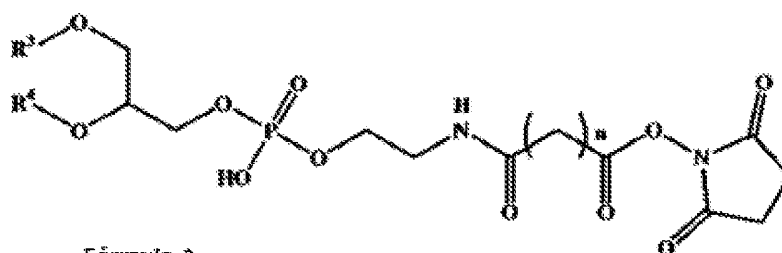
número inteiro de 1 a 10;

e em que o lipossoma não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

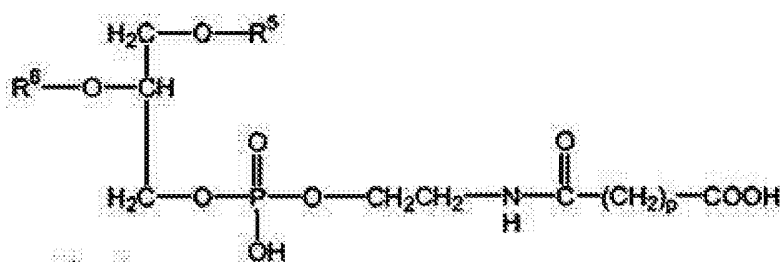
em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, fosfatidil etanolamina(s) semissintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,



Fórmula 1



Fórmula 2



Formula 3

em que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e m, n , e p são independentemente um número inteiro de

1 a 10;

e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

57. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 56, em que a fosfatidilcolina inclui uma fração de um ácido gordo saturado.

58. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 56, em que a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC.

59. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 56, em que o lipossoma compreende DMPC e colesterol, DSPC e colesterol, POPC e colesterol, ou DPPC e colesterol.

60. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 56, em que o lipossoma compreende DMPC e colesterol.

61. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 60, em que m e p são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4.

62. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 61, em que m e p são iguais.

63. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 62, em que m e p são 3.

64. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 63, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, oleoilo, estearoilo, palmitoilo ou miristoilo.

65. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 64, em que R^1 e R^2 são iguais, e R^5 e R^6

são iguais.

66. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 64, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são iguais.

67. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 63, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo.

68. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 56, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo, e m e p são 3.

69. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 68, em que a fosfatidilcolina é DMPC ou DSPC, e o pelo menos um lípido adicional é colesterol.

70. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 69, em que o ligando de direcionamento é selecionado a partir de transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico, uma cadeia de açúcar, e um fragmento de um anticorpo monoclonal.

71. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 69, em que o ligando de direcionamento é selecionado a partir de transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico e uma cadeia de açúcar.

72. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 69, em que o ligando de direcionamento é transferrina.

73. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 72, em que a transferrina é numa forma holo, mas não numa forma apo.

74. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 72, em que a transferrina é numa forma holo.

75. Um lipossoma em branco de acordo com a reivindicação 56, em que R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo, m e p são 3, o ligando de direcionamento é transferrina, a fosfatidilcolina é DMPC, e o pelo menos um lípido adicional é colesterol.

76. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 75, em que o diâmetro médio do lipossoma é de 50 nm a 250 nm.

77. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 76, em que o lipossoma não compreende um lípido catiónico.

78. Um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 76, em que o lipossoma não compreende um lípido aniónico.

79. Um método de produção de um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 78, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais fosfolípidos,

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento,
e,

o pelo menos um lípido adicional,

para formar uma mistura de lípidos; e

(b) formar um lipossoma.

80. Um método de acordo com a reivindicação 79, que compreende ainda uma etapa de:

(c) purificar o lipossoma da etapa (b).

81. Um método de acordo com a reivindicação 79 ou 80, em que a etapa (b) compreende sonicação, agitação, ou extrusão.

82. Um método de produção de um lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 78, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais fosfolípidos,

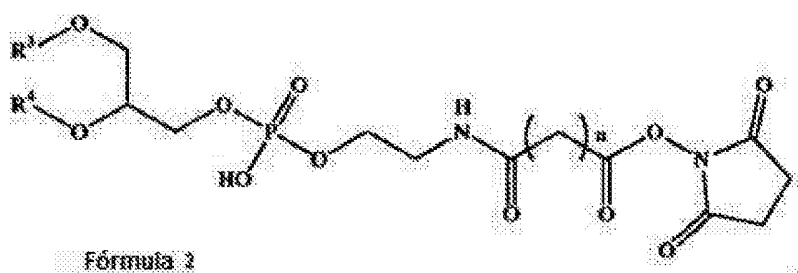
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e

um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e,

o pelo menos um lípido adicional,

para formar uma mistura de lípidos,

em que o éster succinimidílico da fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,



em que:

R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

n é, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

(b) formar um lipossoma; e,
(c) ligar um ligando de direcionamento ao éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico para formar uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento.

83. Um método de acordo com a reivindicação 82, que compreende ainda uma etapa

(d) purificar o lipossoma da etapa (c).

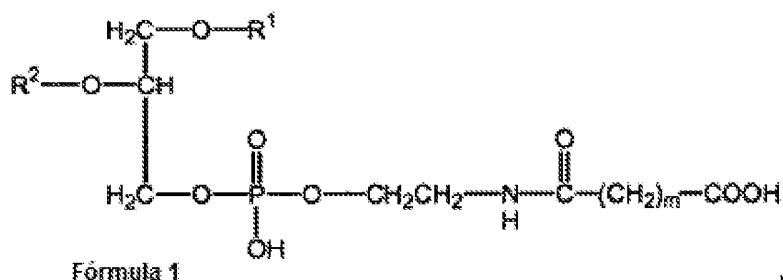
84. Um método de acordo com a reivindicação 82 ou 83, em que a etapa (b) compreende sonicação, agitação, ou extrusão.

85. Um método de preparação de um lipossoma terapêutico, que compreende a etapa de:

(a) encapsular um fármaco num lipossoma em branco de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 78.

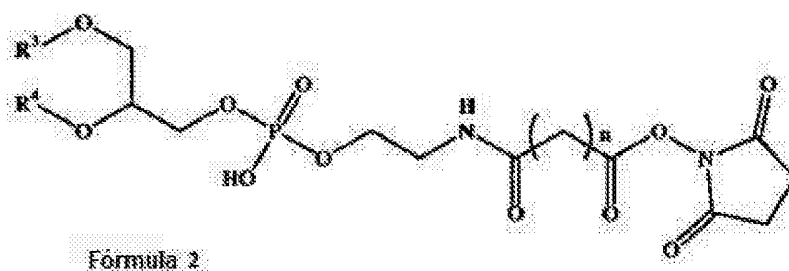
86. Uma mistura de lípidos que compreende uma mistura de:
um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina,
uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e,
pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol,
em que:

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representado pela Fórmula 2,

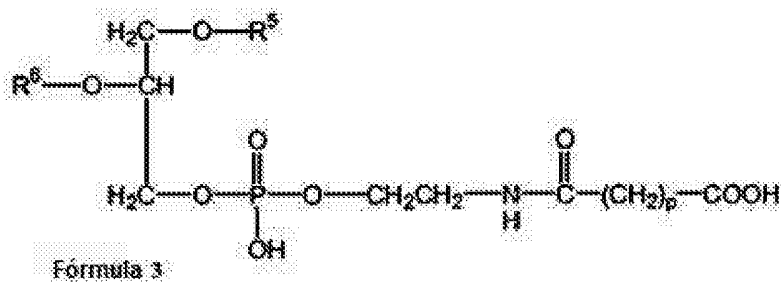
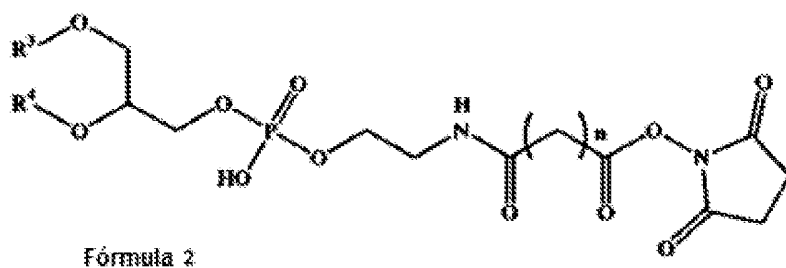
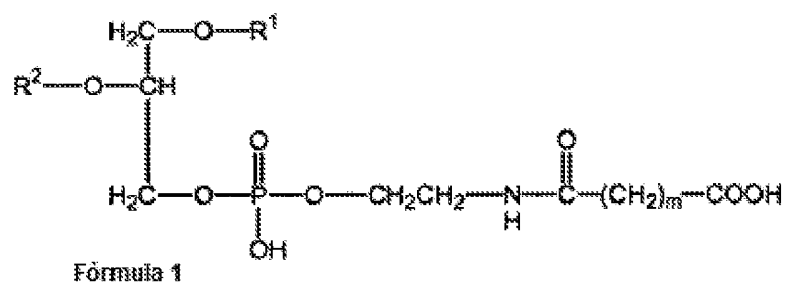


em que:

R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e m e n são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que a mistura não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, fosfatidil etanolamina(s) semissintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,



em que:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e
 m , n , e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10.

87. Uma mistura de lípidos de acordo com a reivindicação 86, em que:

a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC;

m e n são 3;

R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são iguais; e

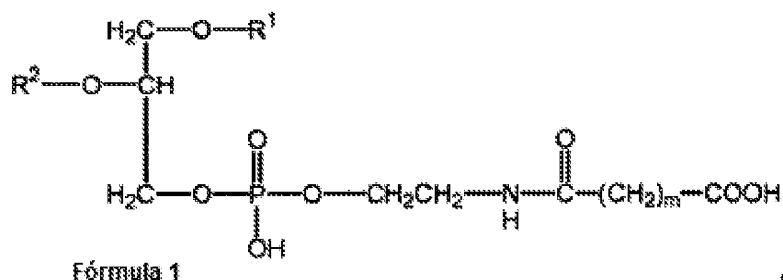
R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo ou estearoilo.

88. Um método de produção de uma mistura de lípidos de acordo com a reivindicação 86 ou 87, que compreende a etapa de:

misturar:

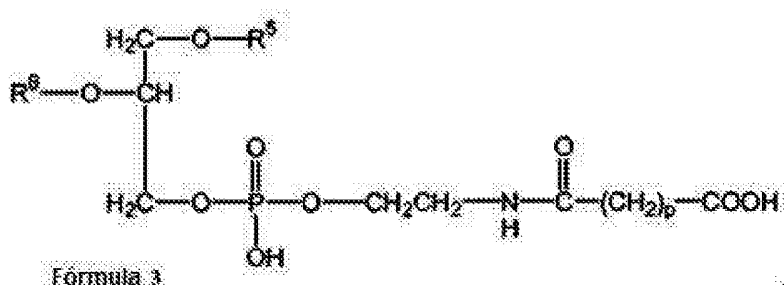
- o um ou mais fosfolípidos,
- a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e
- o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico.

89. Uma mistura de lípidos que compreende uma mistura de:
um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina,
uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e,
pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol,
em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico;
em que o fator de direcionamento está presente numa quantidade de 10 a 50 μ g por mg de lípido;
e em que:
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



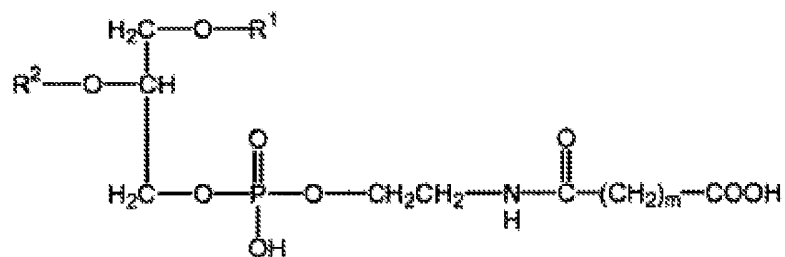
em que:

R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

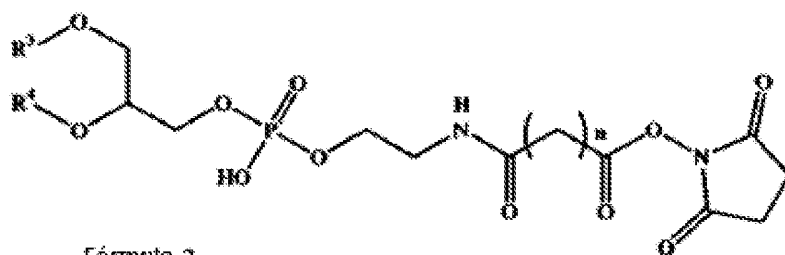
m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que a mistura não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

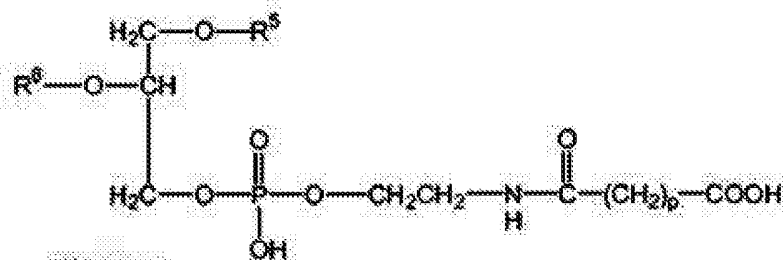
em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, fosfatidil etanolamina(s) semissintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,



Fórmula 1



Fórmula 2



Fórmula 3

em que:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e m , n , e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10;

e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

90. Uma mistura de lípidos de acordo com a reivindicação 89, em que:

a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC;
 m e p são 3;

R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são iguais;
 R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo ou estearoilo; e
o ligando de direcionamento é transferrina.

91. Um método de produção de uma mistura de lípidos de acordo com a reivindicação 89 ou 90, que compreende a etapa de:

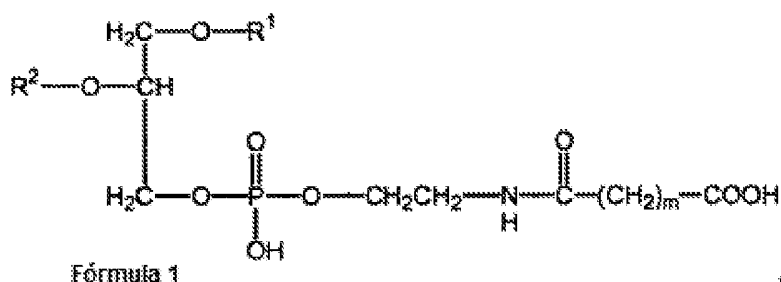
misturar:

o um ou mais fosfolípidos,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento.

92. Uma composição que contém lipossoma que compreende lipossomas que compreendem:

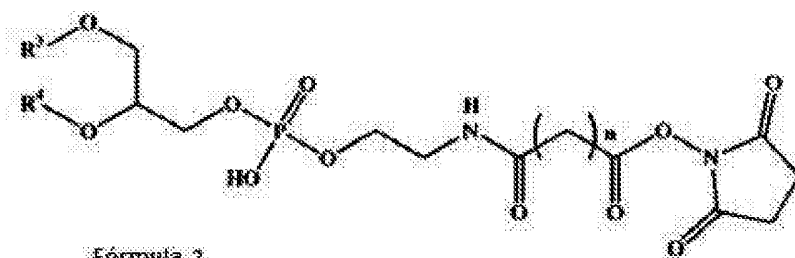
um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina,
uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
um éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico, e,
pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol,
em que:

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

o éster succinimidílico de a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 2,



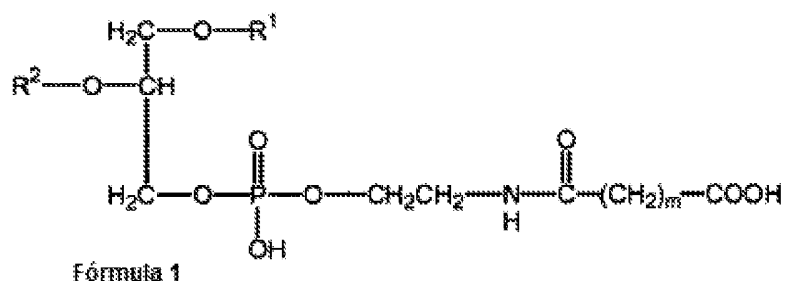
em que:

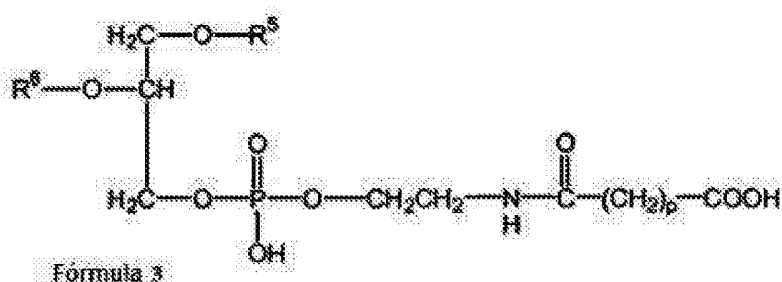
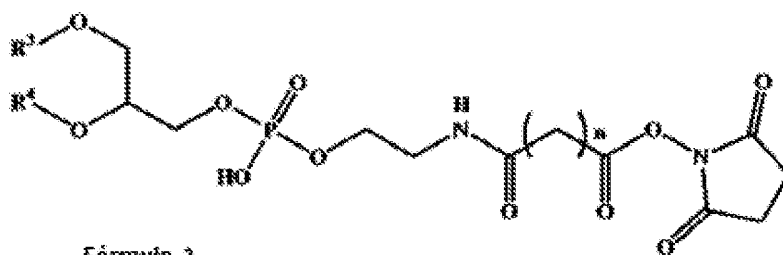
R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

m e n são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que a composição não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, fosfatidil etanolamina(s) semissintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,





em que:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e m , n , e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10.

93. Uma composição que contém lipossoma de acordo com a reivindicação 92, em que:

a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC;

m e n são 3;

R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são iguais; e

R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são oleoilo ou estearoilo.

94. Uma composição que contém lipossoma de acordo com a reivindicação 92 ou 93, que compreende ainda um fármaco, em que o fármaco é oxaliplatina.

95. Um método de produção de uma composição que contém lipossoma de acordo com a reivindicação 92, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais lípidos fosfolípidos,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,

o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico ou a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e
o pelo menos um lípido adicional,

para formar uma mistura de lípidos; e

(b) adicionar o fármaco à mistura de lípidos formada na etapa (a); e,

(c) formar uma composição que contém lipossoma.

96. Uma composição que contém lipossoma que compreende lipossomas que compreendem:

um ou mais fosfolípidos, em que o um ou mais fosfolípidos é uma fosfatidilcolina,

uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,

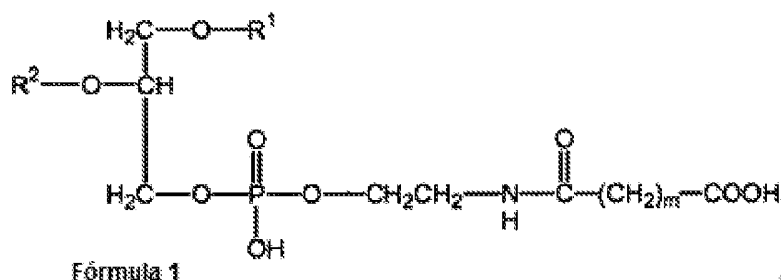
uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e,
pelo menos um lípido adicional, em que o pelo menos um lípido adicional é colesterol ou um derivado de colesterol,

em que a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento compreende um ligando de direcionamento ligado a uma segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico;

em que o fator de direcionamento está presente numa quantidade de 10 a 50 μg por mg de lípido;

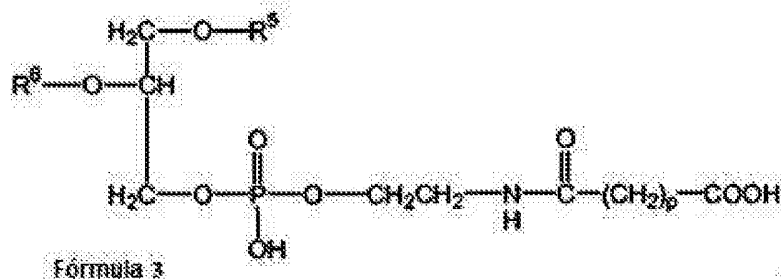
e em que:

a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 1,



e

a segunda fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico é representada pela Fórmula 3,



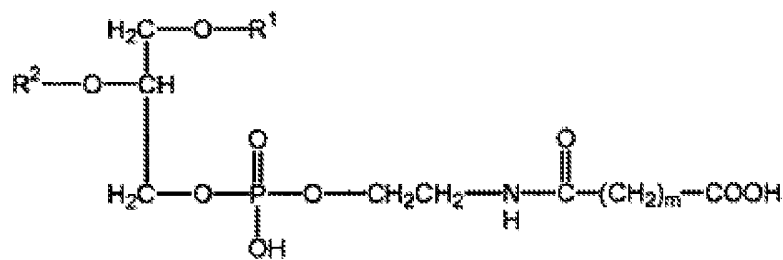
em que:

R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, um grupo acilo, e

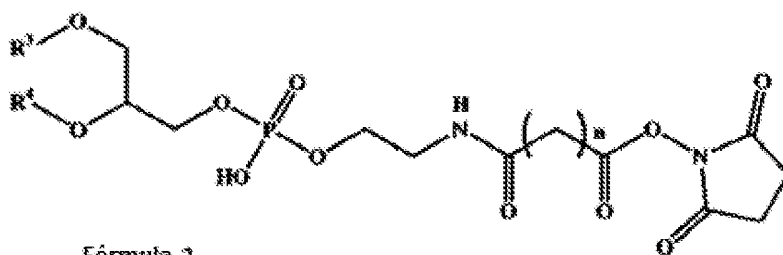
m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

e em que a composição não compreende uma fosfatidil etanolamina não derivatizada, polietileno glicol, ou fosfatidilcolina de ovo,

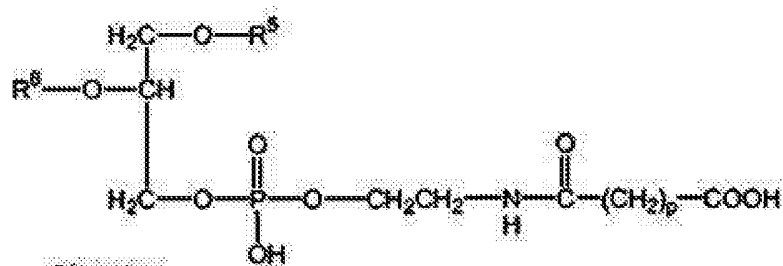
em que o termo "fosfatidil etanolamina não derivatizada" refere-se a fosfatidil etanolamina, fosfatidil etanolamina(s) semissintética(s), fosfatidil etanolamina(s) sintética(s) e/ou derivados da mesma que não são abrangidos pela seguinte Fórmula 1, Fórmula 2 ou Fórmula 3,



Fórmula 1



Fórmula 2



Fórmula 3

em que:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 são, cada um, independentemente um grupo acilo, e

m , n , e p são independentemente um número inteiro de 1 a 10;

e em que o ligando de direcionamento não é um anticorpo intato.

97. Uma composição que contém lipossoma de acordo com a reivindicação 96, em que:

a fosfatidilcolina é DMPC, DSPC, POPC ou DPPC;

m e p são 3;

R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são iguais;

R^1 , R^2 , R^5 e R^6 são oleoilo ou estearoilo; e o ligando de

direcionamento é transferrina.

98. Uma composição que contém lipossoma de acordo com a reivindicação 96 ou 97, que compreende ainda um fármaco, em que o fármaco é oxaliplatina.

99. Um método de produção de uma composição que contém lipossoma de acordo com a reivindicação 96 ou 97, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais fosfolípidos,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento e,
o pelo menos um lípido adicional,
para formar uma mistura de lípidos; e

(b) adicionar solvente à mistura formada na etapa (a) para formar uma composição que contém lipossoma.

100. Um método de produção de uma composição que contém lipossoma de acordo com a reivindicação 98, que compreende as etapas de:

(a) misturar:

o um ou mais lípidos fosfolípidos,
a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico,
o éster succinimidílico de uma fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico ou a fosfatidil etanolamina derivatizada de ácido N-(ω)-dicarboxílico modificada por fator de direcionamento, e
o pelo menos um lípido adicional,
para formar uma mistura de lípidos; e

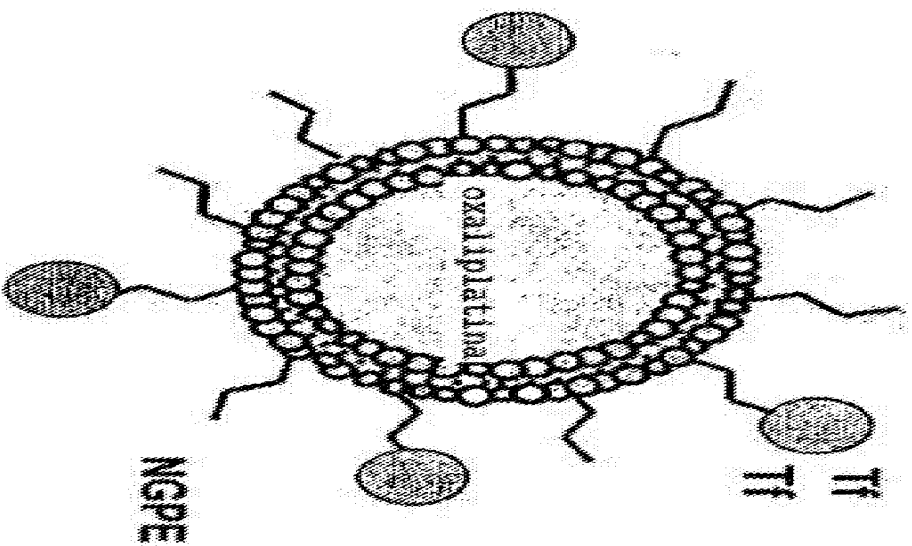
(b) adicionar o fármaco à mistura de lípidos formada na etapa (a); e,

EP 1 863 448 B1

(c) formar uma composição que contém lipossoma.

Lisboa, 3 de Fevereiro de 2015

lipossoma NGPE conjugado à
transferrina com oxaliplatina
encapsulada



PEG: polietileno glicol
NGPE: N-glutaril fosfatidiletanolamina

Fig. 1

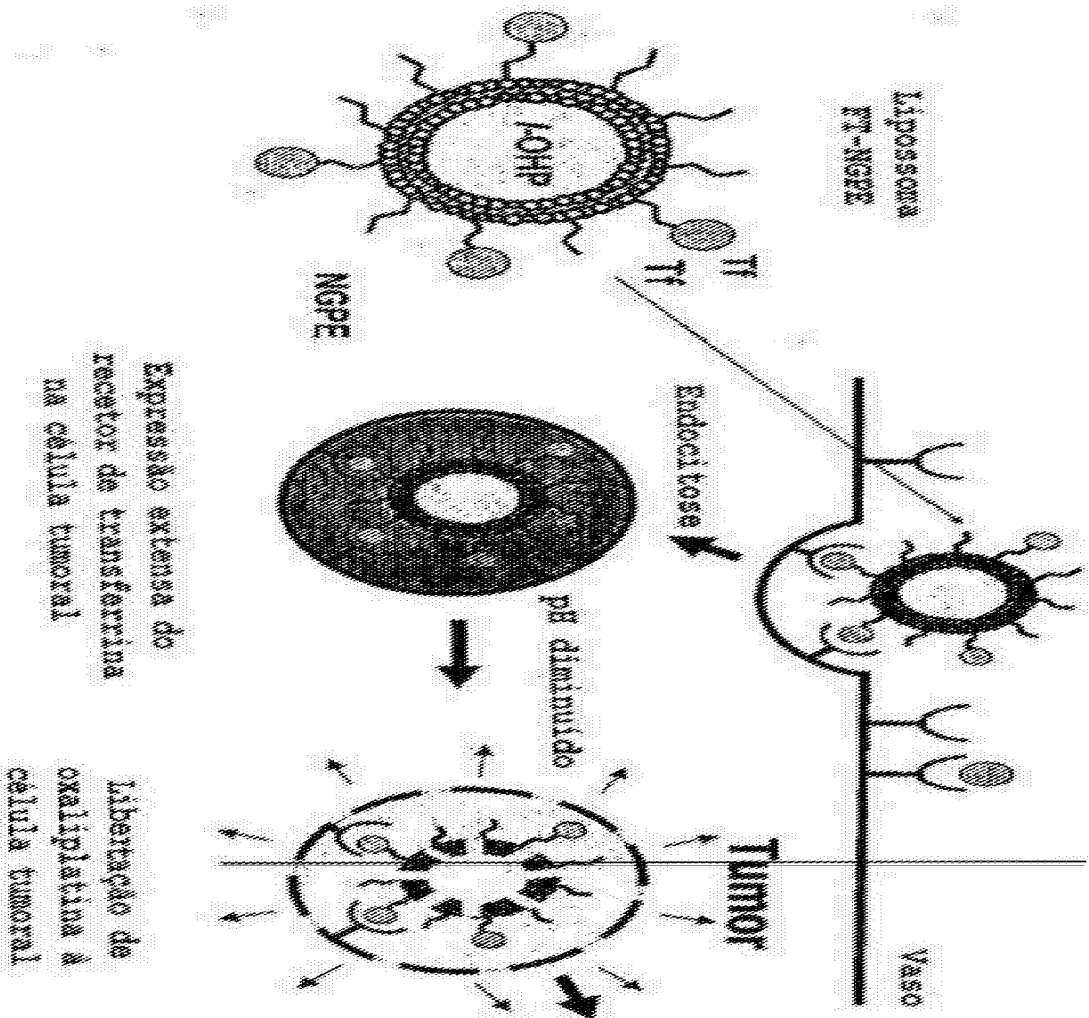


Fig. 2

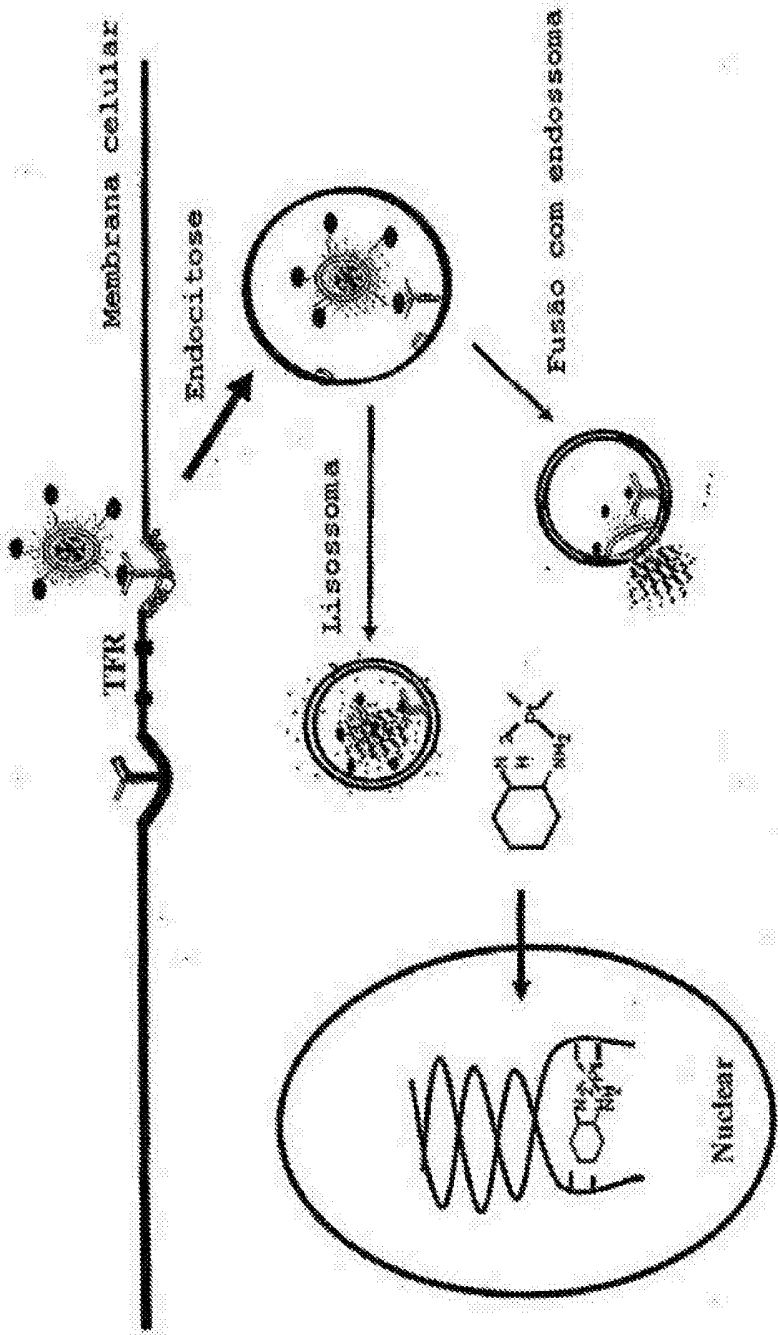
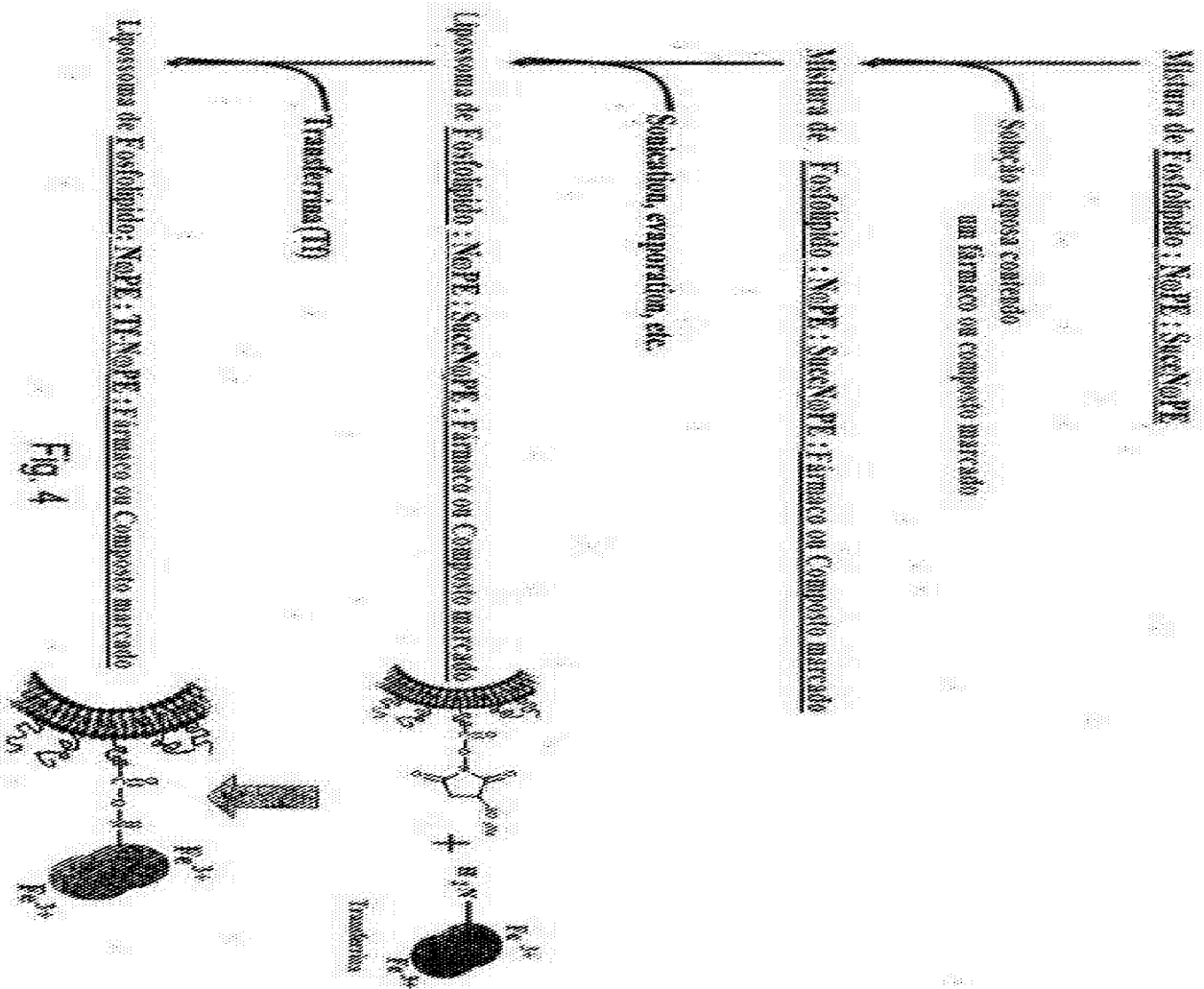
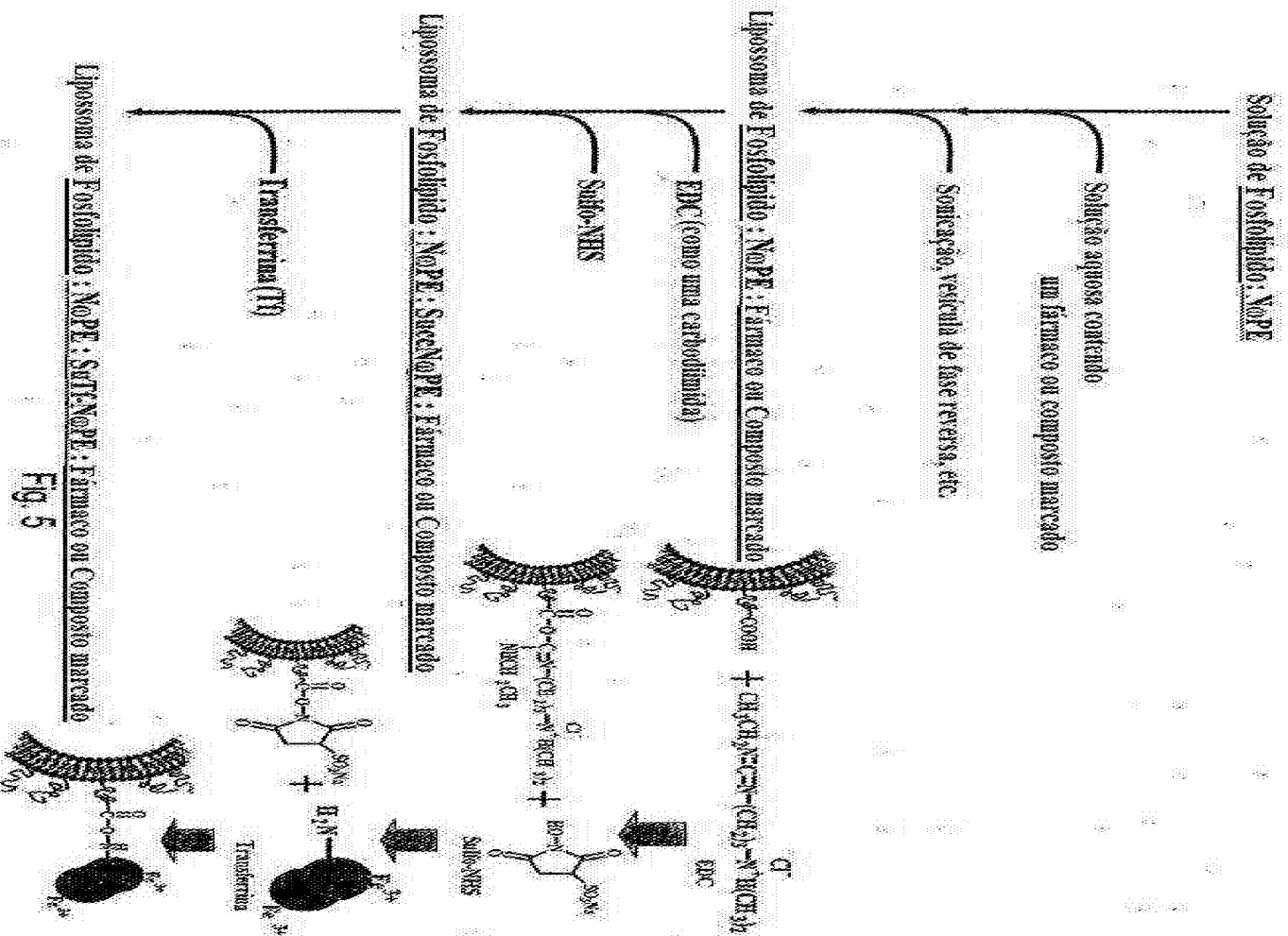


Fig. 3





6/30

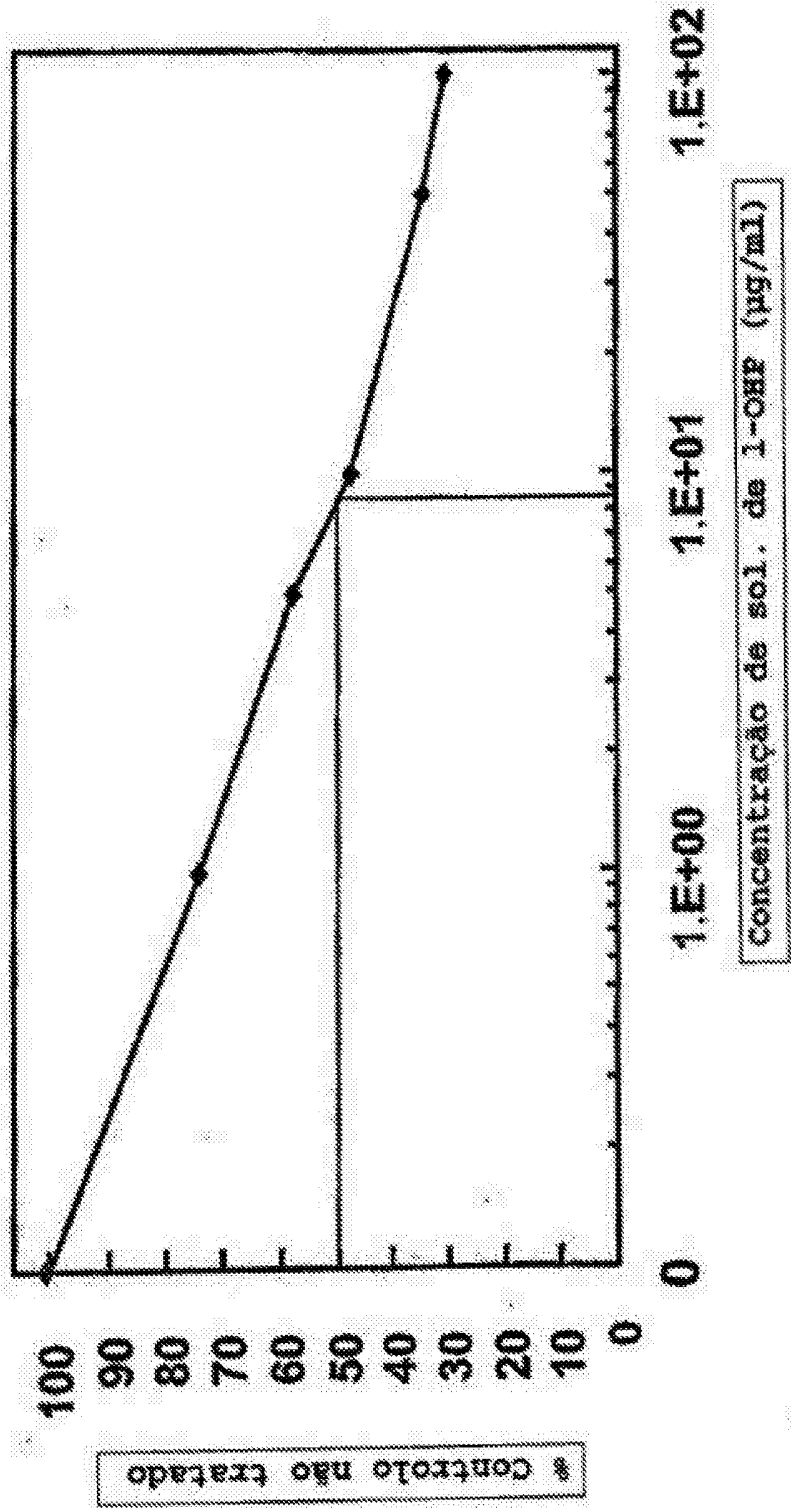


Fig. 6

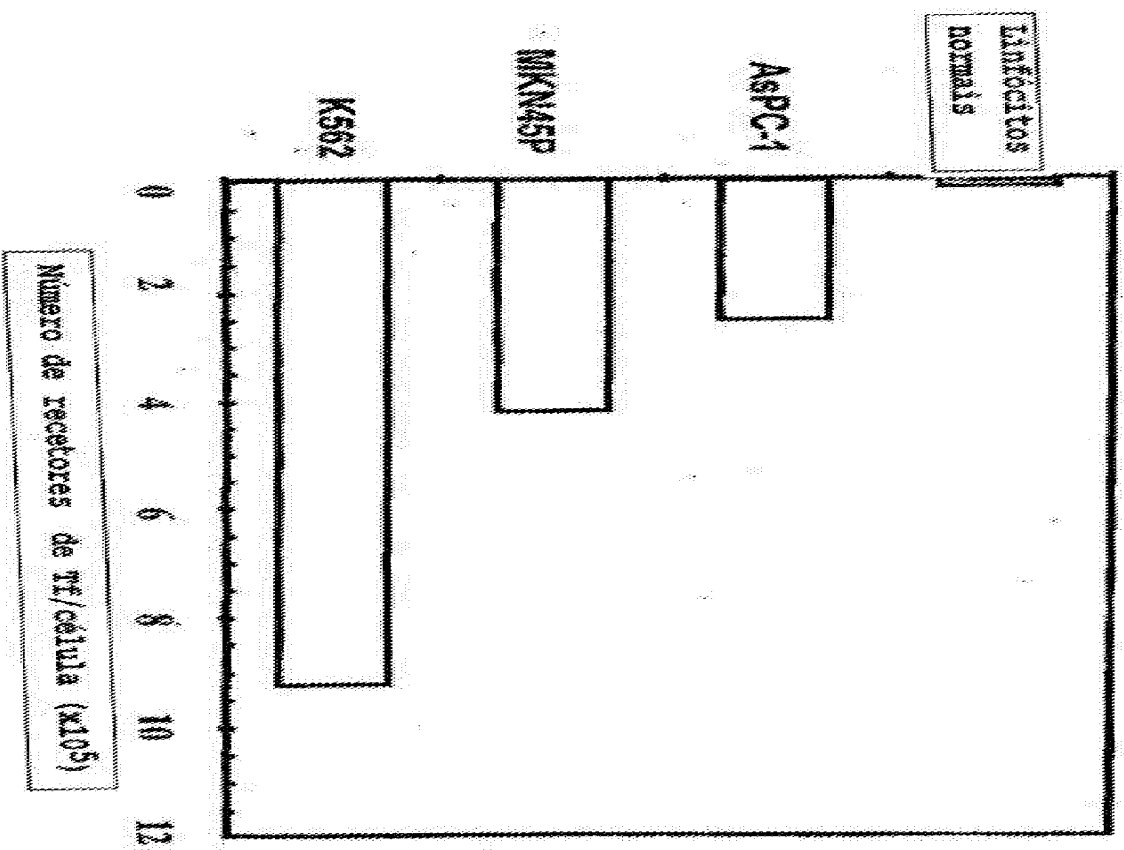


Fig. 7

Distribuição de tamanho por intensidade

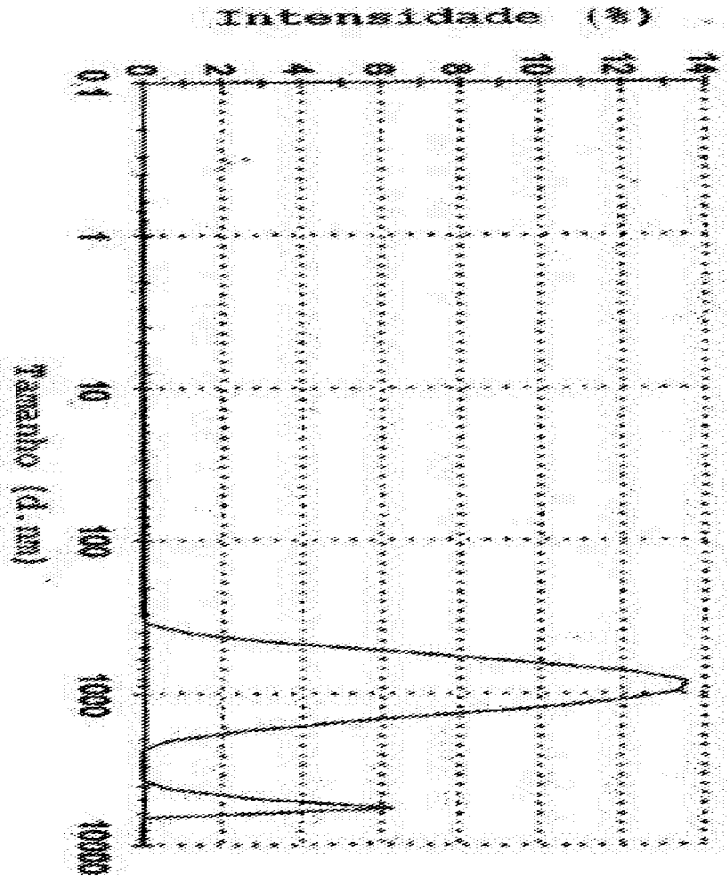


Fig. 8A

Distribuição de tamanho por intensidade

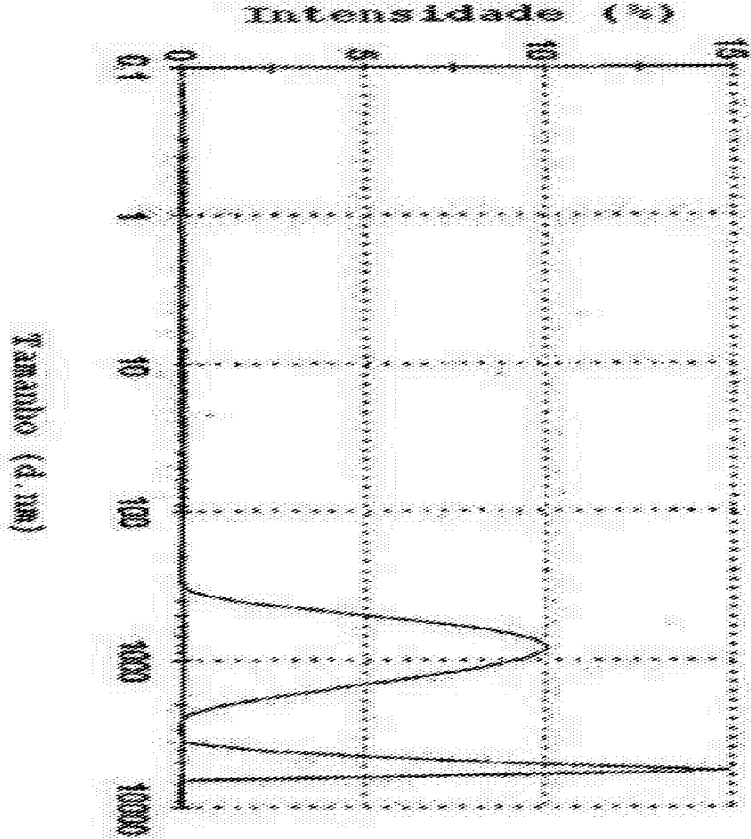


Fig. 8B

Distribuição de tamanho por intensidade

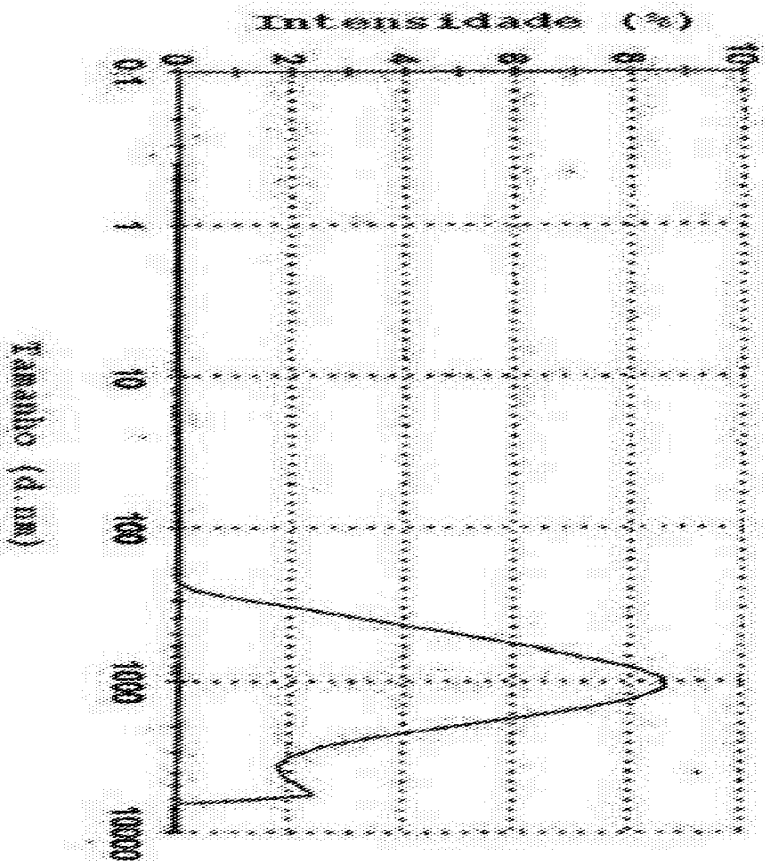


Fig. 8C

Distribuição de tamanho por intensidade

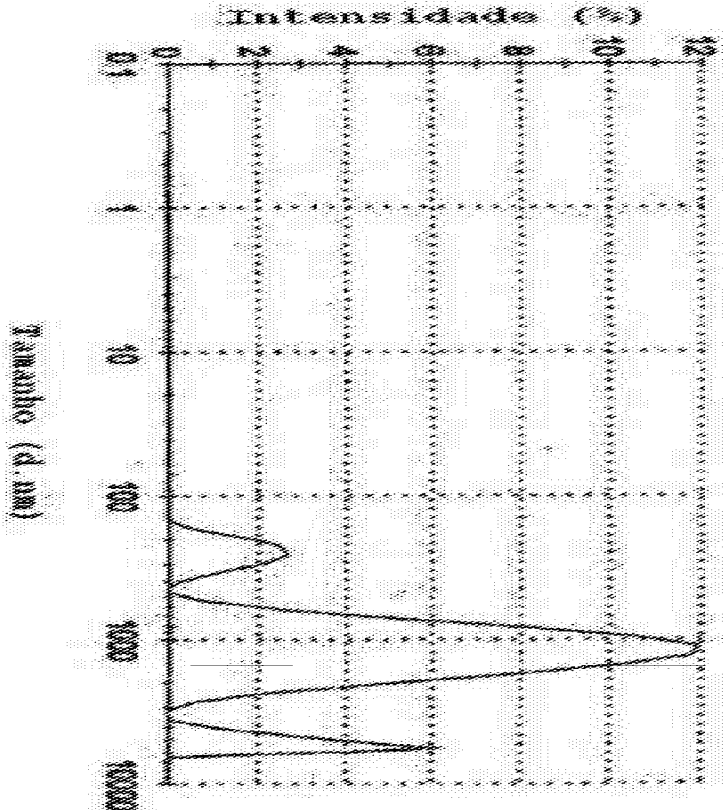


Fig. 8D

Distribuição de tamanho por intensidade

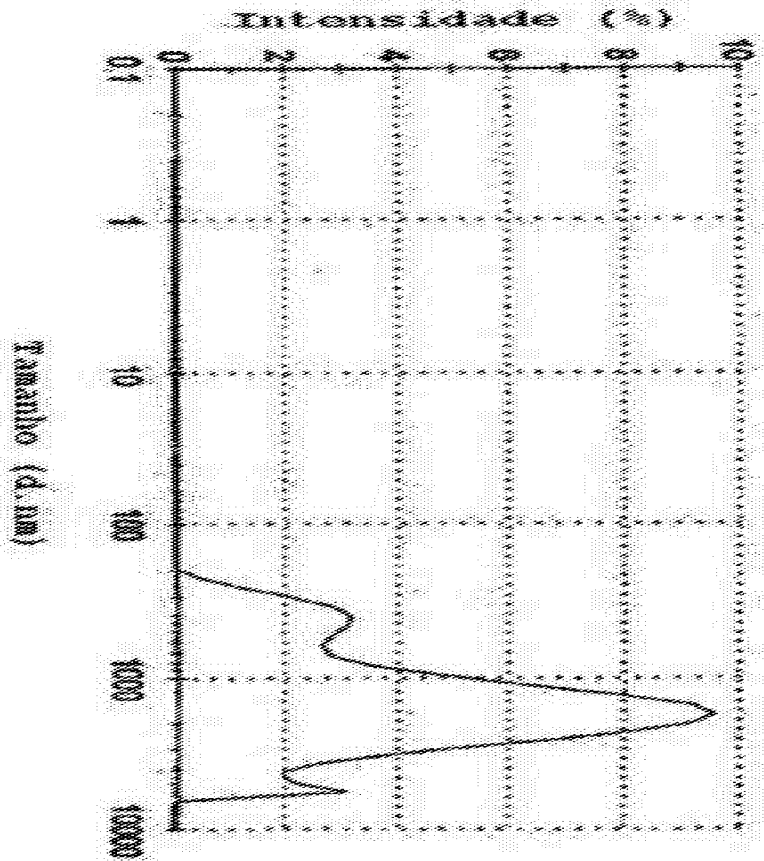


Fig. 8E

Distribuição de tamanho por intensidade

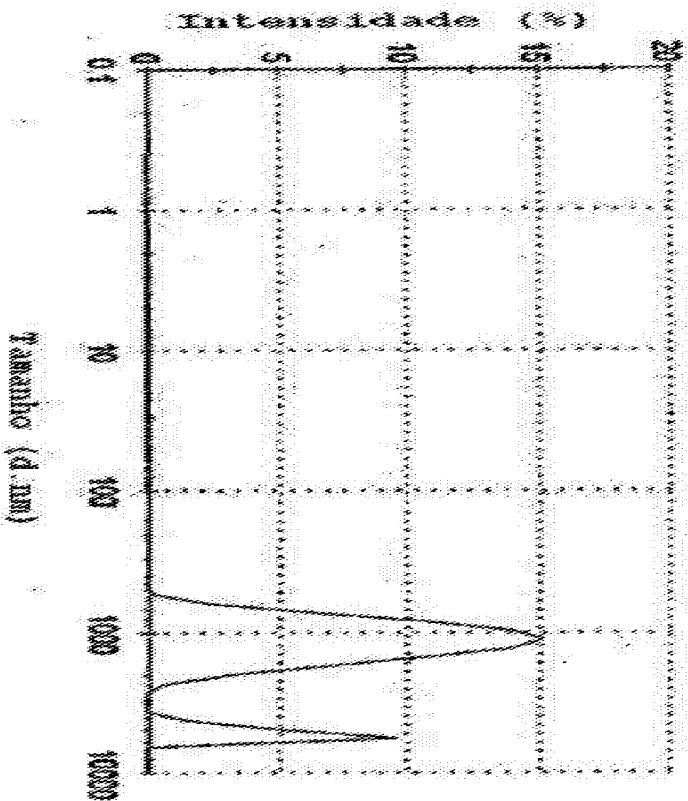


Fig. 8F

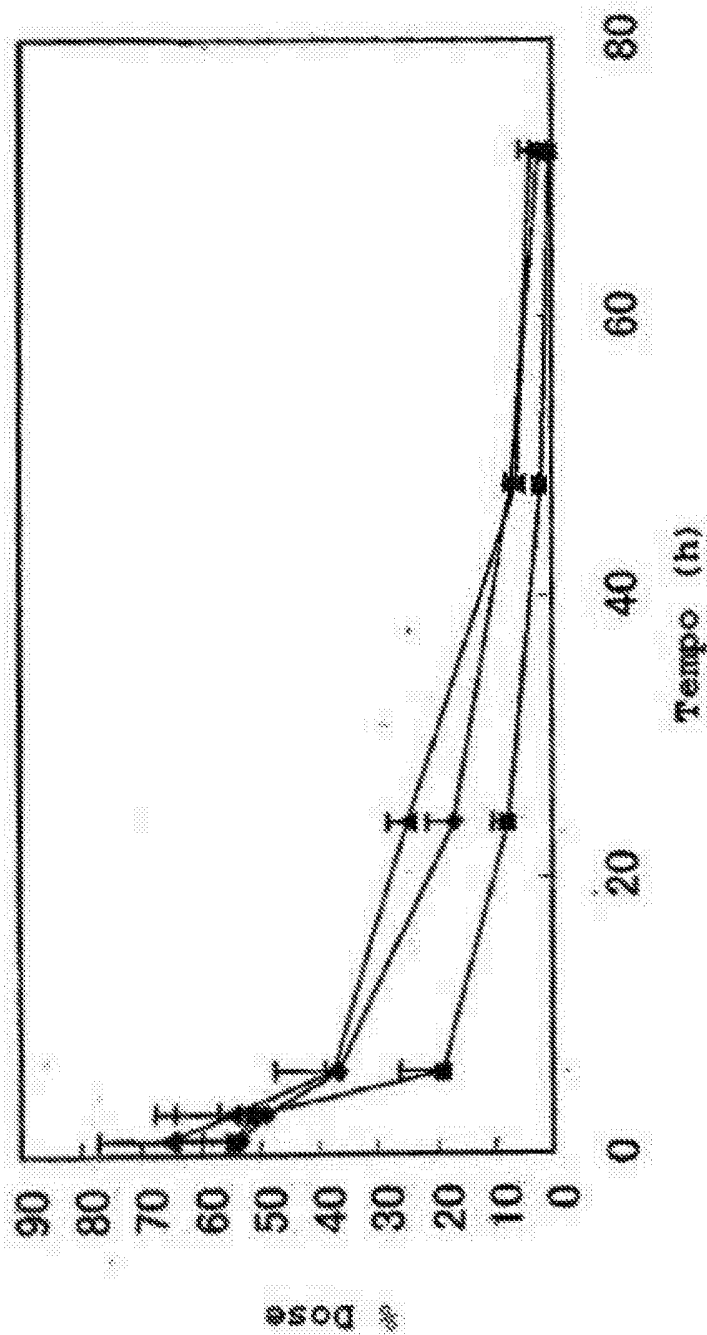


Fig. 9

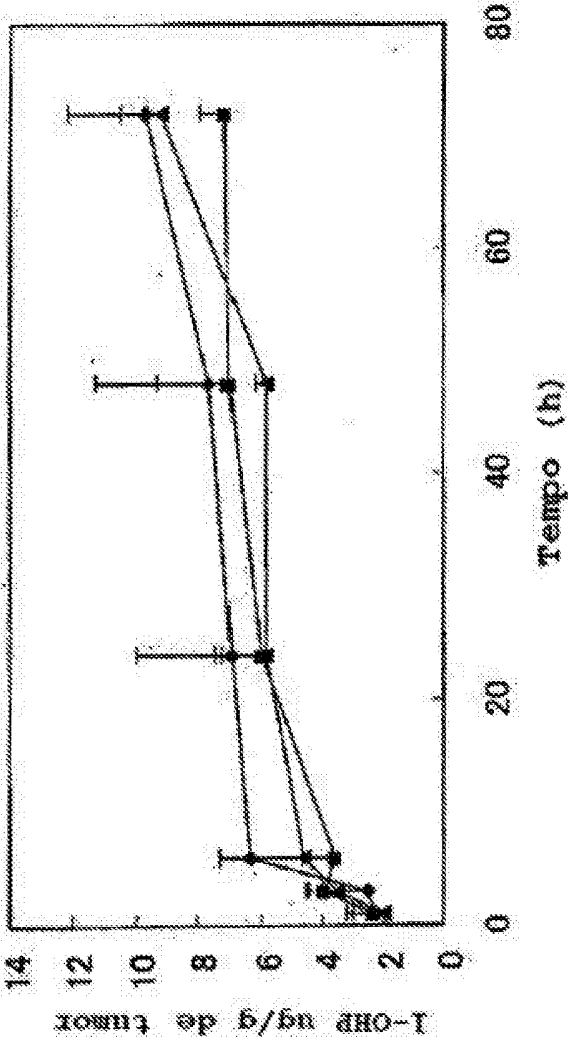


Fig. 10

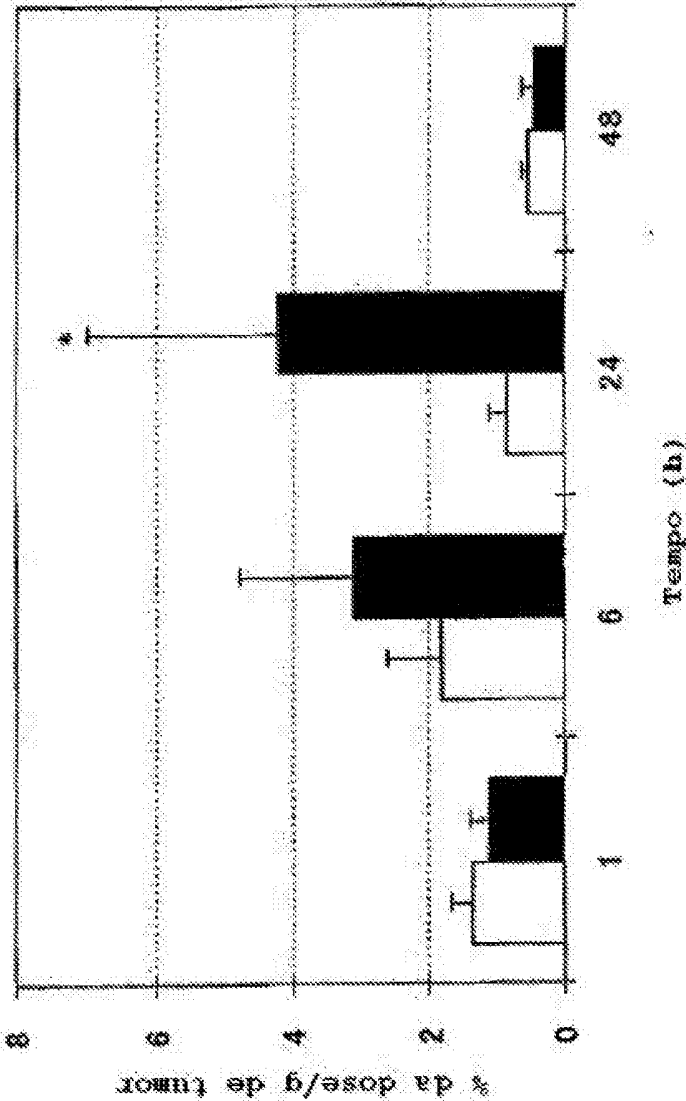


Fig. 11

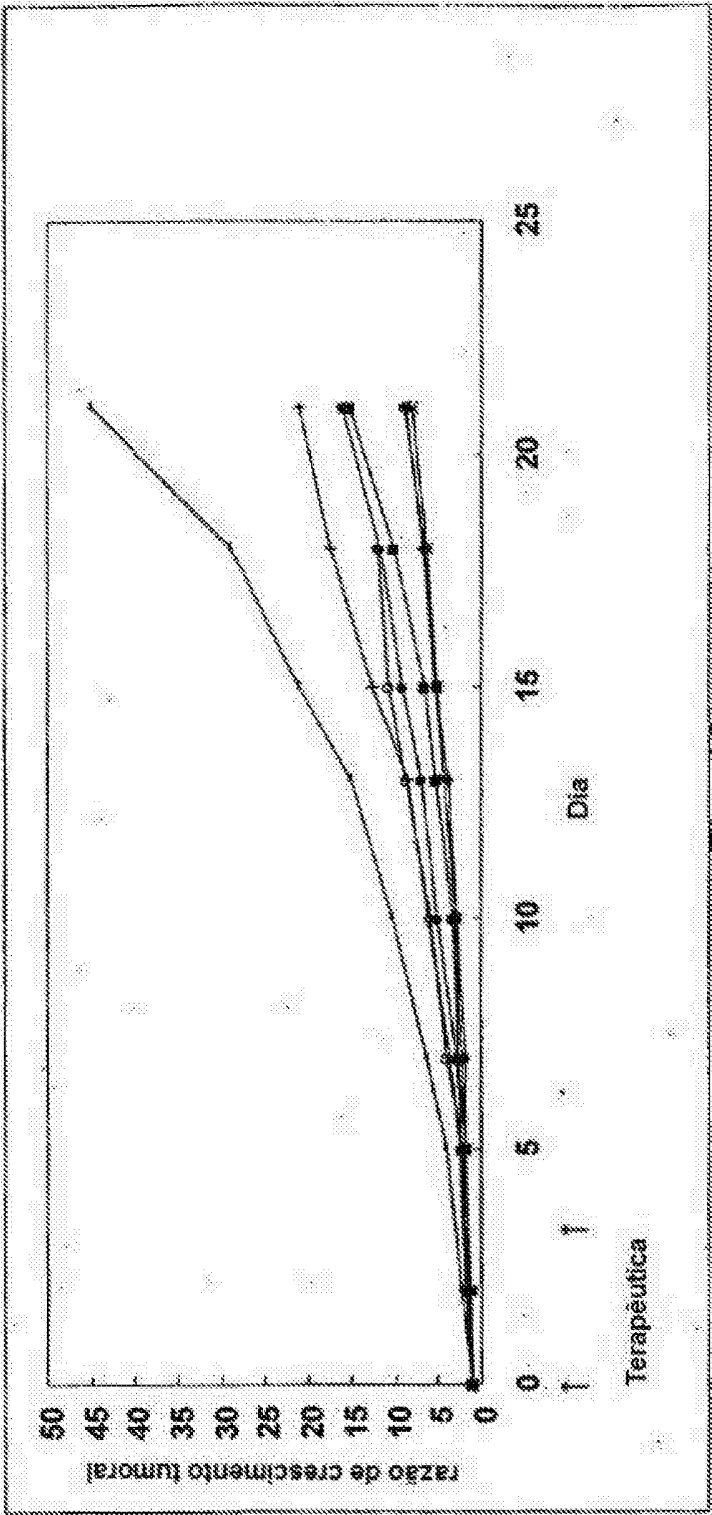


Fig. 12

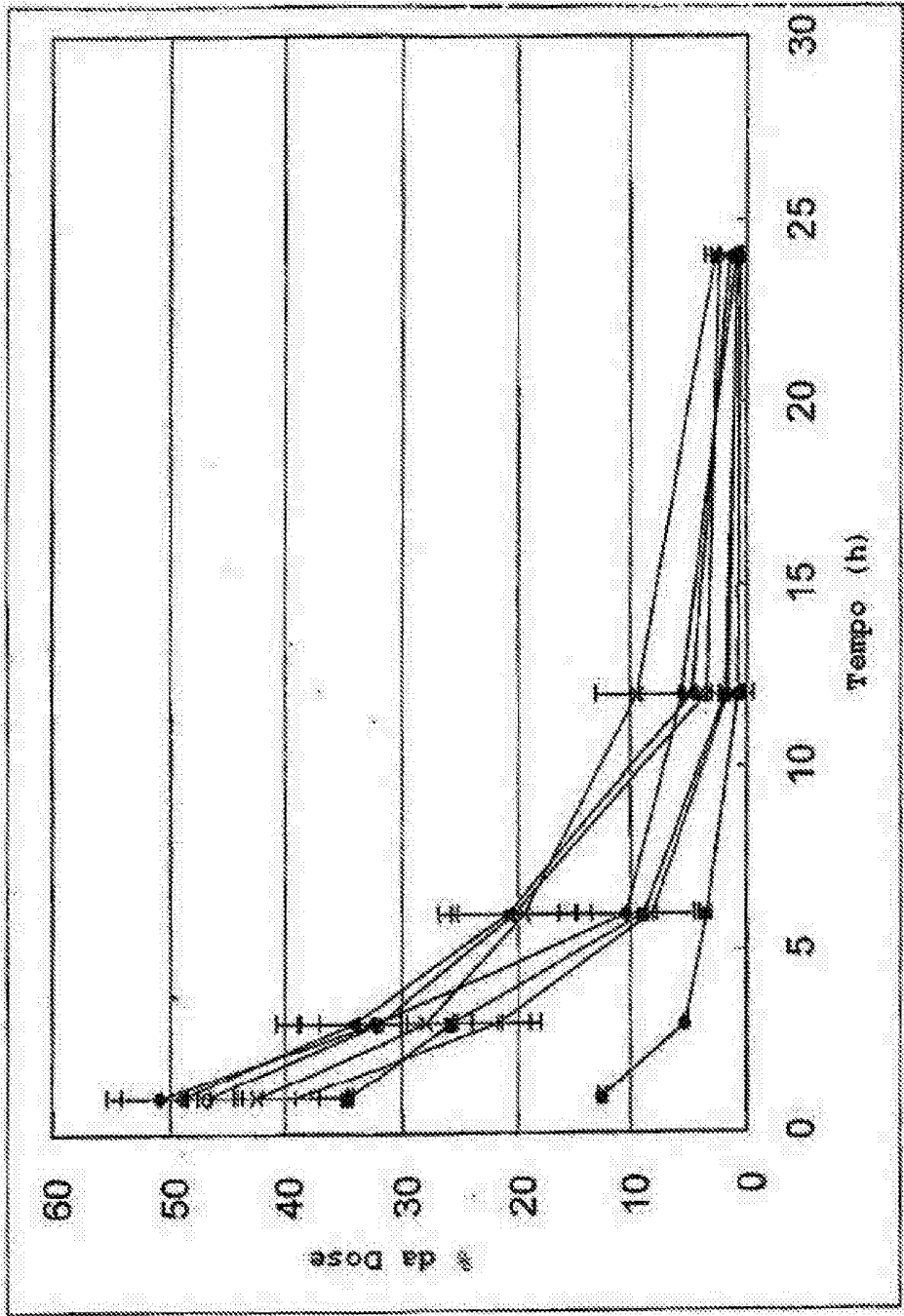


Fig. 13

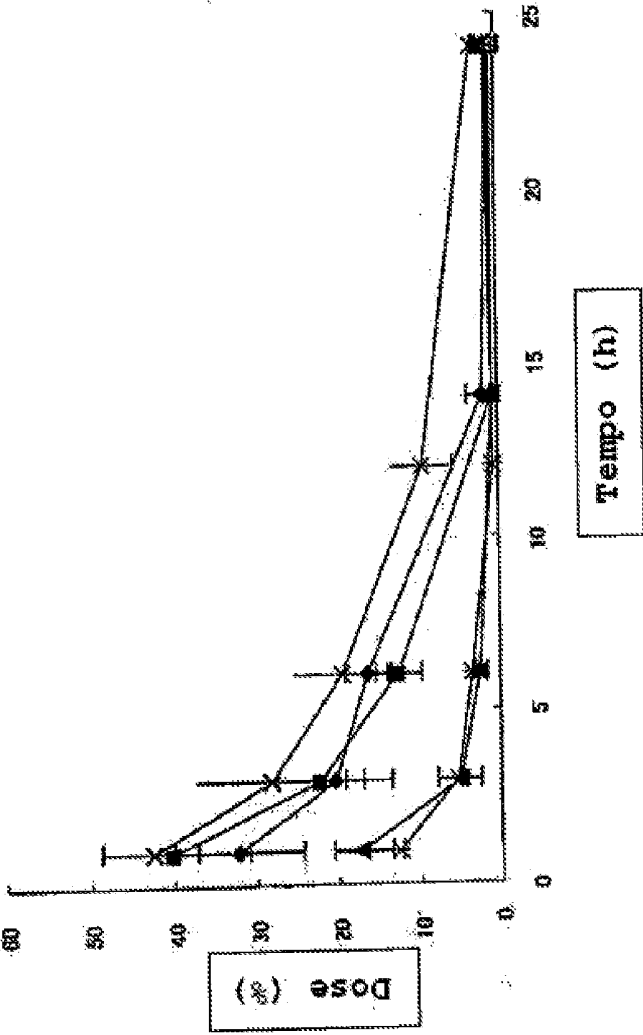


Fig. 14

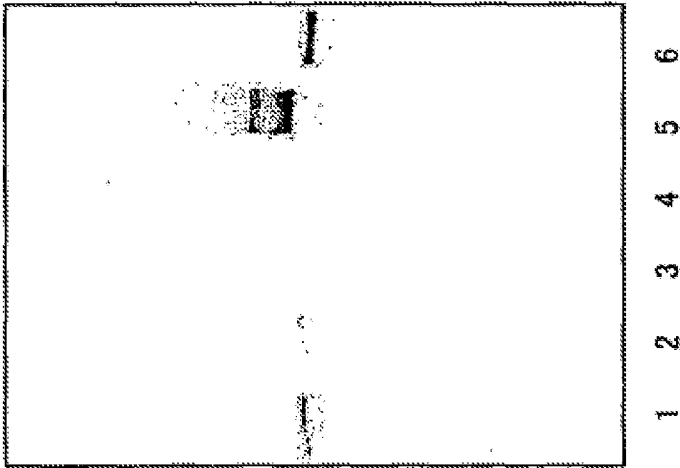


Fig. 15

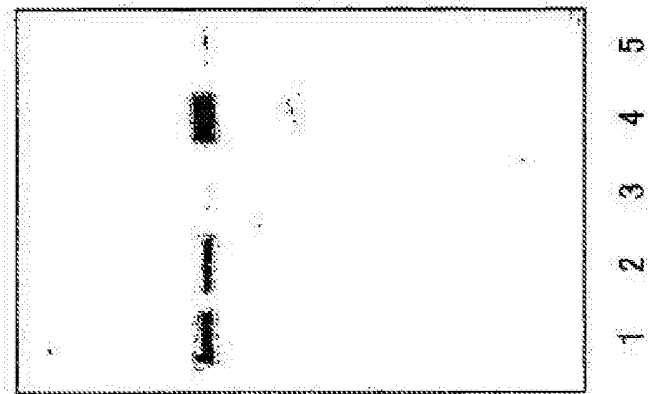


Fig. 16

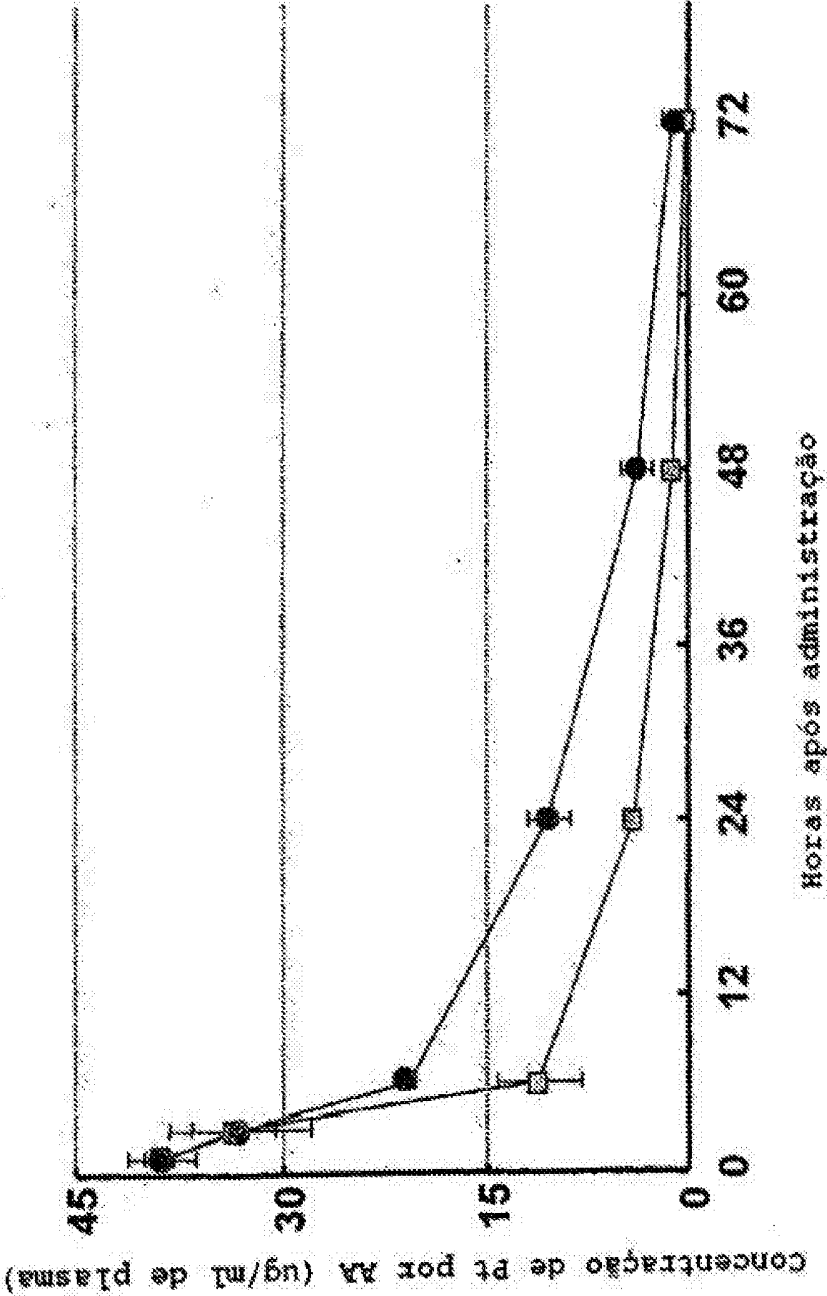


Fig. 17

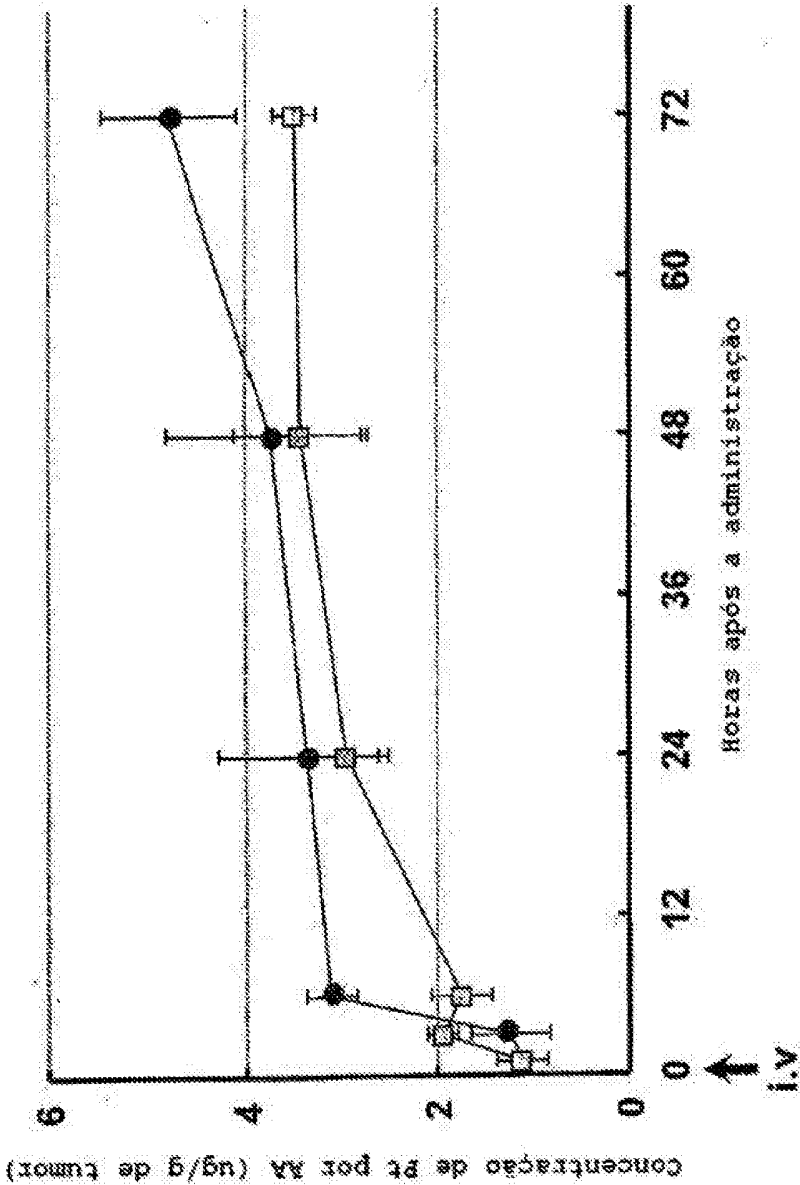


Fig. 18

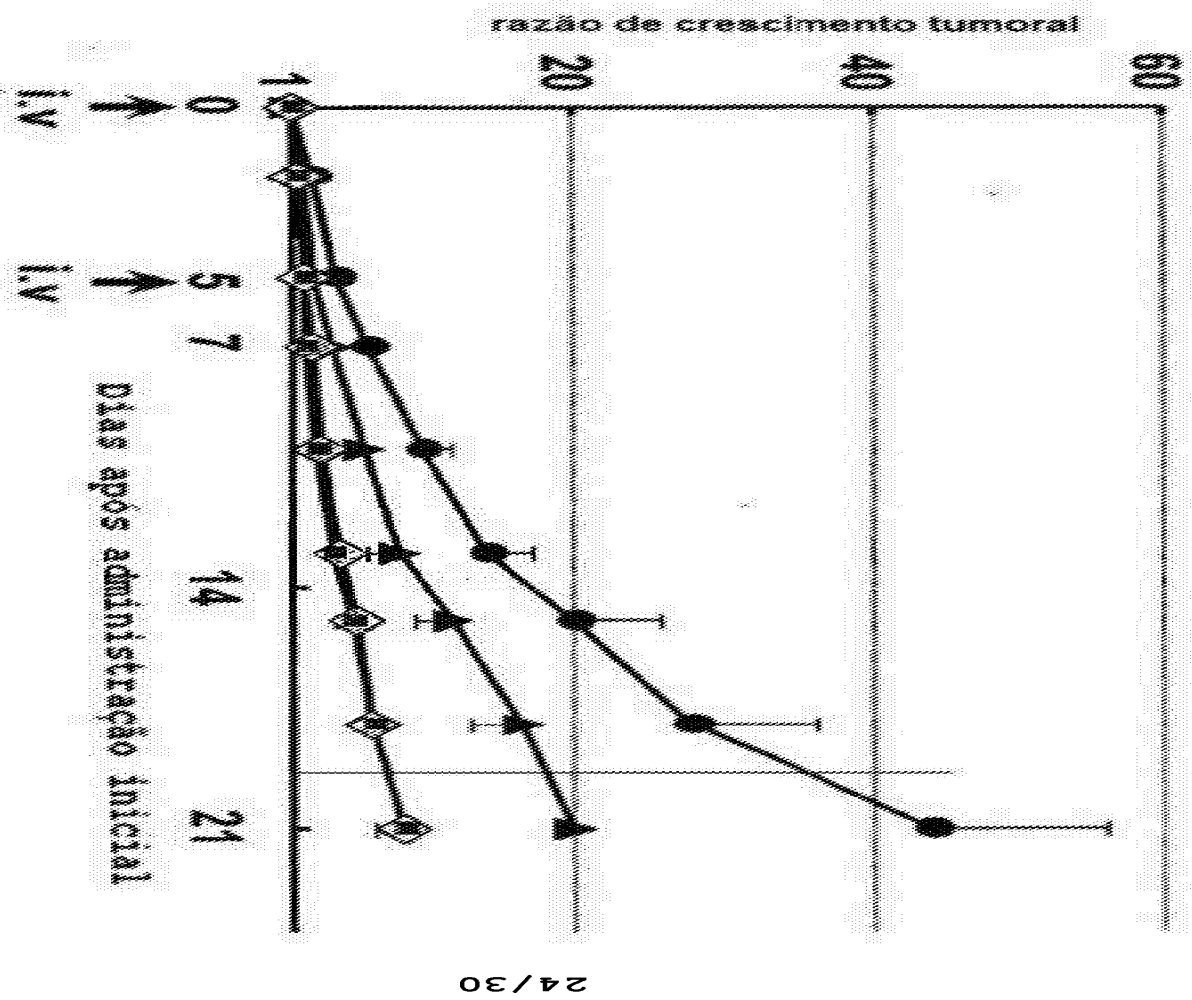


Fig. 19

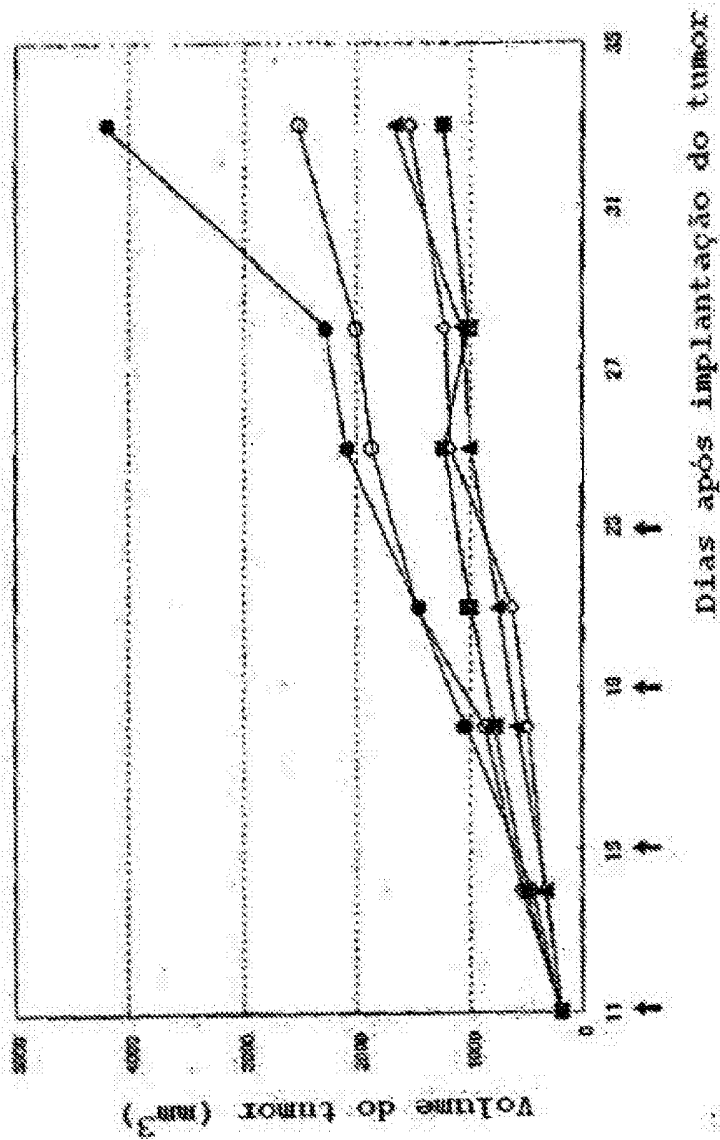


Fig. 20

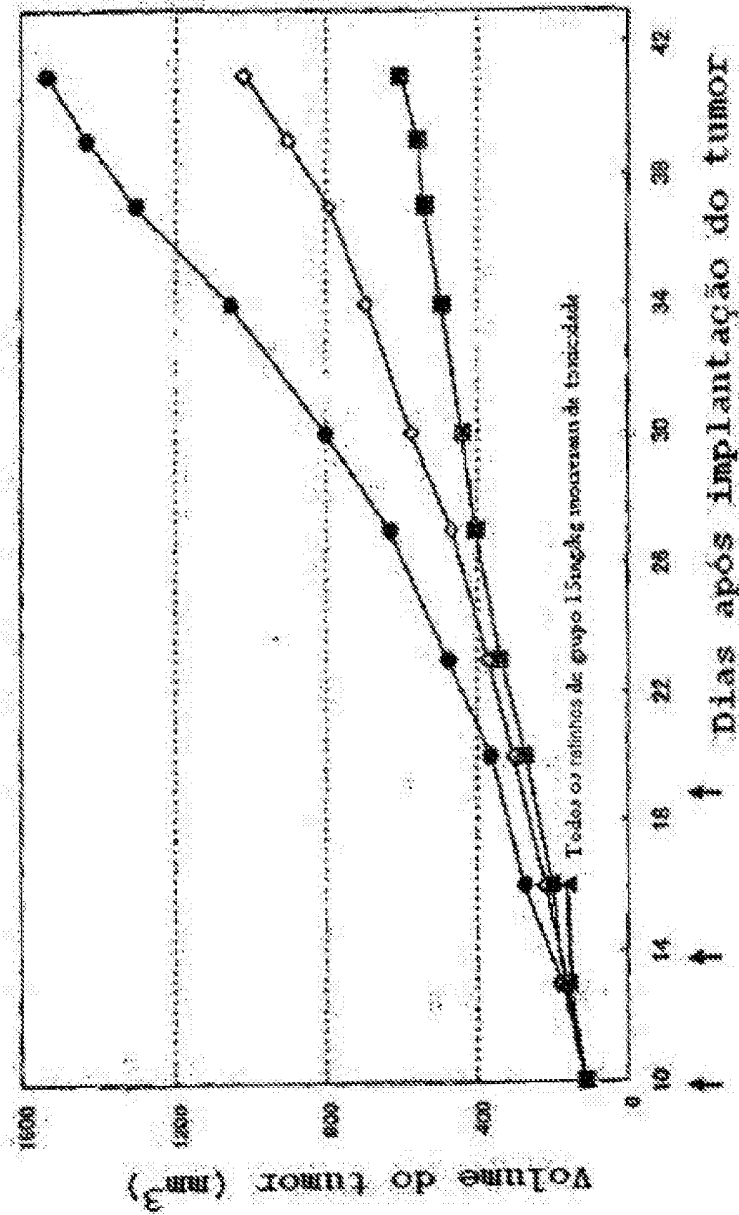


Fig. 21

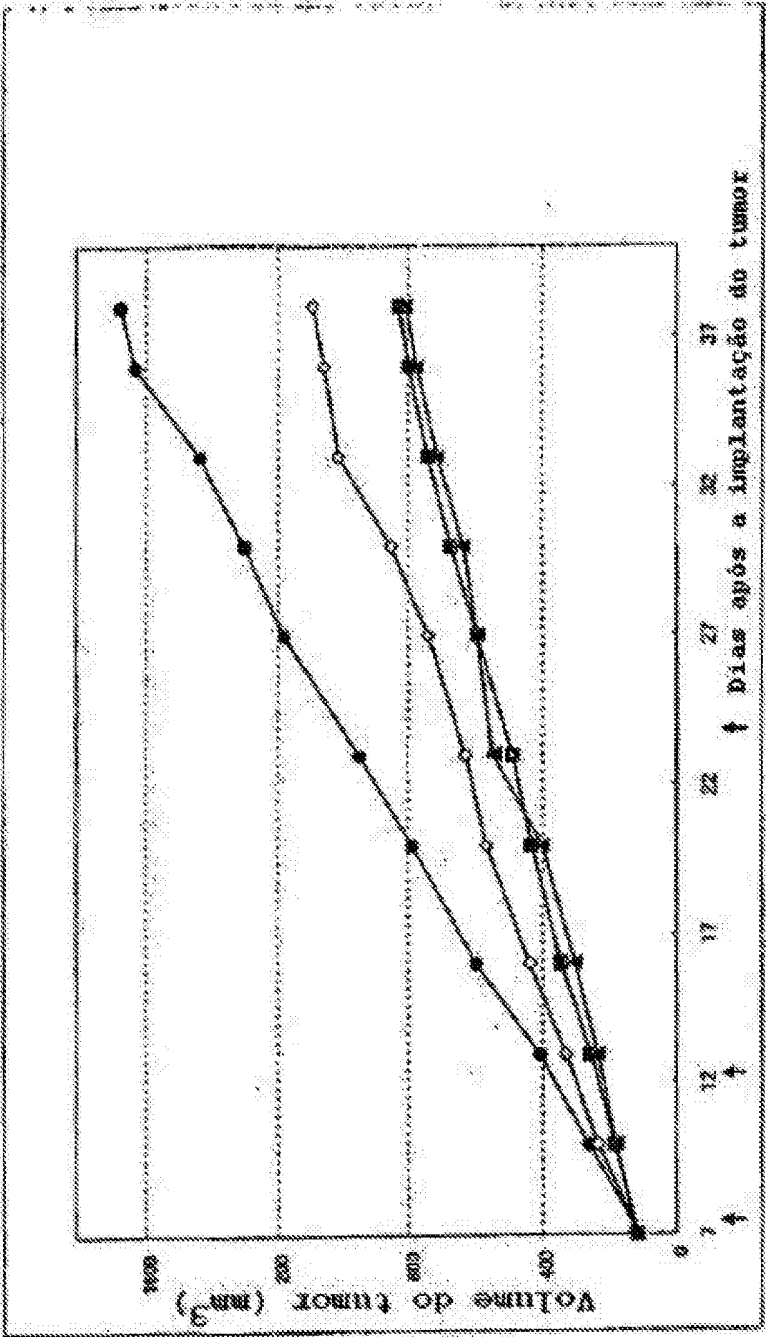


Fig. 22

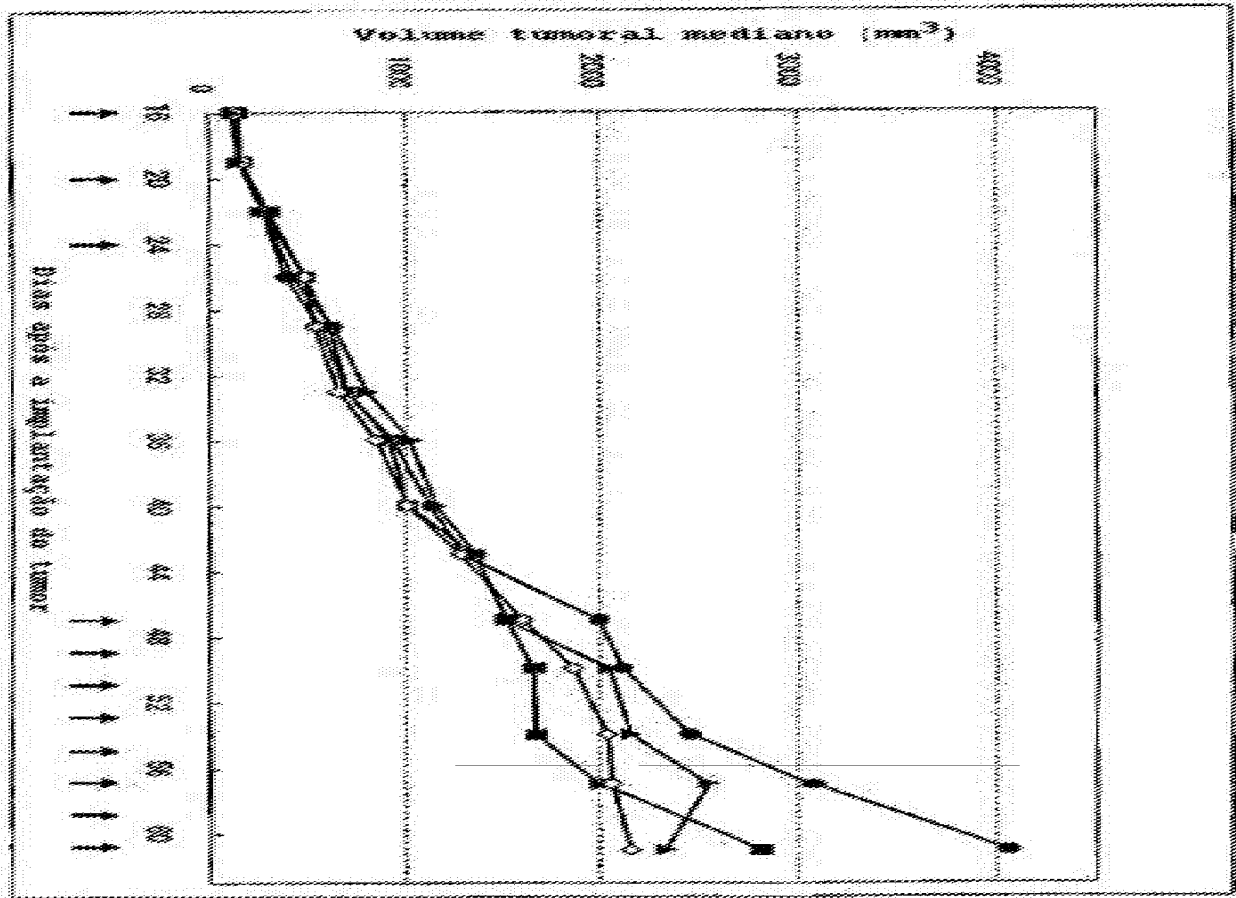


Fig. 23

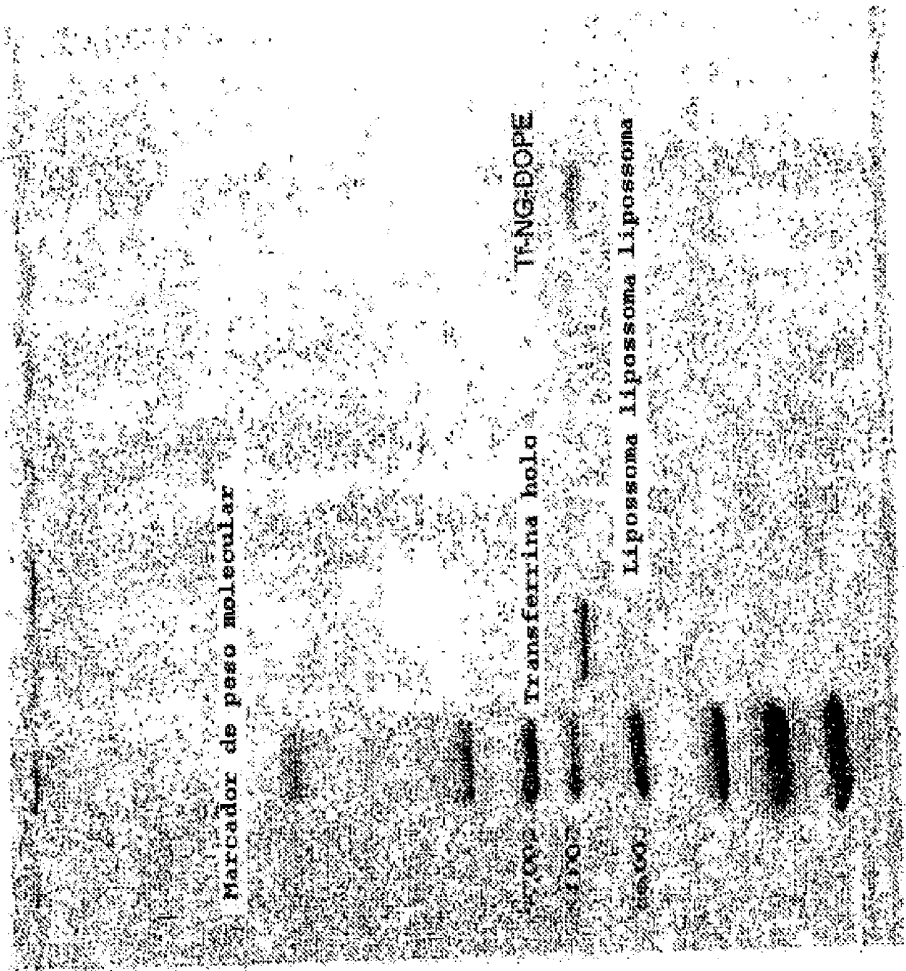


Fig. 24

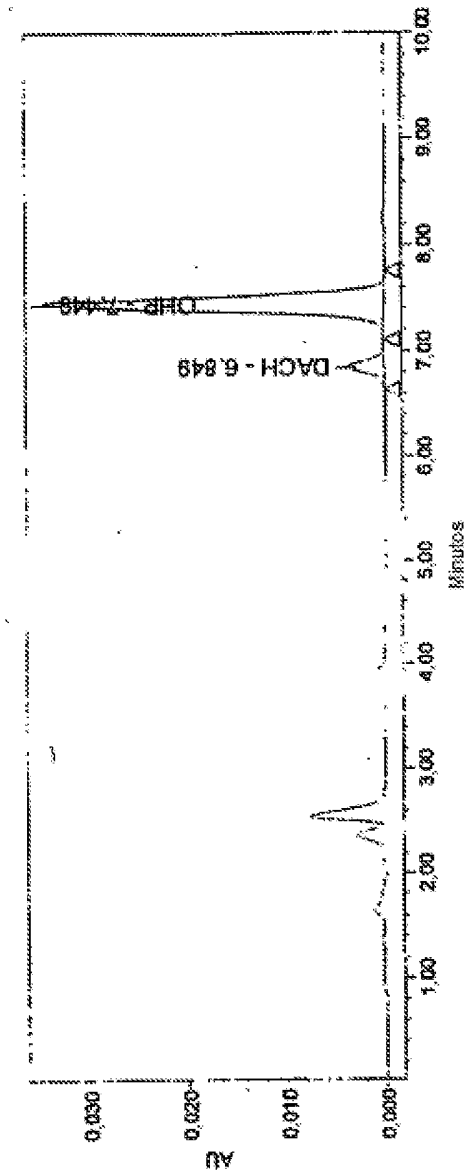


Fig. 25