

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0610026-0 A2**



(22) Data de Depósito: 20/04/2006
(43) Data da Publicação: 18/05/2010
(RPI 2054)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 47/48 (2010.01)
A61K 9/127 (2010.01)

(54) Título: **COMPOSIÇÃO DE IMUNOLIPOSSOMA PARA DIRECIONAMENTO A UM RECEPTOR CELULAR HER2**

(30) Prioridade Unionista: 22/04/2005 US 60/674,029, 14/11/2005 US 60/736,669, 14/11/2005 US 60/736,669, 22/04/2005 US 60/674,029

(73) Titular(es): ALZA CORPORATION

(72) Inventor(es): ANTHONY HUANG, AZAR NAJAFI, FRANCIS M. P. WONG, KRISTEN HJORTSVANG, LAURA KELLEY, LUKE GUO, ROBERT ABRA

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006015122 de 20/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/116107 de 02/11/2006

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO DE IMUNOLIPOSSOMA PARA DIRECIONAMENTO A UM RECEPTOR CELULAR HER2. A presente invenção refere-se a uma composição de imunolipossoma compreendida de lipossomas carregando um ligante para direcionamento a células expressando um receptor de fator de crescimento, tal como HER2, é descrita. Ligação do imunolipossoma a células expressando HER2 resulta em internalização do imunolipossoma para aplicação citoplásmica de um fármaco capturado.

Pet 020070181220
Pi 0610026-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "COMPOSIÇÃO DE IMUNOLIPOSSOMA PARA DIRECIONAMENTO A UM RECEPTOR CELULAR HER2".

Campo da Técnica

5 A presente invenção refere-se a uma composição de lipossoma. Em particular, a matéria objeto refere-se a lipossomas direcionados a um receptor celular específico para aplicação de um fármaco aprisionado em lipossoma à célula.

Antecedentes

10 Lipossomas são vesículas esféricas compreendidas de bicamadas de lipídeo concentricamente ordenadas que encapsulam uma fase aquosa. Lipossomas servem como um veículo de aplicação para agentes terapêuticos contidos na fase aquosa ou em bicamadas de lipídeo. Aplicação de fármacos em forma aprisionada em lipossoma pode prover uma variedade de vantagens, dependendo do fármaco, incluindo, por exemplo, uma toxicidade de fármaco diminuída, farmacocinética alterada ou solubilidade de fármaco aperfeiçoado. Lipossomas quando formulados para incluir um revestimento de superfície de cadeias de polímero hidrofílico, os chamados Stealth® ou lipossomas de circulação longa, oferecem a vantagem adicional de
15 um tempo de vida na circulação sangüínea longo, devido em parte à remoção reduzida dos lipossomas pelo sistema de fagócito mononuclear. Frequentemente um tempo de vida prolongado é necessário a fim de que os lipossomas atinjam sua região ou célula alvo desejada a partir do local de injeção.

25 Lipossomas direcionados têm ligantes de direcionamento ou porções de afinidade ligados à superfície dos lipossomas. Os ligantes de direcionamento pode ser anticorpos ou seus fragmentos, caso onde os lipossomas são referidos como imunolipossomas. Quando administrados sistemicamente os lipossomas direcionados aplicam o agente terapêutico aprisionado a um tecido, região ou célula alvo. Devido ao fato dos lipossomas serem direcionados a uma região ou célula específica, tecido saudável não é
30 exposto ao agente terapêutico. Tais ligantes de direcionamento podem ser

ligados diretamente às superfícies do lipossoma através de acoplamento covalente do ligante de direcionamento aos resíduos de grupo principal polar de componentes lipídeo lipossomais (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.013.556). Esta abordagem, no entanto, é adequada principalmente para lipossomas que não têm cadeias de polímero ligadas à superfície, como as cadeias de polímero interferem com a interação entre o ligante de direcionamento e seu alvo pretendido (Klibanov, A.L. e outros, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1062:142-148 (1991); Hansen, C.B. e outros, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1239:133-144 (1995)).

Alternativamente, os ligantes de direcionamento podem ser ligados às extremidades livres das cadeias de polímero formando o revestimento de superfície sobre os lipossomas (Allen, T.M. e outros, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1237:99-108 (1995); Blume, G. e outros, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1149:180-184 (1993)). Nesta abordagem, o ligante de direcionamento é exposto e prontamente disponível para interação com o alvo pretendido.

O protooncogene HER2 (c-erbB2, neu) e p185^{HER2}, o receptor de fator de crescimento-tirosina cinase que ele codifica, parecem desempenhar um papel na patogênese de muitos cânceres humanos. Superexpressão de p185^{HER2} acontece em 20-30% dos cânceres de mama, e prevê um prognóstico pobre para esses pacientes (Park, J.W. e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1327 (1995)).

O receptor p185^{HER2} é um alvo atraente para uma terapia baseada em anticorpo, uma vez que quando presente, superexpressão de p185^{HER2} geralmente acontece homogeneamente dentro de tumores de mama primários, ainda é expresso apenas em níveis baixos em certas células epiteliais normais. Um anticorpo monoclonal anti-p185^{HER2} de murino, mu-Ab4D5, e uma versão humanizada deste anticorpo, trastuzumab, foram desenvolvidos (Carter, P. e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Patente U.S. No. 5.677.171). Vários anticorpos que se ligam a p185^{HER2} foram também descritos (WO 99/55367).

Lipossomas carregando um anticorpo específico para o receptor HER2 foram descritos (Park, J.W. e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

92:1327 (1995)); Park, J.W. e outros, *J. Controlled Release*, 74:95 (2001); Nielsen, U.B. e outros, *Biochim. Biophys. Acta*, 1591:109 (2002); Patente U.S. No. 6.214.388). Uma relação aparente entre o número de anticorpos por lipossoma, isto é, densidade do anticorpo, sobre grau de ligação e absorção celular é descrita (Nielsen, U.B. e outros, *Biochim. Biophys. Acta*, 1591:109 (2002)). Os resultados deste estudo indicam que a variação na densidade de anticorpos na superfície do lipossoma de a partir de 0 a 30 corresponde a um aumento em absorção celular, que atinge um máximo de 30 anticorpos por lipossoma. Aumento no número de anticorpos anti-HER2 de 30 para 100 por lipossoma não aumentou a absorção celular dos lipossomas.

A eficácia de um tratamento de câncer está diretamente relacionada com a habilidade do tratamento em se direcionar e matar as células do câncer enquanto afetando o mínimo possível de células saudáveis. Embora o conceito de direcionamento de um fármaco especificamente a uma célula de tumor tenha sido amplamente discutido, permanece uma necessidade quanto a uma formulação que seja altamente seletiva para certas células de câncer e que seja feita para ligação *in vivo* ótima a tais certas células de câncer.

Os exemplos acima da técnica relacionada e limitações relacionadas com eles pretendem ser ilustrativos e não exclusivos. Outras limitações da técnica relacionada se tornarão aparentes àqueles versados na técnica quando da leitura do relatório e um estudo dos desenhos.

Breve Sumário

Em um aspecto, uma composição é descrita, a composição compreendendo lipossomas compreendidos de (i) lipídeos de formação de vesícula; (ii) um lipopolímero; (iii) um conjugado de anticorpo de receptor anti-HER2 compreendido de uma porção hidrofóbica de um polímero hidrofílico e (iv) um fármaco aprisionado é descrita. A quantidade de conjugado está presente em uma quantidade eficaz para prover mais do que cerca de 2 anticorpos por lipossoma, em média, e menos do que cerca de 25 anticorpos por lipossoma, em média.

Em uma modalidade, o anticorpo tem um peso molecular entre 5.000-50.000 Dáltons, com mais preferência entre 10.000-50.000 e com mais preferência ainda entre 10.000-30.000. Em uma outra modalidade, o anticorpo tem um peso molecular de menos do que 100.000 Dáltons, com mais preferência de menos do que cerca de 35.000 Dáltons, e com mais preferência ainda de menos do que 30.000 Dáltons.

Em uma outra modalidade, o anticorpo tem uma sequência de aminoácido que tem pelo menos cerca de 80%, de preferência pelo menos cerca de 85%, com mais preferência pelo menos cerca de 90%, de identidade de sequência com SEQ ID NO: 2.

Em uma outra modalidade, o polímero hidrofílico é polietileno glicol tendo um peso molecular entre 750-5000 Dáltons.

Em uma outra modalidade, o fármaco aprisionado é um fármaco citotóxico. Em ainda uma outra modalidade, o fármaco aprisionado é um agente antitumor. Um fármaco aprisionado exemplar é antraciclina, tal como doxorubicina.

Em uma outra modalidade, a quantidade de conjugado provê menos do que cerca de 20 anticorpos por lipossoma, em média, 48 horas após administração *in vivo*.

Em um outro aspecto, uma formulação de imunolipossoma é provida, a formulação compreendendo lipossomas compreendidos de (i) pelo menos um lipídeo de formação de vesícula rígido; (ii) um lipopolímero compreendido de uma porção hidrofóbica e polietileno glicol; (iii) um conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, polietileno glicol e um anticorpo de cadeia simples de receptor anti-HER-2 tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 2; e (iv) um fármaco aprisionado tendo atividade antitumor. Os lipossomas são caracterizados por uma quantidade de conjugado eficaz para prover mais do que cerca de 2 e menos do que cerca de 15 anticorpos por lipossoma 96 horas após administração *in vivo*.

Em uma modalidade, o lipídeo de formação de vesícula rígido é fosfatidilcolina de soja hidrogenada.

Em uma outra modalidade, os lipossomas compreendem ainda

colesterol.

Em ainda um outro aspecto, uma formulação de imunolipossoma é descrita, a formulação compreendendo lipossomas compreendidos de (i) pelo menos um lipídeo de formação de vesícula rígido; (ii) um lipopolímero compreendido de uma porção hidrofóbica e polietileno glicol; (iii) um conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, polietileno glicol e um anticorpo de cadeia simples de receptor anti-HER-2 tendo a identidade de SEQ ID NO:2; e (iv) um fármaco aprisionado tendo atividade antitumor. A formulação de imunolipossoma quando administrada *in vivo* provê uma área sob a curva que é maior do que ou não mais do que 25% menor do que a área sob a curva de lipossomas compreendidos de componentes similares mas sem o anticorpo.

Em uma modalidade, a quantidade de conjugado provê menos do que cerca de 20 anticorpos por lipossoma, em média, 48 horas após administração *in vivo*. Em uma outra modalidade, a quantidade de conjugado provê menos do que cerca de 15 anticorpos por lipossoma, em média, 96 horas após administração *in vivo*.

Em ainda uma outra modalidade, a quantidade de conjugado provê mais do que dois anticorpos por lipossoma, em média, 48 horas após administração *in vivo* e menos do que cerca de 20 anticorpos por lipossoma, em média, 48 horas após administração *in vivo*.

Em ainda um outro aspecto, uma formulação de imunolipossoma é descrita, onde a formulação compreende lipossomas compreendidos de (i) pelo menos um lipídeo de formação de vesícula rígido; (ii) opcionalmente, um lipopolímero compreendido de uma porção hidrofóbica e polietileno glicol; (iii) um conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, polietileno glicol e um anticorpo de cadeia simples de receptor anti-HER-2 tendo pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO:2; e (iv) um fármaco aprisionado tendo atividade antitumor. A composição é caracterizada pela característica de que 96 horas após administração dos imunolipossomas, entre 30-60% de anticorpos dissociam de cada lipossoma para prover uma composição, 96 horas após administração *in vivo* que tem menos do que cerca de 25 anti-

corpos por lipossoma.

Em ainda um outro aspecto, uma composição de lipossoma preparada de acordo com um certo processo é descrita, o processo sendo compreendido de (i) provisão de lipossomas, opcionalmente tendo um revestimento externo de cadeias de polímero hidrofílico e/ou um fármaco aprisionado; (b) incubação dos lipossomas com uma quantidade de conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, polietileno glicol e um anticorpo de cadeia simples de receptor anti-Her-2 tendo pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO:2; e a quantidade de conjugado sendo selecionada para prover (i) mais do que dois anticorpos por lipossoma em média 96 horas após administração *in vivo*; (ii) menos do que 150 anticorpos por lipossoma em média; e/ou (iii) menos do que cerca de 15 anticorpos por lipossoma em média 96 horas após administração *in vivo*.

Em uma modalidade, a quantidade de conjugado provê 12 ou menos, alternativamente 10 ou menos, alternativamente 8 ou menos, anticorpos por lipossoma em média.

Em um outro aspecto, uma composição é descrita, a composição compreendendo lipossomas conforme acima descrito, mas onde os lipossomas antes da administração *in vivo* têm menos do que 25 anticorpos por lipossoma e após administração *in vivo*, os lipossomas perdem entre cerca de 20-50% dos anticorpos ainda retendo ligação ao receptor Her-2 suficiente para citotoxicidade.

Em ainda um outro aspecto, um método de preparação de uma composição de imunolipossoma é provido. O método compreende provisão de imunolipossomas compreendidos de (i) lipídeos de formação de vesícula; (ii) opcionalmente um lipopolímero; (iii) um conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, um polímero hidrofílico e um anticorpo tendo afinidade de ligação para um alvo, tal como um domínio extracelular de um receptor Her-2; e (iv) um fármaco aprisionado. O conjugado é incluído na composição em uma primeira quantidade suficiente para prover um primeiro número selecionado de anticorpos por lipossoma. Os lipossomas são trazidos em contato com sangue, *in vitro* ou *in vivo*, e o número de anticorpos por lipossoma

em um ou mais pontos de tempo quando do contato dos lipossomas com sangue é determinado, por exemplo, através de uma técnica analítica adequada tal como cromatografia. Com base na determinação do número de anticorpos em um primeiro ponto de tempo selecionado após contato com sangue, uma segunda quantidade de conjugado suficiente para prover um segundo número, maior, de anticorpos por lipossoma a fim de prover pelo menos dois anticorpos por lipossoma após contato com sangue em tal ponto de tempo é selecionada.

Em uma modalidade, o método inclui seleção de uma segunda quantidade de conjugado eficaz para prover menos do que 50 anticorpos por lipossoma. Em uma outra modalidade, uma segunda quantidade de conjugado eficaz para prover 30 ou menos anticorpos por lipossoma é selecionada.

Em uma outra modalidade, o método inclui provisão de lipossomas tendo uma primeira quantidade de conjugado que provê menos do que 150 anticorpos por lipossoma, com mais preferência 100 ou menos anticorpos por lipossoma e com mais preferência ainda 75 ou menos anticorpos por lipossoma.

Em adição aos aspectos exemplares e modalidades descritos acima, aspectos e modalidades adicionais se tornarão aparentes através de referência aos desenhos e através do estudo das descrições que seguem.

Breve Descrição dos Desenhos

As figuras 1A-1B mostram um esquema de reação sintética para preparação de um conjugado de lipídeo-polímero-anticorpo onde uma maleimida de um DSPE carbamato de polietileno glicol (PEG) bis (amina) é formada;

A figura 2A mostra a viabilidade celular, expressa como uma porcentagem de células de controle não-tratado, como uma função de concentração de doxorrubicina, em $\mu\text{g/mL}$, após 10 minutos de exposição à doxorrubicina administrada como fármaco livre, aprisionado em lipossomas (círculos), ou aprisionada em imunolipossomas contendo 2 (círculos), 5 (quadrados), 7,5 (diamantes) ou 15 (triângulos) anticorpos por lipossoma;

A figura 2B mostra a viabilidade celular, expressa como uma porcentagem de células de controle não-tratado, como uma função de concentração de doxorubicina, em $\mu\text{g/ml}$, após quatro horas de exposição à doxorubicina administrada como fármaco livre (diamantes), aprisionada em lipossomas (triângulos) ou aprisionada em imunolipossomas contendo 7,5 (símbolos X), 15 (símbolos *), 30 (círculos) ou 45 (quadrados) anticorpos por lipossoma;

As figuras 3A-3H mostram o perfil de eluição de scFv radiomarcado (^{125}I) de imunolipossomas tendo 15 anticorpos scFv marcados por lipossoma de alíquotas removidas durante incubação dos imunolipossomas em plasma humano, as alíquotas removidas em tempos de 0 hora (figura 3A), 1 hora (figura 3B), 4 horas (figura 3C), 8 horas (figura 3D), 24 horas (figura 3E), 48 horas (figura 3F), 72 horas (figura 3G) e 96 horas (figura 3E);

A figura 4A mostra a dissociação de anticorpo scFv marcado com ^{125}I de formulações imunolipossoma tendo razões de anticorpo/lipossoma de 7,5:1 (diamantes), 15:1 (quadrados), 30:1 (círculos), 45:1 (triângulos) e 90:1 (*) como uma função de tempo de incubação, em horas, em plasma humano *in vitro*.

A figura 4B mostra a porcentagem de marcador ^{125}I restante nos imunolipossomas tendo razões de anticorpo/lipossoma de 7,5:1 (diamantes), 15:1 (quadrados), 30:1 (círculos), 45:1 (triângulos) e 90:1 (*) como uma função de tempo de incubação, em horas, em plasma humano *in vitro*;

A figura 5A mostra a porcentagem de anticorpo radiomarcado dissociado da formulação de imunolipossoma tendo 15 anticorpos por lipossoma em dois estudos diferentes (diamantes, quadrados) como uma função de tempo de incubação, em horas, em plasma humano *in vitro*;

A figura 5B mostra a porcentagem de anticorpo radiomarcado que permanece nos imunolipossomas (diamantes) e dissociado dos imunolipossomas (quadrados) da formulação de imunolipossoma tendo 15 anticorpos por lipossoma como uma função de tempo de incubação, em horas, em plasma humano;

A figura 6A mostra a porcentagem de anticorpo scFv marcado

com ^{125}I recuperado na fração lipossomal de amostras de plasma como uma função de tempo, em horas, após administração de uma formulação de imunolipossoma 15:1 a ratos;

5 A figura 6B mostra a concentração de anticorpo scFv marcado com ^{125}I , em ng/mL, recuperado na fração lipossoma de plasma de rato após separação da coluna Sepharose CL-4B como uma função de tempo, em horas, após administração de uma formulação de imunolipossoma 15:1 a ratos;

10 A figura 6C mostra a concentração de anticorpo scFv marcado com ^{125}I , em ng/mL, recuperado na fração livre ou de plasma de plasma de rato após separação em uma coluna Sepharose CL-4B como uma função de tempo, em horas, após administração de uma formulação de imunolipossoma 15:1 a ratos;

15 A figura 7A mostra a porcentagem de scFv marcado com ^{125}I restante no plasma (diamantes), no sangue (quadrados fechados) e a porcentagem de doxorrubicina no plasma (triângulos) como uma função de tempo, em horas, após administração de uma formulação de imunolipossoma 15:1 a ratos. Também mostrada é a porcentagem de anticorpo scFv marcado com ^{125}I no plasma (círculos abertos) e no sangue (quadrados abertos) como uma função de tempo, em horas, após administração como um
20 conjugado livre a ratos em uma dose de doxorrubicina de 2 mg/kg;

A figura 7B mostra a concentração no plasma de doxorrubicina, em $\mu\text{g/mL}$, como uma função de tempo, em horas, após administração de uma formulação de imunolipossoma 15:1 a ratos em uma dose de 2 mg/kg;

25 A figura 8 é um gráfico da razão de anticorpo scFv marcado com ^{125}I para doxorrubicina no sangue, em ng/ μg , como uma função de tempo, em horas, após administração de uma formulação de imunolipossoma 15:1 a ratos;

30 A figura 9 é um gráfico de concentração de doxorrubicina no plasma, em $\mu\text{g/mL}$, como uma função de tempo, em horas, após administração *in vivo* de lipossomas PEGuilados contendo doxorrubicina (diamantes) ou de imunolipossomas contendo 15 (quadrados), 75 (triângulos), 150 (x) ou 300 (*) anticorpos scFv por lipossoma;

As figuras 10A-10B mostram o volume de tumor, em porcentagem relativo ao tamanho de tumor inicial, (figura 10A) e a mudança percentual no peso do corpo (figura 10B) em camundongos carregando um xenoinxerto de tumor de mama e tratados com solução salina (círculos abertos), lipossomas PEGuilados contendo doxorrubicina (quadrados abertos) ou imunolipossomas contendo 7,5 (diamantes), 15 (triângulos), 30 (quadrados fechados) ou 45 (círculos fechados) anticorpos scFv por lipossoma;

A figura 11 é um gráfico de volume de tumor relativo, tomado como uma porcentagem de volume de tumor inicial, como uma função de tempo, em dias, em camundongos carregando um xenoinxerto de tumor de mama e tratados com solução salina (círculos abertos), lipossomas PEGuilados contendo doxorrubicina em dosagens de 2 mg/kg (quadrados abertos) e 3 mg/kg (diamantes abertos) ou com uma formulação de imunolipossoma 15:1 em dosagens de 2 mg/kg (quadrados fechados), 3 mg/kg (diamantes fechados) ou 4 mg/kg (triângulos fechados);

A figura 12 é um gráfico de concentração de doxorrubicina no plasma, em ng/mL, como uma função de tempo, em horas, após administração intravenosa a macacos de doxorrubicina (10 mg/mL) aprisionada em imunolipossomas carregando 15 anticorpos scFv por lipossoma, em média, (círculos) ou aprisionada em lipossomas PEGuilados (quadrados);

A figura 13A é um gráfico da concentração de doxorrubicina no plasma, em ng/mL, como uma função de tempo, em horas, após administração intravenosa a macacos de doxorrubicina aprisionada em imunolipossomas carregando 15 anticorpos scFv por lipossoma, em média, a doxorrubicina administrada em dosagens de 1 mg/kg (círculo), 5 mg/kg (quadrados) e 10 mg/kg (triângulos);

A figura 13B é um gráfico da concentração de anticorpo no plasma, em ng/mL, como uma função de tempo, em horas, após administração intravenosa a macacos de doxorrubicina aprisionada em imunolipossomas carregando 15 anticorpos scFv por lipossoma, em média, os imunolipossomas administrados em dosagens de doxorrubicina de 1 mg/kg (círculos), 5 mg/kg (quadrados) e 10 mg/kg (triângulos);

A figura 14A é um gráfico da razão de concentração de anticorpo scFv/doxorubicina em plasma, em ng/ μ g, como uma função de tempo, em horas, após administração a macacos de doxorubicina aprisionada em imunolipossomas carregando 15 anticorpos scFv por lipossoma, em média, os
5 imunolipossomas administrados em dosagens de doxorubicina de 1 mg/kg (diamantes), 5 mg/kg (quadrados) e 10 mg/kg (triângulos);

A figura 14B é um gráfico da razão de concentração de anticorpo scFv/doxorubicina em plasma normalizado para a razão de anticorpo/doxorubicina inicial, como uma função de tempo, em horas, após administração a macacos de doxorubicina aprisionada em imunolipossomas carregando 15 anticorpos scFv por lipossoma, em média, os imunolipossomas administrados em dosagens de doxorubicina de 1 mg/kg (diamantes), 5
10 mg/kg (quadrados) e 10 mg/kg (triângulos); e

A figura 15A é um gráfico de concentração de doxorubicina, em ng/m, como uma função de tempo, em horas, após administração a macacos de doxorubicina aprisionada em imunolipossomas carregando 15 anticorpos scFv por lipossoma, em média, os imunolipossomas administrados em dosagens de doxorubicina de 0,5 mg/kg (quadrados), 2 mg/kg (triângulos) e 4
15 mg/kg (triângulos invertidos);

A figura 15B é um gráfico de concentração de doxorubicina, em ng/mL, como uma função de tempo, em horas, após administração a macacos de doxorubicina aprisionada em imunolipossomas carregando 15 anticorpos scFv por lipossoma, em média, os imunolipossomas administrados em uma dosagem de doxorubicina de 4 mg/kg seis vezes durante um período de seis meses, os dados correspondendo às primeira (triângulos invertidos) e sexta (quadrados) doses;
20
25

A figura 15C é um gráfico de concentração de doxorubicina, em ng/mL, como uma função de tempo, em horas, após administração a macacos de 4 mg/kg de doxorubicina em forma livre (triângulos), aprisionada em lipossomas PEGuilados (DOXIL[®]; quadrados) ou aprisionada em imunolipossomas carregando 15 anticorpos scFv por lipossoma, em média (triângulos invertidos).
30

Breve Descrição das Seqüências

A SEQ ID NO:1 é a seqüência de nucleotídeo de um anticorpo tendo afinidade de ligação para o domínio extracelular de receptor c-erb-B2, também referido aqui como receptor HER2 e o receptor p185^{HER2}.

- 5 A SEQ ID NO:2 é a seqüência de aminoácido de um anticorpo de cadeia simples (scFv) chamado F5, tendo a habilidade em especificamente se ligar ao domínio extracelular de receptor HER2.

Descrição Detalhada

I. Definições

- 10 A menos que de outro modo mencionado, o termo "lipídeo de formação de vesícula" refere-se a qualquer lipídeo capaz de formar parte de uma composição de micela ou lipossoma estável e tipicamente incluindo uma ou duas cadeias de hidrocarbono, hidrofóbicas, ou um grupo esteróide e pode conter um grupo quimicamente reativo, tal como uma amina, um éster ácido, aldeído ou álcool, como seu grupo principal polar.

- 15 Conforme aqui usado, um "anticorpo" inclui anticorpos integrais e qualquer fragmento de ligação de antígeno ou sua cadeia simples. Deste modo, o anticorpo inclui qualquer molécula contendo proteína ou peptídeo que compreende pelo menos uma porção de uma molécula de imunoglobulina, tal como, mas não limitado a, pelo menos uma região de determinação de complementariedade (CDR) de uma cadeia pesada ou leve ou uma porção de ligação de ligante dela, uma região variável de cadeia pesada ou cadeia leve, uma região constante de cadeia pesada ou cadeia leve, uma região de estrutura (FR), ou qualquer porção dela, ou pelo menos uma porção
- 20 de uma proteína de ligação.

- 25 O termo "anticorpo" pretende ainda compreender fragmentos de digestão de anticorpo, suas porções especificadas e variantes, incluindo miméticos de anticorpo ou compreendendo domínios de anticorpos que imitam a estrutura e/ou função de um anticorpo ou seu fragmento ou porção especificada, incluindo anticorpos de cadeia simples e seus fragmentos. Fragmentos funcionais incluem fragmentos de ligação de antígeno que se ligam a
- 30 uma proteína HER2 de mamífero que é um receptor de fator de crescimento.

Exemplos de fragmentos de ligação compreendidos no termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de união; (iii) um fragmento Fd consistindo nos domínios VH e CH; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um braço simples de anticorpo, (v) e um fragmento dAb (Ward e outros, *Nature*, 341:544-546 (1989)), que consiste em um domínio VH; e (vi) uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR). Ainda, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que eles sejam feitos como uma cadeia de proteína única onde as regiões VL e VH emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como cadeia única Fv (scFv); vide, por exemplo, Bird e outros, *Science*, 242:423-426 (1988), Huston e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988)). Tais anticorpos de cadeia simples são também pretendidos ser compreendidos dentro do termo anticorpo. Esses anticorpos são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas daqueles versados na técnica, e os fragmentos são avaliados quanto à utilidade da mesma maneira que o são os anticorpos intactos.

Tais fragmentos podem ser produzidos através de clivagem enzimática, técnicas sintéticas ou recombinantes, como conhecido na técnica e/ou conforme descrito aqui. Anticorpos podem ser também produzidos em uma variedade de formas truncadas usando genes de anticorpo onde um ou mais códons de parada foram introduzidos a montante do sítio de parada natural. Por exemplo, um gene de combinação codificando uma porção de cadeia pesada F(ab')₂ pode ser feito para incluir seqüências de DNA codificando o domínio CH1 e/ou região de união da cadeia pesada. As várias porções de anticorpos podem ser unidas quimicamente através de técnicas convencionais, ou podem ser preparadas como uma proteína contígua usando técnicas de engenharia genética.

Por "receptor HER2" e "p185HER2" se quer dizer a proteína codificada pelo gene HER2 ou ERBB2 (v-erb-2, homólogo 2 do oncogene viral de leucemia eritroblástica) e também chamado o homólogo do oncogene derivado de neuro/glioblastoma; homólogo 2 do oncogene viral (v-erb-2) de leucemia eritroblástica de ave; homólogo 2 do oncogene viral da leucemia eritroblástica de ave v-erb-b2 (homólogo de oncogene derivado de neuro/glioblastoma). O gene HER2/ERBB2 codifica um membro da família de receptor de fator de crescimento epidermal (EGF) de receptor tirosina cinase. A sequência de codificação para HER2 é dada pela sequência de referência NM_004448 cujo produto de tradução é dado por NP_004439. O receptor HER2 não tem nenhum domínio de ligação de ligante próprio e então não pode ligar fatores de crescimento. No entanto, ele realmente se liga fortemente a outros membros da família de receptor EGF ligado a ligante para formar um heterodímero, estabilizando a ligação de ligante e aumentando a ativação mediada por cinase de cursos de sinalização a jusante, tal como aqueles envolvendo proteína cinase e fosfatidilinositol-3 cinase ativadas por mitógeno. Variações alélicas em posições de aminoácido 654 e 655 de isoforma (posições 624 e 625 de isoforma b) foram descritas, com o alelo mais comum, Ile654/Ile655. União alternativa resulta em várias variantes de transcrito adicionais, algumas codificando isoformas diferentes. Todas as variantes alélicas e de união estão incluídas no significado de "receptor HER2".

Um "anticorpo de internalização" é um anticorpo que, quando da ligação a um receptor ou outro ligante sobre a superfície de uma célula, é transportado para a célula, por exemplo, para uma lisozima ou outra organela ou para o citoplasma.

O termo "isolado" refere-se a material que é substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente o acompanham conforme encontrado em seu estado nativo.

O termo "idêntico" ou "identidade" percentual ou "homologia" percentual no contexto de duas ou mais sequências de ácido nucléico ou polipeptídeo refere-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são iguais ou têm uma porcentagem especificada de resíduos de aminoáci-

do ou nucleotídeo que é igual, quando comparadas com e alinhadas para correspondência máxima, conforme medido através de inspeção visual ou usando um algoritmo de computador.

Conforme aqui usado, o termo "afinidade" de um anticorpo refere-se à constante de dissociação, K_D , do anticorpo para um antígeno predeterminado. Anticorpos de alta afinidade têm uma K_D de 10^{-8} M ou menos, com mais preferência 10^{-9} M ou menos e com mais preferência ainda 10^{-10} M ou menos, para um antígeno predeterminado. O termos "Kdis" ou " K_D " ou "Kd", conforme aqui usado, pretendem se referir à taxa de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno particular. A " K_D " é a razão da taxa de dissociação (k_2), também chamada de "*off-rate* (k_{off})", para a taxa de taxa de associação (k_1) ou a "*on-rate* (k_{on})". Deste modo, K_D é igual a k_2/k_1 ou k_{off}/k_{on} e é expressa como uma concentração molar (M). Portanto quanto menor a K_D , mais forte a ligação. Então uma K_D de 10^{-6} M (ou 1 μ M) indica uma ligação fraca comparado com 10^{-9} M (ou 1 nM).

As expressões "um anticorpo reconhecendo um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são usadas intercomutavelmente aqui com o termo "um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno". Conforme aqui usado, "ligação específica" e "se liga especificamente" se referem à ligação de anticorpo a um antígeno predeterminado com maior afinidade do que para outros antígenos ou proteínas. Tipicamente, o anticorpo se liga com uma constante de dissociação (K_D) de 10^{-6} M ou menos, e se liga ao antígeno predeterminado com uma K_D que é pelo menos duas vezes menos do que sua K_D para ligação a um antígeno não-específico (por exemplo, BSA, caseína ou qualquer outro polipeptídeo especificado) outro que não o antígeno predeterminado. As expressões "um anticorpo reconhecendo um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são usadas intercomutavelmente aqui com o termo "um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno".

Conforme revelado e reivindicado aqui, a seqüência mostrada na SEQ ID NO:2 inclui "modificações de seqüência conservativas", isto é, modificações de seqüência de nucleotídeos e aminoácidos que não afetam ou

alteram significativamente as características de ligação do anticorpo codificado pela sequência de nucleotídeo ou contendo a sequência de aminoácido. Tais modificações de sequência conservativas incluem substituições, adições ou deleções de nucleotídeo e aminoácido. Modificações podem ser

5 introduzidas na SEQ ID NO:2 através de técnicas padrão conhecidas no campo, tal como mutagênese direcionada ao sítio e mutagênese mediada por PCR. Substituições de aminoácido conservativas incluem uma onde o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácido tendo cadei-

10 as laterais similares foram definidas na técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não-carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais

15 não-polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

II. Composição de Lipossoma

20 Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição de lipossoma compreendida de lipossomas que incluem como um ligante de direcionamento um anticorpo tendo especificidade de ligação para um receptor de fator de crescimento HER2. O ligante de direcionamento a HER2 é incorporado aos lipossomas na forma de um conjugado de lipídeo-polímero-

25 anticorpo, também referido aqui como um conjugado de lipídeo-polímero-ligante. Como será descrito abaixo, o anticorpo tem afinidade específica para o domínio externo do receptor HER2 e direciona os lipossomas para células que expressam receptor HER2. As seções que seguem descrevem os componentes do lipossoma, incluindo os lipídeos e agentes terapêuticos do li-

30 possoma, preparação de lipossomas carregando um ligante de direcionamento a HER2 e métodos de uso da composição lipossomal para tratamento de distúrbios.

A. Componentes Lipídeo de Lipossoma

Lipossomas adequados para uso na composição da presente invenção incluem aqueles compostos principalmente de lipídeos de formação de vesícula. Tal lipídeo de formação de vesícula é um que pode se formar espontaneamente em vesículas bicamada em água, conforme exemplificado por fosfolipídeos, com sua porção hidrofóbica em contato com a região hidrofóbica, interior, da membrana bicamada, e sua porção de grupo principal orientada em direção à superfície polar, exterior, da membrana. Lipídeos capazes de incorporação estável a bicamadas de lipídeo, tal como colesterol e seus vários análogos, podem ser também usados nos lipossomas.

Os lipídeos de formação de vesícula são de preferência lipídeos tendo duas cadeias hidrocarbono, tipicamente cadeias acila, e um grupo principal, ou polar ou não-polar. Existe uma variedade de lipídeos de formação de vesícula sintéticos e lipídeos de formação de vesícula de ocorrência natural, incluindo os fosfolipídeos, tal como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol e esfingomielina, onde as duas cadeias hidrocarbono são tipicamente entre cerca de 14-22 átomos de carbono de comprimento, e têm graus variáveis de insaturação. Os lipídeos e fosfolipídeos descritos acima cujas cadeias carbono têm graus variáveis de saturação podem ser obtidos comercialmente ou preparados de acordo com métodos publicados. Outros lipídeos adequados incluem glicolipídeos, cerebrosideos e esteróis, tal como colesterol.

Lipídeos catiônicos são também adequados para uso nos lipossomas da invenção, onde o lipídeo catiônico pode ser incluído como um componente em quantidade menor da composição de lipídeo ou como um componente principal ou único. Tais lipídeos catiônicos tipicamente têm uma porção lipofílica, tal como um esterol, uma cadeia acila ou diacila, e onde o lipídeo tem uma carga positiva líquida geral. De preferência, o grupo principal do lipídeo carrega a carga positiva. Lipídeos catiônicos exemplares incluem 1,2-dioleilóxi-3-(trimetilamino) propano (DOTAP); brometo de N-[1-(2,3-ditetradecilóxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroximetilamônio (DMRIE); brometo de N-[1-(2,3-dioleilóxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidróxi etilamônio (DORIE);

cloreto de N-[1-(2,3-dioleilóxi)propil]-N,N-trimetilamônio (DOTMA); 3-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol (DC-Chol); e dimetildiocetadecilamônio (DDAB). O lipídeo de formação de vesícula catiônico pode ser também um lipídeo neutro, tal como dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE) ou um
5 lipídeo anfifático, tal como um fosfolipídeo, derivatizado com um lipídeo catiônico, tal como polilisina ou outros lipídeos de poliamina. Por exemplo, o lipídeo neutro (DOPE) pode ser derivatizado com polilisina para formar um lipídeo catiônico.

O lipídeo de formação de vesícula pode ser selecionado para
10 atingir um grau especificado de fluidez ou rigidez, para controlar a estabilidade do lipossoma no soro, para controlar as condições eficazes para inserção do conjugado de direcionamento, como será descrito, e/ou para controlar a taxa de liberação do agente aprisionado no lipossoma. Lipossomas tendo uma bicamada de lipídeo mais rígida, ou uma bicamada cristalina lí-
15 quida, são obtidos através da incorporação de um lipídeo relativamente rígido, por exemplo, um lipídeo tendo uma temperatura de transição de fase relativamente alta, por exemplo, até 60° C. Lipídeos rígidos, isto é, saturados, contribuem para rigidez de membrana maior na bicamada de lipídeo. Outros componentes de lipídeo, tal como colesterol, são também conhecidos
20 contribuir para a rigidez da membrana em estruturas em bicamada de lipídeo.

Por outro lado, fluidez de lipídeo é conseguida através da incorporação de um lipídeo relativamente fluido, tipicamente um tendo uma fase de lipídeo com uma temperatura de transição de fase cristalina-líquido para
25 líquido relativamente baixa, por exemplo, na ou abaixo da temperatura ambiente.

Os lipossomas também incluem um lipídeo de formação de vesícula covalentemente ligado a um polímero hidrofílico, também referido aqui como um "lipopolímero". Como foi descrito, por exemplo, na Patente U.S.
30 No. 5.013.556, inclusão de tal lipídeo derivatizado de polímero na composição de lipossoma forma um revestimento de superfície de cadeias de polímero hidrofílico em torno do lipossoma. O revestimento de superfície de ca-

deias de polímero hidrofílico é eficaz para aumentar o tempo de vida da circulação sanguínea *in vivo* dos lipossomas quando comparado com lipossomas sem tal revestimento.

Lípídeos de formação de vesícula adequados para derivatização com um polímero hidrofílico incluem qualquer um desses lípídeos listados acima, e, em particular, fosfolípídeos, tal como diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE).

Polímeros hidrofílicos adequados para derivatização com um lípídeo de formação de vesícula incluem polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, poliidroxi propiloxazolina, poliidroxi propilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilmetacrilamida, poliidroxi propilmetacrilato, poliidroxi etilacrilato, hidroximetilcelulose, hidroxietilcelulose, polietilenoglicol, poliaspartamida e seqüências de peptídeo hidrofílico. Os polímeros podem ser empregados como homopolímeros ou como copolímeros em bloco ou aleatórios.

Uma cadeia de polímero hidrofílico preferida é polietilenoglicol (PEG), de preferência como uma cadeia de PEG tendo um peso molecular entre 500-1.000 Dáltons, com mais preferência entre 750-10.000 Dáltons, com mais preferência ainda entre 750-5000 Dáltons. Análogos capeados com metóxi ou etóxi de PEG são também polímeros hidrofílicos preferidos, comercialmente disponíveis em uma variedade de tamanhos de polímero, por exemplo, 120-20.000 Dáltons.

Preparação de lípídeos de formação de vesícula derivatizados com polímeros hidrofílicos foi descrita, por exemplo, na Patente U.S. No. 5.395.619. Preparação de lipossomas incluindo tais lípídeos derivatizados foi também descrita, onde tipicamente entre 1-20 por cento em mol de tal lípídeo derivatizado estão incluídos na formulação de lipossoma (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.013.556).

B. Anticorpo de Direcionamento

A composição de lipossoma também inclui um anticorpo que direciona as partículas de lípídeo a uma célula. Em uma modalidade, o anticorpo se liga especificamente a receptor HER2 sobre a superfície de uma

célula derivada de tumor. Em uma outra modalidade, o anticorpo compreende pelo menos um domínio de ligação que especificamente se liga ao receptor HER2 sobre a superfície de uma célula derivada de tumor. Em uma modalidade alternativa, o anticorpo é um anticorpo de cadeia simples compreendendo pelo menos um domínio de ligação que especificamente se liga a receptor HER2 sobre a superfície de uma célula derivada de tumor.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo para uso na composição de lipossoma descrita aqui é um anticorpo de cadeia simples compreendendo pelo menos um domínio de ligação que especificamente se liga a receptor HER2 sobre a superfície de uma célula derivada de tumor e tem uma seqüência identificada aqui como SEQ ID NO:2. A preparação deste anticorpo é descrita no WO 99/55367 e o anticorpo é chamado F5. O anticorpo é um fragmento de anticorpo de cadeia única (scFv) que especificamente se liga ao domínio extracelular do produto de proteína c-erb-B2 do oncogene HER2/neu, e é também referido aqui como o anticorpo anti-HER2, ou um anticorpo tendo afinidade de ligação para o receptor HER2. O anticorpo F5 é compreendido de domínios variáveis de anticorpo humano conectados por uma molécula ligante e contém 252 aminoácidos com uma cisteína terminal (peso molecular 27,6 K_D) e tem afinidade de ligação com HER2 moderada ($K_d=150-300$ nM ou $1,5-3 \times 10^{-7}$ M). O anticorpo anti-HER2 da invenção é rapidamente internalizado em células que expressam o receptor HER2 sobre sua superfície de membrana.

Em uma modalidade, o anticorpo anti-HER2 tem uma seqüência que representa substituição conservativa de SEQ ID NO:2.

25 C. Preparação de Conjugado de Lipídeo-Polímero-Anticorpo

Conforme acima descrito, o anticorpo anti-HER2 é covalentemente ligado à extremidade distal livre de uma cadeia de polímero hidrofílico, que é ligado em sua extremidade proximal a um lipídeo de formação de vesícula. Há uma ampla variedade de técnicas para ligação de um polímero hidrofílico selecionado a um lipídeo selecionado e ativação da extremidade não-ligada, livre, do polímero para reação com um ligante selecionado e, em particular, o polímero hidrofílico de polietilenoglicol (PEG) tem sido ampla-

mente estudado (Allen, T.M. e outros, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1237:108 (1995); Zalipsky, S., *Bioconjugate Chem.*, 4(4):296-299 (1993); Zalipsky, S. e outros, *FEBS Lett.*, 353:71-74 (1994); Zalipsky, S. e outros, *Bioconjugate Chemistry*, 6(6):705-708 (1995); Zalipsky, S. em *STEALTH LI-POSOMES* (D. Lasic e F. Martin, Eds.) Capítulo 9, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1995)).

Em geral, as cadeias de PEG são funcionalizadas para conter grupos reativos adequados para acoplamento com, por exemplo, sulfidrilas, grupos amino e aldeídos ou cetonas (tipicamente derivados de oxidação suave de porções carboidrato de um anticorpo) presentes em uma ampla variedade de ligantes. Exemplos de tais grupos reativos PEG-terminais incluem maleimida (para reação com grupos sulfidrilas), N-hidroxissuccinimida (NHS) ou éster de carbonato de NHS (para reação com aminas primárias), hidrazida ou hidrazina (para reação com aldeídos ou cetonas), iodoacetila (de preferência reativo com grupos sulfidrilas) e ditiopiridina (tiol-reativa). Esquemas de reação sintética para ativação de PEG com tais grupos são mostrados nas Patentes U.S. Nos. 5.631.018, 5.527.528, 5.395.619 e as seções relevantes descrevendo procedimentos de reação sintética são expressamente aqui incorporadas a título de referência.

Esquema de reação sintética exemplar é mostrado nas figuras 1A-1B. Detalhes da reação são dados na Patente U.S. No. 6.326.353. Resumidamente, polietileno glicol (PEG) bis (amina) (Composto I) é reagida com cloreto de 2-nitrobenzeno sulfonila para gerar o produto monoprotetido (Composto II). O Composto II é reagido com carbonil diimidazol em trietilamina (TEA) para formar o imidazol carbamato da mono 2-nitrobenzenossulfonamida (Composto III). O composto III é reagido com DSPE em TEA para formar o lipídeo PE derivatizado protegido em uma extremidade com cloreto de 2-nitrobenzil sulfonila. O grupo de proteção é removido através de tratamento com ácido para dar o produto DSPE-PEG (Composto IX) tendo uma amina terminal na cadeia PEG. Reação com anidrido de ácido maléico dá o produto maleâmico correspondente (Composto V), que em reação com anidrido acético dá o produto de PE-PEG-maleimida

(Composto VI). O composto é reativo com grupos sulfidril, para acoplamento dos anticorpos antiintegrina descritos aqui através de uma ligação tioéter (Composto VII).

- 5 Será compreendido que qualquer um dos polímeros hidrofílicos mencionados acima em combinação com qualquer um dos lipídeos de formação de vesícula acima mencionados pode ser empregado como agentes de modificação para preparar o conjugado de direcionamento lipídeo-polímero-ligante e seqüências de reação adequadas para qualquer polímero selecionado podem ser determinadas por aqueles versados na técnica.

10 D. Preparação de Lipossoma

- Várias abordagens foram descritas para preparação de lipossomas tendo um ligante de direcionamento ligado à extremidade distal de cadeias de polímero ligadas a lipossoma. Uma abordagem envolve preparação de vesículas de lipídeo que incluem um derivado de lipídeo-polímero funcionalizado na extremidade; isto é, um conjugado de lipídeo-polímero onde a
15 extremidade de polímero livre é reativa ou "ativada" (vide, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 6.326.353 e 6.132.763). Tal conjugado ativado é incluído na composição de lipossoma e as extremidades do polímero ativadas são reagidas com um ligante de direcionamento após formação de lipossoma. Em
20 uma outra abordagem, o conjugado de lipídeo-polímero-ligante é incluído na composição de lipídeo no momento da formação de lipossoma (vide, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 6.224.903, 5.620.689). Em ainda uma outra abordagem, uma solução micelar do conjugado de lipídeo-polímero-ligante é incubada com uma suspensão de lipossomas e o conjugado de lipídeo-
25 polímero-ligante é inserido nos lipossomas pré-formados (vide, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 6.056.973, 6.316.024).

- Lipossomas carregando um agente aprisionado e carregando ligantes de direcionamento ligados à superfície, isto é, lipossomas terapêuticos, direcionados, são preparados através de qualquer uma dessas aborda-
30 gens. Um método preferido de preparação é o método de inserção, onde lipossomas pré-formados são incubados com o conjugado de direcionamento para se obter inserção do conjugado de direcionamento nas bicamadas

lipossomais. Nesta abordagem, lipossomas são preparados através de uma variedade de técnicas, tal como aquelas detalhadas em Szoka, F., Jr. e outros, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9:467 (1980), e exemplos específicos de lipossomas preparados em apoio da presente invenção serão descritos abaixo. Tipicamente, os lipossomas são vesículas multilamelares (MLVs), que podem ser formadas através de técnicas de hidratação de película de lipídeo simples. Neste procedimento, uma mistura de lipídeos de formação de lipossoma do tipo detalhado acima dissolvida em um solvente orgânico adequado é evaporada em um recipiente para formar uma película fina, que é então coberta por um meio aquoso. A película de lipídeo hidrata para formar MLVs, tipicamente com tamanhos entre cerca de 0,1 a 10 microns.

Os lipossomas podem incluir um lipídeo de formação de vesícula derivatizado com um polímero hidrofílico para formar um revestimento de superfície de cadeias de polímero hidrofílico sobre a superfície dos lipossomas. Adição de um conjugado de lipídeo-polímero é opcional, uma vez que após a etapa de inserção, descrita abaixo, os lipossomas vão incluir ligante de direcionamento de lipídeo-polímero. Cadeias de polímero adicionais adicionadas à mistura de lipídeo no momento da formação de lipossoma e na forma de um conjugado de lipídeo-polímero resulta em cadeias de polímero se estendendo de ambas superfícies interna e externa das bicamadas de lipídeo lipossomais. Adição de um conjugado de lipídeo-polímero no momento da formação de lipossoma é tipicamente conseguida incluindo entre 1-20 por cento em mol do lipídeo derivatizado de polímero com os componentes de formação de lipossoma restantes, por exemplo, lipídeos de formação de vesícula. Métodos exemplares de preparação de lipídeos derivatizados de polímero e de formação de lipossomas revestidos por polímero foram descritos nas Patentes U.S. Nos. 5.013.556, 5.631.018 e 5.395.619, que são aqui incorporadas a título de referência. Será compreendido que o polímero hidrofílico pode ser estavelmente acoplado ao lipídeo, ou acoplado através de uma ligação instável, que permite que os lipossomas revestidos soltem o revestimento de cadeias de polímero conforme eles circulam na corrente sanguínea ou em resposta a estímulos.

Os lipossomas também incluem um agente terapêutico ou de diagnóstico, e agentes exemplares são providos abaixo. O agente selecionado é incorporado a lipossomas através de métodos padrão, incluindo (i) aprisionamento passivo de composto solúvel em água através da hidratação de uma película de lipídeo com uma solução aquosa do agente, (ii) aprisionamento passivo de um composto lipofílico através da hidratação de uma película de lipídeo contendo o agente e (iii) carregamento de um fármaco ionizável contra um gradiente de pH de lipossoma interno/externo. Outros métodos, tal como evaporação de fase reversa, são também adequados.

10 Após formação do lipossoma, os lipossomas podem ser dimensionados para se obter uma população de lipossomas tendo uma faixa de tamanho substancialmente homogênea, tipicamente entre cerca de 0,01 a 0,5 micron, com mais preferência entre 0,03-0,40 micron. Um método de dimensionamento eficaz para REVs e MLVs envolve extrusão de uma suspensão aquosa dos lipossomas através de uma série de membranas de polycarbonato tendo um tamanho de poro uniforme selecionado na faixa de 15 0,03 a 0,2 micron, tipicamente 0,05, 0,08, 0,1 ou 0,2 micron. O tamanho do poro da membrana corresponde mais ou menos aos tamanhos maiores de lipossomas produzidos por extrusão através desta membrana, particularmente onde a preparação for extrudada duas ou mais vezes através da 20 mesma membrana. Métodos de homogeneização são também úteis para lipossomas de dimensionamento baixo para tamanhos de 100 nm ou menos (Martin, F.J., em SPECIALIZED DRUG DELIVERY SYSTEMS - MANUFACTURING AND PRODUCTION TECHNOLOGY, P. TYLE, Ed., Marcel Dekker, 25 Nova York, pp. 267-316 (1990)).

 Após formação dos lipossomas, um ligante alvo é incorporado para se obter um lipossoma terapêutico, direcionado à célula. O ligante de direcionamento é incorporado através de incubação dos lipossomas pré-formados com o conjugado de lipídeo-polímero-ligante, preparado conforme 30 descrito acima. Os lipossomas pré-formados e os conjugados são incubados sob condições eficazes para associação com o conjugado e os lipossomas, que podem incluir interação do conjugado com bicamada de lipossoma ex-

terna ou inserção do conjugado na bicamada de lipossoma. Mais especificamente, os dois componentes são incubados juntos sob condições que obtêm associação do conjugado com os lipossomas de uma tal maneira que o ligante de direcionamento é orientado exteriormente da superfície do lipossoma, e então disponível para interação com seu receptor cognato. Será compreendido que as condições eficazes para se obter tal associação ou inserção são determinadas com base em várias variáveis, incluindo a taxa desejada de inserção, onde uma temperatura de incubação maior pode obter uma taxa mais rápida de inserção, a temperatura para a qual o ligante pode ser seguramente aquecido sem afetar sua atividade, e a um ponto menor a temperatura de transição de fase dos lipídeos e da composição de lipídeo. Será também compreendido que a inserção pode ser variada pela presença de solventes, tal como solventes anfifáticos, incluindo polietilenoglicol e etanol, ou detergentes.

O conjugado de direcionamento, na forma de um conjugado de lipídeo-polímero-ligante, vai tipicamente formar uma solução de micelas quando o conjugado é misturado com um solvente aquoso. A solução micelar dos conjugados é misturada com uma suspensão de lipossomas pré-formados para incubação e associação do conjugado com os lipossomas ou inserção do conjugado nas bicamadas de lipídeo lipossomal. A incubação é eficaz para se obter associação ou inserção do conjugado de lipídeo-polímero-anticorpo com um folheto da bicamada externa dos lipossomas, para formar um imunolipossoma.

Após preparação, os imunolipossomas têm de preferência um tamanho de menos do que cerca de 150 nm, de preferência entre cerca de 85-120 nm, e com mais preferência entre 90-110 nm, conforme medido, por exemplo, através de difração de luz dinâmica a 30° ou 90°

E. Imunolipossomas Exemplares

Em estudos realizados em apoio à invenção, imunolipossomas tendo um anticorpo scFv antiHER2 foram preparados conforme descrito no Exemplo 1. Resumindo, os lipossomas foram preparados a partir de lipídeos HSPC, colesterol e mPEG-DSPE. O agente terapêutico, doxorrubicina, foi

carregado nos lipossomas através de carregamento remoto contra um gradiente de íon de amônio (Doxil®). Um conjugado de direcionamento de lipídeo-polímero-anticorpo, preparado conforme descrito no Exemplo 1 com um anticorpo anti-HER2 tendo a sequência identificada aqui como SEQ ID NO: 2, foi inserido nos lipossomas pré-formados através de incubação de uma solução micelar contendo uma pluralidade dos conjugados com os lipossomas pré-formados. Imunolipossomas tendo uma média de 2, 5, 7,5, 15, 30, 45, 75, 100, 150 e 300 anticorpos por lipossomas, também referidos aqui como formulações 2:1, 5:1, 7,5:1, 15:1, 30:1, 45:1, 75:1, 100:1, 150:1 e 300:1, foram preparados através de ajuste das concentrações do reagente, conforme detalhado no Exemplo 1.

A absorção *in vitro* em células expressando HER2 (SK-BR03) e em células expressando não-HER2 (MCF-7) dos imunolipossomas carregando 7,5, 15, 30 e 45 anticorpos foi determinada, conforme descrito no Exemplo 2. Os resultados são sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1: Sumário de Ligação/Absorção Celular de Imunolipossomas Anti-HER2 em Células SK-BR-3 e MCF-7

Células	Tratamento	Doxorrubicina (pg/célula) ± SE (n=3)
SK-BR-3 (IHC 3+)	Lipossomas de controle (nenhum anticorpo anti-HER2)	NS*
	Imunolipossomas anti-HER2 (7,5:1)	6,02 ± 0,19
	Imunolipossomas anti-HER2 (15:1)	8,35 ± 0,27
	Imunolipossomas anti-HER2 (30:1)	6,66 ± 0,22
	Imunolipossomas anti-HER2 (45:1)	4,39 ± 0,16
MCF-7	Lipossomas de controle (nenhum anticorpo anti-HER2)	NS
	Imunolipossomas anti-HER2 (15:1)	NS
	Imunolipossomas anti-HER2 (30:1)	NS

*NS = não-significante; abaixo do limite de detecção

Os dados na Tabela 1 mostram ligação/absorção de célula posi-

tiva dos imunolipossomas anti-HER2 nas células SK-BR3 positivas para HER-2, com níveis de doxorrubicina de 2,58 pg por célula e 1,75 pg por célula para as formulações 15:1 e 30:1, respectivamente. A ligação/absorção de imunolipossomas anti-HER2 nas células MCF-7, que têm níveis de expressão de HER2 baixos, não foi significativa. A ligação/absorção dos lipossomas não carregando anticorpos anti-HER2 em ambas linhagens celulares também não foi significativa.

Em um outro estudo, descrito no Exemplo 3, a citotoxicidade de imunolipossomas anti-HER2 carregando 2, 5, 7,5 e 15 anticorpos por lipossoma em células de carcinoma de mama humano SK-BR-3 foi avaliada. Lipossomas carregados com doxorrubicina livre e PEGuilada, doxorrubicina serviram com controles positivo e negativo, respectivamente. As células SK-BR-3 foram expostas a imunolipossomas anti-HER2 por 10 minutos e então a viabilidade celular foi avaliada. Os resultados são mostrados na figura 2A.

A figura 2A mostra a viabilidade celular, expressa como uma porcentagem de células de controle não-tratado, como uma função de concentração de doxorrubicina, em $\mu\text{g/mL}$, quando administrada como fármaco livre (triângulos), aprisionado em lipossomas (círculos) ou aprisionado em imunolipossomas contendo 2 (círculos), 5 (quadrados), 7,5 (diamantes) ou 15 (triângulos) anticorpos por lipossoma. Diferenças na citotoxicidade das composições de lipossoma se tornam aparentes em concentrações de doxorrubicina de cerca de $0,5 \mu\text{g/mL}$, onde imunolipossomas decorados com 5 (quadrados) ou 7,5 (diamantes) anticorpos por lipossoma proveram citotoxicidade *in vitro* mais ou menos a mesma que o fármaco livre (triângulos). No entanto, imunolipossomas com 15 anticorpos por lipossoma (triângulos) eram mais citotóxicos do que a mesma concentração do fármaco livre, com uma viabilidade celular de 50% em cerca de $4 \mu\text{g/mL}$ de doxorrubicina. Imunolipossomas com 2 anticorpos por lipossoma eram menos citotóxicos do que a doxorrubicina lipossomal PEGuilada não-direcionada.

O efeito de morte celular de imunolipossomas direcionados a Her2 está relacionado com a densidade de anticorpos por lipossoma. Valores IC_{50} para formulações de imunolipossoma anti-Her2 com razões de

scFv/lipossoma de 5, 7,5 e 15 após uma exposição de 10 minutos eram aproximadamente 30, 16 e 3,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Citotoxicidade para formulações de imunolipossoma anti-Her2 tendo a razão de scFv/lipossoma de 2 tinha pouca ou nenhuma citotoxicidade após uma exposição ao fármaco de 10 minutos. O IC_{50} para doxorubicina livre era aproximadamente 9,5 $\mu\text{g/mL}$. Pouca ou nenhuma toxicidade foi notada para doxorubicina aprisionada em lipossomas revestidos com PEG. Imunolipossomas anti-Her2 com uma razão de scFv/lipossoma de 15 tinham maior citotoxicidade do que doxorubicina livre, indicando a vantagem de uma formulação direcionada com
5 ligação rápida seguido por internalização.
10

Deste modo, em uma modalidade, uma formulação de imunolipossoma que inclui uma quantidade de conjugado de lipídeo-polímero-anticorpo que provê mais do que 2 anticorpos por lipossoma e, em particular, que provê em média mais do que 2 anticorpos por lipossoma após circulação dos imunolipossomas no sangue *in vivo* por mais do que 24, 48 ou 96 horas é compreendida, como será discutido mais abaixo.
15

Um método alternativo de medição de citotoxicidade *in vitro* foi realizado, onde as formulações de lipossoma e imunolipossoma foram incubadas com as células por quatro horas. As células foram então lavadas e incubadas a 37° C por três dias. O número de célula no final dos três dias foi estimado através de tingimento com violeta cristal. Os resultados são mostrados na figura 2B. A figura 2B mostra a viabilidade celular, expressa como uma porcentagem de células de controle não-tratado, como uma função de concentração de doxorubicina, em $\mu\text{g/mL}$. Quatro horas de exposição a várias concentrações de doxorubicina a partir dos vários imunolipossomas ilustra a citotoxicidade *in vitro* diferente das formulações. Imunolipossomas carregando 7,5 e 45 anticorpos por lipossoma eram ligeiramente menos citotóxicos ou tão citotóxicos quanto a doxorubicina livre (diamantes). Imunolipossomas com 15 e 30 anticorpos eram mais citotóxicos do que doxorubicina livre. A figura 2B também mostra que os imunolipossomas com 15 e 30 anticorpos eram mais potentes em citotoxicidade celular do que doxorubicina livre.
20
25
30

Em um outro estudo, descrito no Exemplo 4, a estabilidade dos lipossomas direcionados a Her2 no sangue foi avaliada. Imunolipossomas carregando um anticorpo scFv marcado com ^{125}I foram preparados em razões de anticorpo scFv/imunolipossoma de 7,5, 15, 30, 45 e 90. Os imunolipossomas foram incubados em plasma humano, e alíquotas removidas em tempos selecionados para análise. Alíquotas em duplicata de material lipossomal em plasma humano foram removidas da incubação e aplicadas em colunas Sepharose CL-4B para cada ponto de tempo.

As figuras 3A-3H mostram os perfis de eluição de conjugados de lipídeo-PEG-scFv marcados com ^{125}I de imunolipossomas tendo 15 anticorpos scFv por lipossoma de alíquotas removidas durante incubação dos imunolipossomas em plasma humano, as alíquotas removidas em tempos de 0 hora (figura 3A), 1 hora (figura 3B), 4 horas (figura 3C), 8 horas (figura 3D), 24 horas (figura 3E), 48 horas (figura 3F), 72 horas (figura 3G) e 96 horas (figura 3H). A radioatividade na fração lipossomal foi recuperada dentro de uma faixa muito estreita de frações dentro de 2-3 frações e tipicamente dentro de 6-9 mL de eluente total coletado. Frações de plasma, devido à faixa de tamanho ampla de proteínas de plasma, eluíram da coluna de Sepharose CL-4B em pelo menos 12 frações. Em todos os pontos de tempo, as frações lipossomal e de plasma eram distinguíveis uma da outra. A fim de calcular a porcentagem de conjugado de lipídeo-PEG-scFv marcado com ^{125}I dissociado (e associado correspondente), as radioatividades das frações lipossomal e de plasma foram combinadas para prover uma quantidade total de marcador ^{125}I . Esse total foi avaliado como uma razão de radioatividade total na amostra aplicada à coluna Sepharose CL-4B.

A figura 4A mostra a dissociação de anticorpos scFv marcados com ^{125}I de formulações de imunolipossoma tendo razões de anticorpo scFv/lipossoma de 7,5:1 (diamantes), 15:1 (quadrados), 30:1 (círculos), 45:1 (triângulos) e 90:1 (*) como uma função de tempo de incubação, em horas, em plasma humano. A figura 4B mostra em gráfico os dados como porcentagem de marcador ^{125}I restante nos imunolipossomas para as mesmas formulações. A taxa e grau de dissociação do anticorpo (com relação à quanti-

dade de doxorrubicina) a partir das formulações são essencialmente iguais sem importar a densidade inicial de anticorpos por lipossoma.

Em um outro estudo, uma formulação de imunolipossoma tendo 15 anticorpos por lipossoma foi preparada e a dissociação de radiomarcador a partir da formulação durante incubação *in vitro* em plasma humano foi medida. Os resultados são mostrados nas figuras 5A-5B.

A figura 5A mostra a porcentagem de anticorpo radiomarcado dissociado da formulação de imunolipossoma para os dois estudos (diamantes, quadrados) como uma função de tempo de incubação, em horas. Os resultados entre os dois estudos estão consistentes e indicam que 24 horas de incubação resultam em cerca de 30% de dissociação do anticorpo a partir do imunolipossoma. Após 96 horas de incubação em plasma humano, 50% dos anticorpos não estão mais associados com os imunolipossomas.

A figura 5B mostra em gráfico os dados de um dos estudos usando a formulação de imunolipossoma 15:1 como a porcentagem de anticorpo radiomarcado restante nos imunolipossomas (diamantes) e como a porcentagem de anticorpo radiomarcado dissociado dos imunolipossomas (quadrados), como uma função de tempo de incubação em plasma humano, onde dissociação induzida por plasma é descrita como radioatividade recuperada na fração de plasma. A figura 5B mostra a diminuição de scFv radiomarcado na fração lipossomal com o aumento correspondente na fração de plasma expresso como a porcentagem de material de scFv total. Uma diminuição inicial na quantidade de anticorpo scFv liberado foi observada atingindo um estado estacionário em aproximadamente 48 horas. No ponto de tempo zero, 85% da radioatividade foram recuperados na fração lipossomal com o restante na fração de plasma. A diminuição na radioatividade associada lipossomal foi mais pronunciada dentro de 24 horas com >30% do anticorpo scFv dissociados e recuperados da fração de plasma. Como o anticorpo scFv inicial diminui na fração lipossomal, a quantidade de radioatividade na fração de plasma mostra um aumento correspondente (com diminuição correspondente na fração lipossoma) durante o tempo de incubação de 96 horas para aproximadamente 50% de dissociação.

Deste modo, em uma modalidade, uma composição de imunolipossoma é provida, a qual tem 24 horas após administração *in vivo*, com mais preferência 48 horas após administração e com mais preferência ainda 96 horas após administração, mais do que dois anticorpos por lipossoma, em média, e menos do que 150 anticorpos por lipossoma, em média. Em uma outra modalidade, a composição de imunolipossoma tem uma quantidade inicial de anticorpos por lipossoma em média, e entre 30-60% dos anticorpos dissociam da dose de imunolipossoma administrada *in vivo*, para prover uma composição, 48 ou 96 horas após administração *in vivo* que tem menos do que cerca de 50 anticorpos por imunolipossoma em média, com mais preferência menos do que cerca de 30 anticorpos por imunolipossoma em média e com mais preferência ainda menos do que cerca de 15 anticorpos por imunolipossoma em média. Em uma modalidade preferida, os imunolipossomas em média incluem entre 2 e 15, inclusive, anticorpos por imunolipossoma. Será compreendido que o número de anticorpos por lipossoma *in vivo* pode ser aproximado usando um ensaio *in vitro* onde o imunolipossoma é incubado em plasma humano a 37° C por um tempo selecionado, tal como 24, 48 ou 96 horas e análise usando uma técnica analítica adequada quanto à dissociação do anticorpo (ou do construto de lipídeo-polímero-anticorpo) a partir do lipossoma.

Um estudo *in vivo* foi realizado para avaliar a estabilidade do anticorpo nos imunolipossomas seguindo uma administração intravenosa única a ratos. Conforme descrito no Exemplo 5, os ratos foram tratados intravenosamente ou com imunolipossomas marcados com ¹²⁵I (formulação 15:1) ou com conjugado de anticorpo scFv-PEG-DSPE marcado com ¹²⁵I. Amostras de sangue foram coletadas em 5 minutos e em 1, 3, 8, 24 e 48 horas pós-dosagem. Amostras de sangue integral e plasma foram contadas quanto a ¹²⁵I e expressas em porcentagem (%) de dose injetada. As amostras de plasma do grupo tratado com os imunolipossomas foram também ensaiadas quanto à concentração de doxorubicina. Em adição, uma porção da amostra de plasma em cada ponto de tempo foi passada por uma coluna de exclusão de tamanho para separar conjugado livre de conjugado ligado a

lipossoma para determinar se radioatividade estava associada com fração de lipossoma.

5 A figura 6A mostra a porcentagem de conjugado de anticorpo scFv radiomarcado -PEG-DSPE recuperado na fração lipossomal das amostras de plasma. Em todos os pontos de tempo, >85% da radioatividade foram encontrados apenas na fração lipossomal. Isto indica que qualquer anticorpo livre ou conjugado livre (isto é, não-associado a lipossoma) é rapidamente removido da circulação.

10 A figura 6B mostra a concentração de anticorpo scFv radiomarcado livre na fração lipossomal do plasma após separação na coluna Sepharose CL-4B. A quantidade de anticorpo scFv livre nesta fração é desprezível uma vez que apenas quantidades pequenas (100 ng/mL) foram recuperadas. Em toda a duração do estudo, a recuperação de anticorpo scFv livre foi menos do que 15% do total recuperado.

15 A concentração de anticorpo scFv radiomarcado não-associado com a fração lipossomal, isto é, "anticorpo livre" ou "conjugado livre" após administração da formulação de imunolipossoma 15:1 a ratos é mostrada na figura 6C. No primeiro ponto de tempo (5 min), a concentração de anticorpo scFv radiomarcado inicial tinha diminuído em 20% da dose injetada esperada. A taxa inicial de eliminação de anticorpo scFv radiomarcado foi rápida
20 durante as primeiras 10 horas ou então após dosagem. Durante as primeiras 48 horas pós-dosagem, a concentração de anticorpo scFv radiomarcado diminuiu em 90% da concentração de anticorpo scFv radiomarcado no primeiro ponto de tempo. Em comparação 40% da doxorrubicina permanecem em
25 circulação (figura 7A).

Também conforme descrito no Exemplo 5, os parâmetros farmacocinéticos dos imunolipossomas e da doxorrubicina foram determinados. A Tabela 2 sumariza os parâmetros farmacocinéticos e as figuras 7A-7B mostram as concentrações como uma função de tempo.

Tabela 2: Parâmetros Farmacocinéticos de Formulação de Imunolipossoma 15:1 e de Conjugado de Anticorpo scFv-PEG-DSPE

	AUC ^a ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)	Vss ^b (mL)	CLt ^c (mL/h)	Meia-vida (h)
Imunolipossoma (DOX em plasma)	2224	13,4	0,31	31,6
Imunolipossoma (% de ^{125}I no sangue)	NA	NA	NA	25,6
Imunolipossoma (% de ^{125}I no sangue)	NA	NA	NA	25,0
Conjugado (% de ^{125}I no plasma)	NA	NA	NA	2,1
Conjugado (% de ^{125}I no plasma)	NA	NA	NA	2,0

^aCalculado usando o método trapezoidal para o último ponto de tempo (96 horas pós-dose)

5 ^bVolume de distribuição em estado estacionário.

^cLiberação de doxorubicina do plasma.

A figura 7A mostra a porcentagem de anticorpo scFv marcado com ^{125}I restante no plasma (diamantes) e no sangue (quadrados fechados); a porcentagem de doxorubicina no plasma (triângulos), como uma função de tempo, em horas, após administração de uma formulação de imunolipossoma 15:1 a ratos. Também mostrada é a porcentagem de um anticorpo scFv marcado com ^{125}I no plasma (círculos abertos) e no sangue (quadrados abertos) como uma função de tempo, em horas, após administração como um conjugado livre. A radioatividade no sangue e plasma atingiu o pico 5 minutos pós-dosagem ambos em animais dosados com imunolipossomas e em animais dosados com conjugado de anticorpo scFv-PEG-DSPE marcado com ^{125}I . Em animais tratados com imunolipossomas, o nível de ^{125}I no sangue e plasma era $78,4 \pm 4,1$ e $77,2 \pm 3,7\%$ em 5 minutos e $4,4 \pm 0,9$ e $4,1 \pm 0,8\%$ em 96 horas, respectivamente. O teor de doxorubicina em plasma era $127 \pm 19,7\%$ ou $69,4 \pm 10,8 \mu\text{g/mL}$ em 5 minutos e $11,8 \pm 3,9\%$ ou $6,4 \pm 2,2$

µg/mL em 96 horas. O perfil de ^{125}I eluído a partir da coluna de exclusão de tamanho mostrou um pico único, que correspondia à fração de lipossoma do efluente da coluna. Com base na porcentagem de dose injetada de ^{125}I no sangue e plasma, a meia-vida de eliminação dos imunolipossomas era 25,6 h e 25,0 h, respectivamente. Com base na concentração de doxorrubicina no plasma, a meia-vida de eliminação dos imunolipossomas era 31,6 h.

Em animais tratados com conjugado de anticorpo scFv- ^{125}I -PEG-DSPE, o nível de ^{125}I no sangue e plasma era $41,8 \pm 6,0$ e $40,8 \pm 3,1\%$ em 5 minutos e $2,9 \pm 0,6$ e $2,7 \pm 1,1\%$ em 8h, respectivamente. Nenhuma radioatividade foi detectada nos pontos de tempo de 24 ou 48 horas. A meia-vida de eliminação de conjugado no sangue e plasma era 2,1 e 2,0 h, respectivamente.

A figura 7B mostra a concentração de doxorrubicina no plasma, em µg/mL, como uma função de tempo, em horas, após administração de uma formulação de imunolipossoma 15:1 a ratos. Conforme visto, a doxorrubicina permanece no sangue 96 horas após dosagem.

A figura 8 é um gráfico da razão de anticorpo scFv marcado com ^{125}I para doxorrubicina no sangue, em ng/µg, como uma função de tempo, em horas, após administração de uma formulação de imunolipossoma 15:1 a ratos. A razão de componentes diminuiu durante as primeiras 24 horas pós-dosagem, e então atingiu um platô em cerca de 50 horas pós-dosagem. A razão de diminuição mostra que o anticorpo scFv é perdido do lipossoma em uma taxa mais rápida do que ou liberação do lipossoma a partir da circulação ou perda de doxorrubicina a partir do lipossoma.

Sumarizando, os estudos *in vivo* mostraram que os imunolipossomas permaneciam na circulação por mais de 96 horas seguindo a administração intravenosa única em ratos. O conjugado de anticorpo-PEG-DSPE estava intimamente associado com os lipossomas conforme demonstrado através de cromatografia de exclusão de tamanho. A meia-vida de ^{125}I em sangue/plasma seguindo administração de imunolipossomas marcados com ^{125}I era aproximadamente 25 horas, e a meia-vida da doxorrubicina no plasma era 31,6 horas. Quando administrado em forma livre, o conjugado de

anticorpo-PEG-DSPE permaneceu na circulação por aproximadamente 8 horas seguindo uma administração intravenosa única. A meia-vida de circulação de conjugado livre era aproximadamente 2 horas. Os dados *in vivo* examinando a estabilidade dos imunolipossomas no soro mostraram que em
5 todos os pontos de tempo >85% da radioatividade permaneciam na fração lipossomal indicando que anticorpo dissociado ou anticorpo livre-conjugado é rapidamente removido da fração de soro. O imunolipossoma tinha uma meia-vida medida em ambos soro e sangue de aproximadamente 25 horas enquanto a meia-vida do anticorpo livre ou anticorpo-conjugado era aproxima-
10 madamente 2 horas em ambos sangue e plasma (Tabela 2).

O Exemplo 6 descreve um outro estudo *in vivo* conduzido para avaliar a farmacocinética de formulações de imunolipossoma tendo 15, 75, 150 e 300 anticorpos scFv por lipossoma. Resumindo, foram tratados com um bolo intravenoso único de uma das formulações de imunolipossoma.
15 Camundongos de controle foram administrados com doxorubicina lipossomal PEGuilada. Plasma foi coletado em aproximadamente 5 minutos e 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas pós-dosagem e foi ensaiado quanto à doxorubicina total. Os resultados são mostrados na figura 9.

Perfis de concentração versus tempo de doxorubicina similares
20 foram observados nos animais tratados com a formulação de controle (diamantes) e com as formulações de imunolipossoma 15:1 (quadrados fechados) e 75:1 (triângulos). Valores consideravelmente menores para C_{max} , AUC e meia-vida foram observados, acompanhados por uma liberação mais rápida e um volume de distribuição maior, para animais tratados com os i-
25 munolipossomas tendo 150 (símbolos X) e 300 (símbolos *) anticorpos por lipossoma.

Os parâmetros farmacocinéticos determinados a partir dos dados na figura 9 são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3

Grupo de Formulação	$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$\text{AUC}_{\text{último}}^a$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	Meia- vida (h)	Cl (mL/h)	Vss (mL)
1 Lipossoma PEGuilado (nenhum anticorpo), controle	$39,0 \pm 0,27$	751,5	14,8	0,070	1,49
2 Imunolipossoma 15:1	$39,9 \pm 5,49$	763,1	17,0	0,068	1,50
3 Imunolipossoma 75:1	$43,3 \pm 1,30$	898,3	12,8	0,059	1,23
4 Imunolipossoma 150:1	$20,6 \pm 3,88$	287,7	3,30	0,183	3,57
5 Imunolipossoma 300:1	$10,5 \pm 6,13$	81,5	3,91	0,645	12,0

$\text{AUC}_{\text{último}}$ = a área sob a curva calculada para o último ponto de tempo medido

- As concentrações de doxorubicina no plasma atingiram o pico no primeiro ponto de tempo de amostragem, isto é, aproximadamente 5 minutos após injeção. Os valores $C_{\max}$ em camundongos administrados com a formulação de controle lipossomal PEGuilada, formulação de imunolipossoma 15:1 e a formulação de imunolipossoma de 75:1 eram $39,0 \pm 0,27$, $39,9 \pm 5,49$ e $43,3 \pm 1,30$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os níveis de fármaco correspondentes diminuíram para $10,1 \pm 1,82$, $9,05 \pm 0,69$ e $13,6 \pm 5,0$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, em 24 h, e $0,32 \pm 0,19$, $0,56 \pm 0,41$ e $0,28 \pm 0,12$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, em 96 horas pós-administração. Perfis farmacocinéticos muito similares foram observados nesses três grupos de tratamento. Os valores de $C_{\max}$ em camundongos administrados com formulação de lipossoma 150:1 e a formulação de lipossoma 300:1 eram notavelmente menores do que aqueles tratados com as formulações de imunolipossoma 75:1 ou menores, isto é, $20,6 \pm 3,88$ e $10,5 \pm 6,13$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os níveis de fármaco correspondentes diminuíram para $4,56 \pm 0,52$ e $0,58 \pm 0,19$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente em 24 horas. No final de 96 horas, metade dos animais nos grupos de tratamento de formulação de imunolipossoma de 150:1 e 300:1 não tinham nenhum nível de fármaco detectável em plasma.

Os valores de $\text{AUC}_{\text{última}}$ em camundongos administrados com formulação de controle lipossomal PEGuilada, formulação de imunoliposso-

ma 15:1 e a formulação de imunolipossoma 75:1 eram 751,5, 763,1 e 898,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os valores de $\text{AUC}_{\text{última}}$ em camundongos administrados com formulações de imunolipossoma de 150:1 e 300:1 eram 287,7 e 81,5 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, respectivamente.

5 A meia-vida do plasma em camundongos administrados com formulação de controle lipossoma PEGuilada, formulação de imunolipossoma de 15:1 e a formulação de imunolipossoma de 75:1 foi 14,8, 17,0 e 12,8 horas, respectivamente. A meia-vida em camundongos administrados com a formulação de imunolipossoma de 150:1 e 300:1 foi 3,30 e 3,91 horas, respectivamente.

10 A liberação de doxorrubicina do plasma em camundongos administrados com formulação de controle lipossomal PEGuilada, formulação de imunolipossoma de 15:1 e a formulação de imunolipossoma de 75:1 era 0,070, 0,068 e 0,059 mL/h , respectivamente. A liberação de doxorrubicina do plasma em camundongos administrados com formulações de imunolipossoma de 150:1 e 300:1 foi 0,183 e 0,645 mL/h , respectivamente.

15 O volume de distribuição em camundongos administrados com formulação de controle lipossomal, formulação lipossomal de 15:1 e a formulação lipossoma de 75:1 foi 1,49, 1,50 e 12,3 mL , respectivamente. O volume de distribuição em camundongos administrados com formulação imunolipossoma de 150:1 e 300:1 foi 3,57 e 12,0 mL , respectivamente.

20 As constatações do Exemplo 6 mostram que perfis farmacocinéticos similares foram observados em camundongos após uma administração de bolo única de imunolipossomas contendo uma razão de scFv/lipossoma de 0, 15 ou 75. Valores menores para C_{max} , AUC e meia-vida foram observados, acompanhado por uma liberação mais rápida e um volume maior de distribuição, para animais tratados com imunolipossomas contendo uma razão de scFv/lipossoma de 150 ou 300, onde os parâmetros eram inversamente proporcionais à densidade do ligante. Deste modo, em uma modalidade, uma formulação de imunolipossoma é provida a qual tem uma AUC, C_{max} e/ou meia-vida que é (i) maior do que ou (ii) não maior do que 30%, de preferência não mais do que 25%, com mais preferência ainda não mais do

que 20%, menor do que a AUC, C_{max} e/ou meia-vida para uma formulação lipossomal similar sem o anticorpo de direcionamento. Por exemplo, a AUC da formulação de lipossoma PEGuilada de controle sem o anticorpo era 751 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. As AUCs das formulações de imunolipossoma de 15:1 e 75:1 foram 763 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ e 898 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, respectivamente. A formulação de imunolipossoma de 15:1 tinha um valor de AUC que era 1,6% menor (isto é, não mais do que 25% menor) do que a AUC da formulação lipossomal correspondente, idêntica em composição exceto pela ausência dos anticorpos. A formulação de imunolipossoma de 75:1 tinha um valor de AUC que era maior do que a AUC da formulação lipossomal correspondente. Em contraste, os valores de AUC para as formulações de imunolipossoma de 150:1 e 300:1 eram consideravelmente mais do que 30% menores do que a AUC da formulação lipossomal. Similarmente, os parâmetros farmacocinéticos de C_{max} e meia-vida para as formulações de imunolipossoma de 75:1 e 15:1 eram mais do que 25% menores do que o parâmetro correspondente da formulação lipossomal direcionada de não-anticorpo, lipossomal.

Deste modo, os dados na figura 9 quando considerados com os dados na figura 2A e na figura 5B indicam que uma formulação de imunolipossoma, e em uma modalidade um lipossoma carregando um anticorpo tendo um peso molecular entre cerca de 20.000-50.000 Dáltons, com mais preferência 25.000-35.000 Dáltons, de preferência tem antes da administração *in vivo* entre cerca de 4-30 (inclusive dos pontos finais) anticorpos, em média, por lipossoma, e com mais preferência entre cerca de 5-25 (inclusive dos pontos finais) anticorpos por lipossoma, e com mais preferência ainda entre cerca de 6-20 (inclusive dos pontos finais) anticorpos por lipossoma. Outras faixas preferidas para o número de anticorpos por lipossoma antes da administração *in vivo* estão entre cerca de 5-30, entre cerca de 6-25 e entre cerca de 4-15 e entre cerca de 7-15.

Em uma outra modalidade, a formulação de imunolipossoma tem, em média, mais do que cerca de 2 anticorpos por lipossoma e menos do que cerca de 16 anticorpos cerca de 96 horas após administração *in vivo*, com mais preferência tendo mais do que cerca de 2 anticorpos por liposso-

ma e menos do que cerca de 12 anticorpos cerca de 96 horas após administração *in vivo*, e com mais preferência ainda tendo mais do que cerca de 2 anticorpos por lipossoma e menos do que cerca de 10 anticorpos cerca de 96 horas após administração *in vivo*, e com mais preferência ainda tendo mais do que cerca de 2 anticorpos por lipossoma e menos do que cerca de 8 anticorpos cerca de 96 horas após administração *in vivo*. Alternativamente, a composição de imunolipossoma tem mais do que dois anticorpos por lipossoma, em média, após cerca de 48 horas após circulação *in vivo* no sangue e menos do que cerca de 20 anticorpos por lipossoma, em média, cerca de 48 horas após administração intravenosa *in vivo*.

Em uma outra modalidade, a invenção provê uma formulação de imunolipossoma tendo uma AUC que está dentro de 30%, de preferência 25%, com mais preferência dentro de 20%, da AUC de formulação de lipossoma similar sem os anticorpos de direcionamento. Em uma outra modalidade, a invenção provê uma formulação de imunolipossoma tendo uma AUC normalizada pela dose que está dentro de 30%, de preferência 25%, com mais preferência dentro de 20%, da AUC normalizada pela dose de uma formulação lipossoma similar sem os anticorpos de direcionamento.

Um outro estudo foi conduzido para avaliar a eficácia antitumor da composição de imunolipossoma. Conforme descrito no Exemplo 7, camundongos carregando xenoenxertos de carcinoma de mama humano BT-474, que é conhecido mostrar receptor HER2 sobre a superfície das células, foram tratados com formulações de imunolipossoma não tendo quaisquer anticorpos de direcionamento (controle) ou tendo 7,5, 15, 30 ou 45 anticorpos por lipossoma. Os resultados são mostrados nas figuras 10A-10B.

A figura 10A mostra o volume de tumor relativo, em porcentagem, nos camundongos após dosagem com solução salina (círculos abertos), doxorrubicina contendo lipossomas PEGuilados (quadrados abertos) ou imunolipossomas contendo 7,5 (diamantes), 15 (triângulos), 30 (quadrados fechados) ou 45 (círculos fechados) anticorpos scFv por lipossoma. Tumores no grupo de controle de solução salina (círculos abertos) quadruplicaram de tamanho em uma média de $23,9 \pm 7,5$ dias. Os animais tratados com as for-

mulações de imunolipossoma tendo razões de anticorpo:lipossoma de 45:1, 30:1, 15:1 e 7,5:1 tinham tempos de quadruplicação de volume de tumor de mais do que $35,1 \pm 2,9$, $32,9 \pm 4,4$, $36,1 \pm 1,9$ e $38,0 \pm 0$ dia, respectivamente. Os tumores nos animais tratados com formulação lipossomal de controle (Doxil[®], quadrados abertos) tinham tumores que quadruplicaram de tamanho em mais de $29,2 \pm 6,0$ dias. No final do estudo no dia 38, um animal em cada um dos grupos de tratamento dosado com imunolipossomas tendo razões de anticorpo:lipossoma de 45:1, 15:1 e 7,5:1 ou não tinham nenhum tumor presente ou tamanho de nódulo $< 10 \text{ mm}^3$.

10 Houve um retardo de crescimento de tumor aparente em todos os animais tratados com doxorubicina lipossomal ou imunolipossomal quando comparado com controles de solução salina. Os animais tratados com formulações de imunolipossoma direcionando a HER2 tinham retardos ligeiramente maiores em crescimento de tumor do que os animais tratados com doxorubicina lipossomal não-direcionada (Doxil[®]).

15 A figura 10B mostra a mudança percentual no peso do corpo dos animais de teste durante o período de tratamento.

Resumindo, o estudo mostra que neste modelo de xenoenxerto de câncer de mama humano BT-474, tratamento com doxorubicina aprisionada em lipossoma ou com doxorubicina aprisionada em imunolipossoma resultou em um aumento em atividade antitumor quando comparado com aquela de animais de controle. Não havia nenhuma diferença em eficácia antitumor através da variação das razões de anticorpo:lipossoma na formulação de imunolipossoma de 7,5-45.

25 A formulação de imunolipossoma de 15:1 foi selecionada para avaliação em um estudo de faixa de dose *in vivo* em camundongos carregando tumor. Conforme descrito no Exemplo 8, os camundongos foram tratados com várias dosagens (2, 3, 4 mg/kg) de doxorubicina aprisionada em lipossomas PEGuilados ou aprisionada em imunolipossomas. Todos os camundongos receberam uma dose intravenosa semanal da formulação apropriada por três semanas. O tamanho do tumor foi medido duas vezes por semana para calcular o volume do tumor, e os resultados são mostrados na

figura 11.

A figura 11 é um gráfico de volume de tumor relativo, tomado como uma porcentagem de volume de tumor inicial, como uma função de tempo, em dias, em camundongos carregando um xenoenxerto de tumor de mama e tratados com solução salina (círculos abertos), lipossomas PEGuilados contendo doxorrubicina em dosagens de 2 mg/kg (quadrados abertos) e 3 mg/kg (diamantes abertos) ou com uma formulação de imunolipossoma de 15:1 em dosagens de 2 mg/kg (quadrados fechados), 3 mg/kg (diamantes fechados) ou 4 mg/kg (triângulos fechados). Tumores em animais de controle não-tratados (círculos abertos) tinham um tempo de triplicação de volume de tumor (TVTT) em média de $11,1 \pm 1,9$ dias. Os animais tratados com doxorrubicina lipossomal em 2, 3 e 4mg/kg (quadrados abertos, diamantes, triângulos, respectivamente) tinham um tempo de triplicação de volume de tumor (TVTT) de $16,7 \pm 4,8$ dias, $26,0 \pm 3,9$ e $\geq 34,2 \pm 9,0$ dias, respectivamente. Os animais tratados com a formulação de imunolipossoma de 15:1 com TVTTs de mais do que $34,2 \pm 6,6$, $29,5 \pm 8,6$ e 49,0 para níveis de dose de 2, 3 e 4 mg/kg, respectivamente.

O retardo de crescimento de tumor foi observado para todos os grupos de tratamento de fármaco quando comparado com grupo de controle não-tratado. Havia uma relação de dose resposta aparente para grupos de tratamento lipossomal PEGuilado mas não para os grupos de tratamento de imunolipossoma. No entanto, tratamento com imunolipossoma a 15:1 em 4 mg/kg resultou em retardo maior em crescimento de tumor do que todos os outros grupos de tratamento mas uma relação não era evidente para os grupos de tratamento de imunolipossoma. Tratamento com imunolipossomas de 15:1 a 2 e 4 mg/kg proveu TVTTs médios que eram maiores do que o TVTT médio para os grupos de camundongos tratados com lipossomal PEGuilado em 4 mg/kg. Ainda, em cada dose, o TVTT médio para imunolipossomas de 15:1 era maior do que para o grupo de camundongos tratado com lipossomal PEGuilado.

Em um outro estudo, descrito no Exemplo 9, uma formulação de imunolipossoma contendo doxorrubicina aprisionada e carregando 15 anti-

corpos scFv, em média, por imunolipossoma, foi administrada em três dosagens a animais através de uma injeção intravenosa única. A farmacocinética das imunolipossomas, da doxorrubicina e do anticorpo foi determinada e os resultados são mostrados nas figuras 12-14.

5 A figura 12 mostra a concentração de doxorrubicina no plasma, em ng/mL, como uma função de tempo, em horas, após administração intravenosa a macacos da formulação de imunolipossoma 15:1 (círculos) e lipossomas PEGuilados (quadrados) em uma dosagem de doxorrubicina de 10 mg/mL. O tempo de vida de circulação no sangue dos imunolipossomas era
10 essencialmente equivalente aos lipossomas PEGuilados sem o anticorpo scFv.

 As figuras 13A-13B mostram a concentração de doxorrubicina no plasma (figura 13A) e a concentração de anticorpo no plasma (figura 13B) como uma função do tempo após administração intravenosa dos imunolipossomas 15:1 nas dosagens de doxorrubicina de 1 mg/kg (círculos), 5 mg/kg
15 (quadrados) e 10 mg/kg (triângulos). A concentração de doxorrubicina total (livre e aprisionada) no plasma diminui como uma função de tempo pós-administração (figura 13A). A concentração de anticorpo total (livre e associado a imunolipossoma) exibe uma diminuição inicial maior nas quatro horas
20 após administração seguido por um declínio menor em seguida.

 A razão da concentração de anticorpo para doxorrubicina foi determinada a partir dos dados apresentados nas figuras 13A-13B e é mostrada nas figuras 14A-14B. Na figura 14A, a razão das concentrações de concentração de anticorpo scFv/doxorrubicina em plasma, em ng/ μ g, é mostrada. Na figura 14B, a razão é normalizada para a razão de anticorpo/doxorrubicina inicial e é expressa como uma porcentagem. Em ambas
25 figuras, os imunolipossomas administrados em dosagens de doxorrubicina de 1 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg são identificados por diamantes, quadrados e triângulos, respectivamente. Ambas representações dos dados ilustram a
30 perda de anticorpo nas primeiras quatro horas após administração, com aproximadamente 40% do anticorpo dissociados do lipossoma e liberados da corrente sanguínea dentro de 8 horas após dosagem. Será compreendido

que os dados ilustram perda de anticorpo, que pode ser uma perda do anticorpo do imunolipossoma ou perda do construto de lipídeo-polímero-anticorpo do imunolipossoma.

5 Deste modo, uma formulação de imunolipossoma é compreendida, onde os imunolipossomas perdem 20-50% dos anticorpos associados durante circulação *in vivo* por um tempo de cerca de 24 horas, ou 48 horas, ainda que os imunolipossomas retenham a ligação ao receptor HER2 suficiente para citotoxicidade. Conforme acima ilustrado, mais do que cerca de dois anticorpos são requeridos para citotoxicidade *in vitro* conforme comparado
10 com doxorubicina lipossomal não-direcionada.

Deste modo, um método de preparação de uma formulação de imunolipossoma para administração *in vitro* é provido, onde um construto de porção hidrofóbica-polímero hidrofílico-anticorpo é incluído na formulação em uma primeira quantidade suficiente para prover um primeiro número se-
15 lecionado de anticorpos por imunolipossoma. Os imunolipossomas são trazidos em contato com sangue, *in vitro* ou *in vivo*, e o número de anticorpos por imunolipossoma em um ou mais pontos de tempo quando do contato dos lipossomas com sangue é determinado. Por exemplo, uma alíquota de sangue do recipiente *in vitro* é tomada ou a amostra de sangue de um animal é
20 retirada. O sangue é analisado quanto à quantidade de anticorpo usando qualquer número de técnicas analíticas adequadas, tal como radioimunoensaio, cromatografia, eletroforese de gel, etc. Se o número de anticorpos em mais de um ponto de tempo for determinado, um gráfico pode ser construído, o qual mostra a perda de anticorpos como uma função de tempo em
25 sangue. Usando esta informação, o número de anticorpos em um ponto de tempo selecionado após contato com o sangue é determinado e uma segunda quantidade de construto de porção hidrofóbica-polímero hidrofílico-anticorpo suficiente para prover um segundo número, maior, de anticorpos por lipossoma a fim de prover pelo menos dois anticorpos por lipossoma a-
30 pós contato com sangue tem tal ponto de tempo é selecionado. Os imunolipossomas são então preparados usando a segunda quantidade de construto. Por exemplo, se for desejado ter 5 anticorpos por imunolipossoma 96 ho-

ras após administração, e os dados de incubação de sangue mostrarem que cerca de 50% dos anticorpos dissociam do imunolipossoma ou estão de outro modo indisponíveis para interação com o receptor alvo, então os imunolipossomas devem inicialmente, antes da dosagem *in vivo*, conter pelo menos 10 anticorpos. Em geral, a segunda quantidade de conjugado, isto é, a quantidade de conjugado selecionada para prover uma inicial, antes do número de dosagem de anticorpos, é selecionada para dar menos do que 50 anticorpos por lipossoma, com mais preferência 30 ou menos anticorpos por lipossoma.

Em uma outra modalidade, e com base em parte nos dados farmacocinéticos acima, o método inclui provisão de lipossomas tendo uma primeira quantidade de conjugado que provê menos do que 150 anticorpos por lipossoma, com mais preferência 100 ou menos anticorpos por lipossoma, e com mais preferência ainda 75 ou menos anticorpos por lipossoma.

III. Métodos de Uso

Os lipossomas incluem um agente terapêutico ou de diagnóstico em forma aprisionada. Aprisionada pretende incluir encapsulação de um agente no núcleo aquoso e espaços aquosos de lipossomas bem como aprisionamento de um agente na(s) bicamada(s) de lipídeo dos lipossomas. Agentes compreendidos para uso na composição da invenção são amplamente variados, e exemplos de agentes adequados para aplicações terapêutica e de diagnóstico são dados abaixo.

A dosagem administrada pode variar dependendo de fatores conhecidos, tal como as características farmacodinâmicas do agente particular e de seu modo e via de administração; idade, saúde e peso do recipiente; natureza e extensão de sintomas, tipo de tratamento concomitante, frequência de tratamento e o efeito desejado. A dosagem pode ser uma dosagem de uma vez ou periódica dada em um intervalo de horas, dias ou semanas selecionado.

Qualquer via de administração é adequada, com modos intravenosos e outros parenterais sendo preferidos.

Em um outro aspecto, um regime de tratamento combinado é

compreendido, onde a composição de imunolipossoma descrita acima é administrada em combinação com um segundo agente. O segundo agente pode ser qualquer agente terapêutico, incluindo outros compostos de fármaco bem como agentes biológicos, tal como peptídeos, anticorpos e similar. O

5 segundo agente pode ser administrado simultaneamente com ou seqüencialmente à administração dos imunolipossomas, através da mesma via de administração ou uma diferente. Combinações particularmente preferidas incluem, mas não estão limitadas a, ciclofosfamida, taxanos, vinorelbina, Herceptin® e Avastin®. Lipossomas direcionados a Her2 provêm uma regressão de tumor mais completa com relação a uma dose equivalente do

10 mesmo fármaco administrado em um lipossoma não-direcionado, tal como DOXIL®. Deste modo, um regime de tratamento é compreendido, o qual compreende uma dose de um primeiro agente citotóxico aprisionado em imunolipossomas direcionados a Her2 e um segundo agente terapêutico, onde um ou ambos agentes são administrados em uma dose menos do que a

15 dose requerida para o agente administrado sozinho, para obter um resultado clínico aperfeiçoado, tal como uma regressão de tumor maior do que esperado. Será também compreendido que os imunolipossomas direcionados a Her2 podem ser administrados em combinação com dois ou mais agentes.

20 Agentes adequados para um paciente particular podem ser identificados por um profissional médico versado. Um regime de tratamento compreendido de uma composição de imunolipossoma direcionada a Her2 contendo um agente quimioterapêutico aprisionado nos lipossomas, e dois ou mais agentes adicionais, é compreendido, onde pelo menos um, e de preferência mais de

25 um dos agentes, é administrado em dose menos do que a dose recomendada do agente quando dado sozinho, para se obter um resultado clínico aperfeiçoado.

Os métodos de tratamento descritos aqui são pretendidos, em uma modalidade, para administração a uma população de paciente expressando mais do que 10^5 receptores Her2 por célula, e de preferência mais do que 10^6 receptores Her2 por célula. A densidade de receptores celulares pode ser determinada usando imunoistoquímica e estojos podem ser com-

30

prados para tal determinação, tal como o HercepTest[®]. Indivíduos expressando mais do que 10^5 , de preferência mais do que 10^6 , receptores HER2 por célula, respondem particularmente bem à composição de imunolipossoma direcionada a Her2 descrita aqui, porque o anticorpo descrito aqui é internalizado pelas células, aumentando a aplicação de fármaco intracelularmente. Um método onde uma biópsia ou amostra biológica apropriada é obtida de um paciente, a amostra é ensaiada para determinar o número de receptores HER2 por célula de tumor, e se o número de receptores for maior do que 106 receptores Her2 por célula, o paciente é tratado com a composição de imunolipossoma descrita aqui. Em uma modalidade preferida, o paciente tem um *score* IHC de receptores 3+ (2.000.000) por célula.

IV. Exemplos

Os exemplos que seguem ilustram mais a invenção descrita aqui e não pretendem de modo algum limitar o escopo da invenção.

15 Materiais: Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) foi comprada da Lipoid K.G. (Ludwigshafen, Alemanha). Colesterol foi recebido da Croda, Inc. (Nova York, NY) e N-(carbonil-metoxipolietileno glicol 2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina, sal de sódio (mPEG-DSPE) foi recebido da Syngenta, Ltd. (Liestal, Suíça). Cloridrato de doxorubicina foi recebido da **20** Meiji Seika Kaisha Ltd. (Tóquio, Japão). Conjugado radiomarcado (scFv-PEG-DSPE) foi recebido da Hermes Bioscience (São Francisco, CA) em uma atividade específica de 0,0983 mCi/mL. Plasma humano foi recebido da Bio-reclamation (East Meadow, NY). Componente de coluna - Sepharose CL-4B foi recebido da Amersham Pharmacia, Uppsala, Suécia). Tampão de eluição **25** - solução de cloreto de sódio (NaCl a 0,9%) era da Baxter (Deerfield, IL) e continha azida de sódio a 0,4% (Sigma, St. Louis, Mo).

Exemplo 1

Preparação de Imunolipossomas Direcionados a HER2

30 Lipossomas contendo doxorubicina aprisionada foram obtidos da Alza Corporation Mountain View, CA (Doxil[®]). Os lipossomas eram compostos de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC, 56,4% em mol), colesterol (38,3% em mol) e metoxipolietilenoglicol-diestearoil-fosfatidileta-

nolamina (mPEG-DSPE, 5,3% em mol, mPEG MW 2000 Da). A concentração de doxorrubicina na preparação final era 100 µg/mM de lipídeo. O tampão interno usado para a preparação era de 10% de sacarose e o tampão externo era de 10% de sacarose e histidina a 10 mM. O diâmetro médio de lipossomas na formulação final era 93 nm.

O anticorpo scFv do receptor anti-HER2 (SEQ ID NO:2) foi primeiro conjugado a um fosfolipídeo PEGuilado derivatizado com maleimida (mPEG-DSPE) para formar um conjugado de lipídeo-PEG-scFv, de acordo com procedimentos bem conhecidos na técnica e rapidamente discutidos acima e ilustrados nas figuras 1A-1B.

O construto de lipídeo-PEG-anticorpo anti-HER2 foi então associado com bicamadas lipossomais dos lipossomas carregados com doxorrubicina através de incubação dos lipossomas com uma suspensão micelar do construto de lipídeo-polímero-anticorpo. Imunolipossomas carregando uma média de 2, 5, 7,5, 15, 30, 45, 75, 100, 150 e 300 anticorpos foram preparados através do ajuste da quantidade de anticorpo adicionado por mol de fosfolipídeo, conforme sumarizado na Tabela A.

Tabela A

Razão de anticorpo scFv:lipossoma	Quantidade de anticorpo scFv por µmol de fosfolipídeo (µg)
150	60
100	40
75	30
45	18
30	12
15	6
7,5	3
5	2
2	0,8

O número médio teórico de anticorpos por imunolipossoma foi confirmado através da determinação das concentrações de proteína e fosfolipídeo e cálculo do número de anticorpos, com base em uma média de

80.000 fosfolipídeos por 100 nm de lipossoma e um peso molecular de anticorpo de 28,714 kDa. O número de anticorpos em um imunolipossoma pode ser determinado pós-formação dos imunolipossomas através da determinação do peso molecular do anticorpo, do tamanho do lipossoma e da composição do lipossoma. A título de exemplo, para a formulação de 15:1 de imunolipossoma, 15 moles de anticorpo scFv/80.000 moles de fosfolipídeo x 28,714 kDa = 5,4 g/mol. Supondo que 90% do conjugado inserido ou associado com lipossomas durante a incubação: $5,4/90\% = 6 \mu\text{g}$ de anticorpo scFv adicionados por μmol de fosfolipídeo. Então, o número de anticorpos por imunolipossoma relatado aqui reflete uma distribuição média de anticorpos na população de lipossomas, com o número relatado o número médio de anticorpos por lipossoma na população.

Após associação dos conjugados de lipídeo-polímero-anticorpo com os lipossomas, a concentração de doxorrubicina era 86-92 Mm de lipídeo e o diâmetro médio de imunolipossomas após era 93-117 nm.

Exemplo 2

Absorção *In vitro* de Imunolipossomas

Células SK-BR-3 e MCF7 foram compradas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Células SK-BR-3 foram mantidas em cultura *in vitro* em meio modificado da McCoy 5A suplementado com 10% de soro bovino fetal. Células MCF7 foram mantidas em meio da Eagle modificado com da Dulbecco com 10% de soro bovino fetal.

Células SK-BR-3 ou MCF-7 a $1,5 \times 10^5$ células/0,5 mL de meio de crescimento por cavidade foram adicionadas a uma placa de 24 cavidades. Após incubação da noite para o dia para ligação e aclimação, as células foram tratadas com imunolipossomas (7,5:1, 15:1, 30:1 e 45:1 anticorpos anti-HER2:lipossoma) ou lipossomas a 0,015 mg/mL em 0,5 mL de meio de crescimento/cavidade em duplicatas. As placas de 24 cavidades foram então postas em uma plataforma giratória dentro da incubadora com rotação a 40-60 rpm a 37° C, CO₂ a 5% e 100% de umidade por 4 horas. Após incubação, meio celular foi aspirado e as células foram lavadas quatro vezes com Solução Salina Equilibrada de Hank's (HBSS). Após isso, as células foram lisa-

das através da adição de 0,1 mL de Triton X-100 a 1% a cada cavidade. As placas foram giradas para misturar e postas em uma plataforma giratória por 15 minutos em temperatura ambiente. Durante esta etapa, as células separadas do fundo da placa e os núcleos celulares formaram grumos visíveis.

- 5 Isopropanol ácido (1,0 mL) foi adicionado às cavidades contendo a solução de Triton X-100 e misturado girando ou pipetando para cima e para baixo até que grumos visíveis desaparecessem.

O teor de doxorrubicina nos lisatos de célula foi medido através de um espectrofluorômetro usando um comprimento de onda de excitação de 470 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. Os ajustes do
10 espectrofluorômetro eram como segue: largura da fenda 2 nm, tempo de integração 1 segundo, tensão do fotomultiplicador 950 V e modo de aquisição de comprimento de onda simples. Fluorescência do lisato de célula de base foi subtraída e a quantidade de doxorrubicina nos lisatos de célula foi
15 determinada a partir dos padrões concomitantemente medidos (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 e 2500 ng de doxorrubicina por amostra) ajustados a uma curva padrão usando regressão polinomial quadrática. Absorção por célula de doxorrubicina foi determinada através de interpolação a partir da curva padrão. Os dados são expressos em pg de doxorrubicina por células
20 semeadas e são mostrados na Tabela 1. Valores abaixo do nível de detecção foram chamados não-significantes (NS).

Exemplo 3

Citotoxicidade *In vitro* de Lipossomas Direcionados a HER2

Linhagem de célula de carcinoma de mama humano SK-BR-3 foi
25 comprada da American Tissue Type Collection (ATCC, Manassas, VA). As células foram mantidas em cultura *in vitro* em meio modificado da McCoy 5A suplementado com 10% de soro bovino fetal e foram mantidas em uma incubadora umidificada a 37° C.

As células foram expostas por 10 minutos à doxorrubicina (1,8
30 mg/mL) em forma livre, doxorrubicina aprisionada em lipossomas PEGuilados (2,06 mg/mL) ou uma formulação de imunolipossoma tendo 2 anticorpos por lipossoma (1,86 mg/mL), 5 anticorpos por lipossoma (2,12 mg/mL), 7,5

anticorpos por lipossoma (1,99 mg/mL) ou 15 anticorpos por lipossoma (2 mg/mL).

- Células de câncer de mama SK-BR-3 de fase *log* foram coletadas usando Versene (1:5000), ressuspensas em meio de crescimento em uma concentração de 5×10^4 células/mL. Uma alíquota de 0,1 mL (5×10^3 células) foi adicionada a cavidades apropriadas de uma placa de 96 cavidades. Após incubação da noite para o dia para ligação, meio foi removido e substituído com os materiais de teste. Uma alíquota de 0,1 mL de doxorrubicina, variantes de formulação S-DOX ou STEALTH 49, diluída com meio de crescimento para 0,0137, 0,0412, 0,1235, 0,37, 1,11, 3,33, 10 e 30 $\mu\text{g/kg}$, foi adicionada a cada cavidade em triplicata. Meio sem material de teste foi adicionado às cavidades de controle. As células foram expostas ao artigo de teste a 37°C por 10 minutos. No final da incubação, o meio contendo fármaco foi aspirado e as células foram lavadas com 0,2 mL de meio de crescimento. Após lavagem, as células foram incubadas em 0,2 mL de meio fresco sob condições de crescimento por mais 72 horas. No final da incubação, a quantidade de células viáveis foi determinada usando o Promega CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (um método colorimétrico baseado em tetrazólio para determinação do número de células viáveis em proliferação, Madison, WI).
- Resumidamente, meios das cavidades foram aspirados e substituídos com 0,1 mL de meios frescos e 0,02 mL de Promega (Lote No. 186817). As placas foram então incubadas por 3-4 horas após o que absorbância foi registrada a 490 nm com uma leitora de microplaca. A viabilidade celular foi calculada como % de controle não-tratado usando a fórmula:
- $$\% \text{ de Viabilidade} = (A - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100\%$$
- onde A é a absorbância medida, A_0 é a absorbância das vazias e A_{100} é a absorbância das cavidades com células não-tratadas. Viabilidade de célula percentual foi posta em gráfico como uma função de concentração de fármaco e IC_{50} (concentração resultando em 50% de inibição de crescimento celular) foi determinado através de interpolação.

A viabilidade celular como porcentagem de controle para as formulações de imunolipossoma é sumarizada na figura 2A.

Exemplo 4Dissociação *in vitro* de Porção de Direcionamento a Her2 de Lipossomas em Plasma

Lipossomas PEGuilados contendo doxorubicina, preparados conforme descrito no Exemplo 1, foram combinados com conjugado de lipídeo-PEG-scFv marcado com ^{125}I , preparado conforme descrito no Exemplo 1, para gerar um imunolipossoma tendo 7,5, 15, 30, 45 e 90 anticorpos scFv por lipossoma. Os lipossomas e os conjugados foram incubados a 60° C por 1 hora para permitir inserção do conjugado na bicamada externa dos lipossomas. No final da incubação a solução foi esfriada e subsequente-mente armazenada a 2-8° C. Cada formulação de lipossoma foi dializada contra 10% de sacarose/histidina a 10 mM e medida quanto ao teor de doxorubicina. Os lipossomas em cada formulação foram caracterizados quanto ao tamanho, encapsulação de doxorubicina, porcentagem de inserção de conjugado de lipídeo-PEG-anticorpo e concentração de anticorpo scFv, que são sumarizados na Tabela B. A atividade específica final da formulação contendo 15 anticorpos scFv era 28,4 $\mu\text{Ci/mL}$.

Tabela B

Formulação de Lipossoma	Potência da Doxorubicina mg/mL	% de Doxorubicina Enc.	Tamanho de Partícula (nm) 90°/30°	% de Inserção de Conjugado	Conc. de Anticorpo scFv $\mu\text{g/mL}$
90 ScFv/lipossoma	2,19	98	85/101	91	472
45 ScFv/lipossoma	2,00	98	83/93	90	229
30 ScFv/lipossoma	2,11	99	81/94	91	152
15 ScFv/lipossoma	2,10	99	80/94	89	79
7,5 ScFv/lipossoma	2,12	98	82/100	88	39

A dissociação do marcador ^{125}I dos lipossomas, indicativo da dissociação do anticorpo, do conjugado, ou ambos, foi medida como segue. Plasma humano foi misturado com imunolipossoma direcionado a HER2 marcado com ^{125}I e incubado a 37° C durante 96 horas. Em cada ponto de tempo (0, 1, 4, 8, 72, 96 horas) alíquotas de plasma foram removidas e pos-

tas em uma coluna Sepharose CL-4B de 28 x 1,2 cm preparada com um volume de leito de 32 mL. A coluna Sepharose CL-4B foi pré-condicionada com 1 mL de lipossomas de placebo a 100 mM e 1 mL de plasma de rato. As colunas foram eluídas com solução salina a 0,9% contendo azida de sódio a 0,4%. Cada fração (1 mL) foi contada usando um contador gamma para radioatividade de ^{125}I .

A atividade total foi também determinada para cada alíquota e recuperação a partir da coluna Sepharose CL-4B foi de ~90% ou mais para cada amostra aplicada. Em todos os pontos de tempo, não houve menos do que 90% de recuperação de radioatividade a partir da coluna com relação à fração total removida da alíquota aplicada. Os resultados são mostrados na Tabela abaixo, e perfis de eluição para formulação de imunolipossoma de 15:1 são mostrados nas figuras 3A-3H. A figura 4A mostra a dissociação de marcador ^{125}I a partir das formulações de imunolipossoma como uma função de tempo. A figura 4B mostra a porcentagem de marcador ^{125}I restante nos lipossomas como uma função de tempo. A figura 5A mostra a taxa de dissociação de marcador ^{125}I a partir da formulação de imunolipossoma tendo 15 anticorpos por lipossoma em dois estudos diferentes. A figura 5B mostra a liberação induzida por plasma de marcador ^{125}I a partir de formulação de imunolipossoma tendo 15 anticorpos por lipossoma.

Liberação por Plasma de ^{125}I F5 a partir de Imunolipossomas em Razões de F5/Lipossoma Diferentes

Tempo	7,5 F5/Lipo	15 F5/Lipo	30 F5/Lipo	45 F5/Lipo	90 F5/Lipo
0	29	14	14	15	14
1	25	17	17	16	18
4	27	20	21	19	21
8	31	24	23	23	25
24	39	32	32	32	37
48	44	42	38	38	41
72	49	46	42	42	51
96	51	51	48	47	51

Exemplo 5

Dissociação *In vivo* de Porção de Direcionamento a Her2 a partir de Lipossomas em Plasma

Anticorpo scFv marcado com ^{125}I foi preparado usando contas de iodo usando técnicas conhecidas. Resumidamente, o anticorpo scFv (SEQ ID NO:2), $\text{Na}[^{125}\text{I}]$ e contas de iodo foram combinados e a reação foi deixada continuar por 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi extinta com tiosulfato. A fim de remover o $\text{N}[^{125}\text{I}]$ em excesso, a solução reagida foi separada usando uma coluna de dessalinização DG-10. O material no primeiro pico contendo a quantidade maior de radioatividade foi agrupado e avaliado quanto à concentração de proteína, que foi determinada usando A280. O anticorpo scFv iodado foi finalmente passado por um filtro de 0,2 μm para esterilidade e armazenado a 4° C. O material foi usado dentro de 1 mês.

Imunolipossomas tendo 15 anticorpos por lipossoma foram preparados conforme acima descrito através da incubação de lipossomas pré-formados com o conjugado de anticorpo scFv marcado com ^{125}I -PEG-lipídeo a 60° C por 1 hora. No final da incubação, a solução foi esfriada e subsequentemente armazenada a 2-8° C. Os imunolipossomas foram então dializados contra 10% de sacarose/histidina a 10 mM e medidos quanto ao teor de doxorrubicina. O teor de doxorrubicina final era 2,1 mg/mL. Uma amostra da formulação foi caracterizada quanto ao tamanho = 96 nm, pH 6,5, % de doxorrubicina = 99%, porcentagem de inserção de anticorpo = 89% e concentração de anticorpo = 49 $\mu\text{g/mL}$. A atividade específica final dos imunolipossomas era 0,018 mCi/mL.

Anticorpo scFv ^{125}I livre-PEG-lipídeo foi diluído em 10% de sacarose/histidina a 10 mM para uma concentração final de 49 $\mu\text{g/mL}$. A fim de prover conjugado radiomarcado suficiente, conjugado de anticorpo scFv-PEG-lipídeo frio foi adicionado à solução resultando em uma atividade específica final de 0,5 $\mu\text{Ci/mL}$.

Nove ratos machos CD-1 (Charles River Laboratories) de aproximadamente 11 semanas de vida e 358-376 g de peso foram usados neste

estudo. Os animais foram aclimatados para as condições de laboratório por pelo menos 1 semana.

No Dia 0, todos os animais foram aquecidos em um caixa quente de roedor antes da dosagem. Os animais foram manualmente retidos e administrados com um bolo intravenoso único ou de imunolipossomas marcados com ^{125}I ou conjugado de F5- ^{125}I livre através da veia do rabo lateral. A dose administrada por rato era aproximadamente 2 mg/kg de doxorrubicina e/ou 49 mg/kg do conjugado de anticorpo-PEG-lipídeo.

Pesos do corpo e observações clínicas foram registrados no dia de dosagem (Dia 0). Observações ao lado da gaiola foram feitas diariamente por 4 dias. Amostras de sangue foram coletadas através do sino retroorbital sob anestesia inalada (isoflurano/ O_2) em tubos de microfuga heparinizados. Seis ratos foram administrados com imunolipossomas e amostras de sangue (~1,2 mL) foram coletadas (3 animais por ponto de tempo) aproximadamente 5 minutos e 1, 3, 8, 24, 48, 72 e 96 horas pós-dose. Três ratos foram administrados com conjugado de anticorpo-PEG-lipídeo e amostras de sangue (~0,6 mL) foram coletadas aproximadamente 5 min e 1, 3, 8, 24 e 48 horas pós-dose.

Uma alíquota de 100 μL de amostra de sangue integral de cada animal foi contada quanto a ^{125}I usando um contador gama. A amostra de sangue restante foi centrifugada a 2500 RPM (~750 xg) por 20 minuto as 4-8° C para se obter plasma. Uma alíquota a amostra de plasma (50 ou 100 μL) foi retida e contada quanto a ^{125}I . Para ratos dosados com imunolipossomas, um conjunto separado de amostras de plasma foi armazenado a -40° C e mais tarde ensaiado quanto à concentração de doxorrubicina usando um espectrofluorômetro. O resto do plasma foi eluído através de uma coluna de exclusão de tamanho para separar o conjugado de anticorpo-PEG-DSPE livre do ligado a lipossoma. A coluna continha contas de Sepharose-CL-4B com um volume de leito de aproximadamente 22 mL. A solução tampão da coluna (solução salina a 0,9% e NaN_3 a 0,02%) foi alimentada com gravidade em uma taxa de fluxo de aproximadamente 0,5 mL/min.

Para todas as amostras, um pico principal foi observado próximo

- às frações 10-15 correspondendo ao anticorpo scFv associado com a fração de lipossoma. Radioatividade recuperada de frações além da fração lipossomal foi considerada ser "anticorpo scFv livre". Isto é, conjugado de anticorpo scFv-PEG-DSPE micelar ou monomérico que pode ser associado com ou incorporado a proteínas do plasma. Aproximadamente quarenta frações com 1 mL cada foram coletadas e contadas quanto a ^{125}I .

A Tabela C mostra a concentração recuperada de anticorpo associado com a fração lipossomal e da fração dissociada livre. Os resultados são mostrados nas figuras 6A-6C.

10 Tabela C

Tempo (hora)	Concentração de Conjugado Livre (ng/mL) SD		Concentração de Conjugado Ligado a Lipossoma (ng/ml) SD	
0,083333	109,4	18,6	787,2	26,4
1	82,5	4,3	741,8	43,0
3	53,9	2,6	655,3	14,0
8	35,4	2,3	504,8	41,8
24	11,6	0,1	264,9	1,9
48	7,1	0,9	134,9	23,1
72	5,4	0,3	83,6	3,4
96	4,4	0,4	43,9	9,4

Parâmetros Farmacocinéticos

- Amostras de sangue integral e plasma foram contadas quanto à radioatividade (CPM, contagens por minuto) de ^{125}I em um Packard Cobra 5010 Gamma Counter (No. Serial 401611). A CPM foi convertida em porcentagem (%) de dose injetada de acordo com a fórmula que segue,
- $$\% \text{ inj.} = [(CPM/mL \text{ observada}) / ((CPM/mL \text{ Inj.} \times Vol. \text{ Inj.}) / BW \times 0,065) \times 100$$
- onde Inj.: Injetado; BW: peso do corpo; e 0,065 é usado para estimar o volume de sangue total de um animal (isto é, 6,5% BW). Para calcular a porcentagem de dose injetada em plasma, o volume de plasma foi estimado ser 60% (0,6) daquele do volume de sangue.

A meia-vida de eliminação ($T_{1/2\beta}$) de ^{125}I em sangue e plasma foi calculada como o que segue,

$$T_{1/2\beta} = \ln(2)/K_{el}$$

onde $\ln(2) = 0,693$ e K_{el} (constante de eliminação) = $(\ln(C_1) - \ln(C_2)) / (T_1 - T_2)$,

onde C_1 e C_2 são iguais à porcentagem média de dose injetada nos tempos

- 5 T_1 e T_2 . Para ratos dosados com imunolipossomas, T_1 e T_2 eram 8 h e 96 h, respectivamente, enquanto que para ratos dosados com o conjugado de scFv-PEG-DSP, T_1 e T_2 eram 5 min e 8 h, respectivamente.

- 10 Ainda, a concentração de doxorrubicina no plasma foi medida usando um espectrofluorômetro. Parâmetros farmacocinéticos, por exemplo, área sob a curva (AUC), volume de distribuição de estado fixo (V_{ss}), Liberação (CLt) e meia-vida foram calculados usando o *WINNONLIN Noncompartmental Analysis Program Version 4.1*.

Os dados originais são mostrados na Tabela D. Os parâmetros farmacocinéticos são mostrados na Tabela 2 e figuras 7A-7B.

- 15 Tabela D: Porcentagem de Dose Injetada de ^{125}I em Sangue e Plasma, Porcentagem de Dose Injetada de Doxorrubicina (DOX) e Concentração de Doxorrubicina em Plasma

Tempo(h)	Conjugado Sangue Integral (^{125}I , %)	Conjugado Plasma (^{125}I , %)	Imunolipossoma Sangue Integral (^{125}I , %)
0,083	41,8 ± 6,0	40,8 ± 3,1	78,4 ± 4,1
1	19,9 ± 1,8	19,6 ± 2,2	70,8 ± 5,9
3	7,1 ± 0,5	7,0 ± 0,3	60,5 ± 2,9
8	2,9 ± 0,6	2,7 ± 1,1	47,8 ± 5,0
24	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	25,4 ± 1,6
48	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,8 ± 2,2
72	na	na	8,4 ± 0,6
96	na	na	4,4 ± 0,9

Tabela D (Continuação)

Tempo (h)	Imunolipossoma Plasma (^{125}I , %)	Imunolipossoma Plasma (DOX, %)	Imunolipossoma Plasma (DOX, $\mu\text{g/mL}$)
0,083	$77,2 \pm 3,7$ [100%]	$127 \pm 19,7$ [100%]	$69,4 \pm 10,8$
1	$69,5 \pm 3,6$ [90,0%]	$116 \pm 13,1$ [91,3%]	$62,7 \pm 7,3$
3	$59,6 \pm 2,2$ [77,2%]	$102 \pm 4,5$ [80,3%]	$55,8 \pm 2,5$
8	$47,0 \pm 4,4$ [60,9%]	$87,2 \pm 19,6$ [68,7%]	$47,1 \pm 11,0$
24	$23,8 \pm 0,5$ [30,8%]	$54,8 \pm 11,8$ [43,1%]	$29,9 \pm 6,4$
48	$12,5 \pm 2,4$ [16,2%]	$34,6 \pm 7,6$ [27,2%]	$18,6 \pm 4,0$
72	$7,8 \pm 0,2$ [10,1%]	$21,6 \pm 0,5$ [17,0%]	$11,8 \pm 0,3$
96	$4,1 \pm 0,8$ [53,1%]	$11,8 \pm 3,9$ [9,29%]	$6,4 \pm 2,2$

na = amostra não tomada

número em [] : dados normalizados para % de dose injetada no ponto de tempo de 5 minutos

5 Exemplo 6

Administração *In vivo* de Imunolipossomas a Camundongos

Lipossomas tendo um revestimento de PEG e imunolipossomas tendo 15, 75, 150 e 300 anticorpos scFv por lipossoma foram preparados conforme descrito no Exemplo 1. As formulações são sumarizadas na Tabela E.

Tabela E

Grupo de Formulação	Número Aproximado de Anticorpos scFv por Lipossoma	Concentração de Doxorrubicina (mg/mL)
1 Lipossoma (nenhum anticorpo), controle	0	2,06
2 Imunolipossoma 15:1	15	2,00
3 Imunolipossoma 75:1	75	2,04
4 Imunolipossoma 150:1	150	1,68
5 Imunolipossoma 300:1	300	2,05

Cento e quinze (21 por grupo de dose x 5 grupos de dose mais 10 extra = 115) camundongos ICR fêmeas foram obtidos da Charles River.

Os animais foram alojados em gaiolas de fundo plástico convencionais sob um programa de iluminação 12 h/12 h luz/escuro com alimento e água *ad libitum*. Os animais foram aclimatados para as condições de laboratório por pelo menos 1 semana antes do início do estudo.

5 O dia da dosagem foi considerado Dia 0. Todos os camundongos usados foram administrados com uma injeção de bolo única ou de controle ou uma das formulações de teste de imunolipossoma descritas acima através de uma veia lateral do rabo. Volumes de dose foram calculados para cada animal individual e variaram de 0,24 a 0,33 mL. Os camundongos foram aquecidos antes da injeção em uma caixa aquecida de roedor. Os camundongos administrados com a formulação de lipossoma de controle e as formulações de imunolipossoma 15:1 e 300:1 foram dosados em aproximadamente 2,0 mg/kg. Os camundongos administrados com as formulações de imunolipossoma de 75:1 e 150:1 foram dosados em aproximadamente 2,40 e 1,65 mg/kg, respectivamente.

Amostras de sangue (~1 mL cada) foram coletadas de três camundongos por ponto de tempo (5 min, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 h) por formulação. Amostras de sangue foram coletadas através da veia portal hepática sob anestesia inalada (oxigênio/isoflurano) em seringas revestidas com heparina e imediatamente transferidas para um tubo eppendorph de polipropileno. Amostras de sangue foram então armazenadas em gelo úmido até centrifugação em aproximadamente 2500 CPM (~750 xg) por 10 minutos a 3-8° C. Amostras de plasma foram coletadas e armazenadas a -40° C. As amostras de plasma e as soluções de dose foram ensaiadas quanto à doxorubicina total através de análise LC/MS.

As concentrações de doxorubicina de plasma médias foram postas em gráfico contra tempo (figura 9) e usadas para calcular os parâmetros farmacocinéticos. Devido ao fato das concentrações de plasma serem todas de animais individuais, os parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando as concentrações de HCl de doxorubicina no plasma médias e então quaisquer desvios padrão estavam presentes para os parâmetros farmacocinéticos. Parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando WIN-

NONLIN versão 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Parâmetros farmacocinéticos são mostrados na Tabela 3.

Exemplo 7

Eficácia *In vivo*

5 Lipossomas tendo um revestimento de PEG e imunolipossomas tendo 15, 75, 150 e 330 anticorpos scFv por lipossoma foram preparados conforme descrito no Exemplo 1.

Camundongos homozigotos NCR.nu/nu fêmeas (Charler River Laboratories, Hollister, CA), aproximadamente 4-5 semanas de vida, foram
10 usados para o obtido. O peso do corpo médio era aproximadamente 25 g. Os animais foram mantidos em gaiolas isoladas em um ciclo de luz-e-escuro de 12 horas. Alimento e água estavam disponíveis *ad libitum*.

As células de mama humanas BT-474 foram mantidas em cultura *in vitro* (meio RPMI 1640 suplementado com 10 µg/mL de insulina bovina,
15 300 mg/mL de L-glutamina e 10% de soro bovino fetal) a 37° C em uma incubadora de CO₂ a 5% umidificada. As células de câncer de mama de fase log foram tripsinizadas e coletadas de frascos de cultura de célula para dar uma concentração final de 16×10^7 células/mL. Uma injeção subcutânea foi feita (16×10^6 células em 0,1 mL) na parte de trás da área do pescoço de
20 cada camundongo. Um pélete de estradiol (0,72 mg de 17β estradiol, Innovative Research of America, Sarasota, FL) foi também implantado subcutaneamente no flanco de cada camundongo dois dias antes da inoculação da célula de tumor para aumentar a tumorigenicidade. O tratamento começou 23 dias após inoculação da célula de tumor quando o volume de tumor médio atingiu aproximadamente 80 mm³.
25

Cinco animais foram designados para cada grupo de tratamento. Formulações de imunolipossoma contendo várias razões de anticorpo:imunolipossoma foram diluídas, conforme apropriado, e administradas intravenosamente (IV) em um volume de aproximadamente 0,2 mL nas veias
30 laterais do rabo de camundongos retidos em gaiolas de contenção de latão aquecidas (40° C). Imediatamente antes de cada injeção, os camundongos foram mantidos aquecidos em uma caixa de acrílico bem ventilada com um

bulbo de luz de aquecimento. Tratamento com os lipossomas de controle (Doxil®) foi também incluído e serviu como um controle positivo. Os animais tratados com solução salina serviram como controles negativos. A dose de doxorubicina usada para todos os grupos de tratamento era aproximada-
 5 mente 4 mg/kg por semana (qw) e o tratamento continuou por duas semanas.

Os pesos do corpo dos animais foram medidos duas vezes por semana para avaliar a toxicidade do fármaco. Os animais foram removidos do estudo e providos com eutanásia se uma perda de peso de >15% acontecesse ou quaisquer condições anormais se desenvolvessem. Observações
 10 clínicas incluíam comportamento, atividade dentro da gaiola, desidratação e sinais de dor ou sofrimento. Todas as observações clínicas foram registradas na pasta de estudo. No final do período de estudo, todos os animais foram providos com eutanásia através de inalação de dióxido de carbono a
 15 100% de acordo com o *AVMA Panel on Euthanasia* (1993).

Os tumores foram medidos em três dimensões duas vezes por semana por até 38 dias. O volume do tumor foi calculado de acordo com a fórmula:

$$V = \frac{1}{2} \times D_1 \times D_2 \times D_3;$$

20 onde D_{1-3} são diâmetros perpendiculares medidos em milímetros (mm).

O tempo de quadruplicação de volume de tumor (TVQT), definido como o tempo requerido para um tumor crescer para quatro vezes (4x) seu volume inicial (no momento de tratamento), foi usado como ponto final de estudo. O TVQT foi determinado para cada grupo de tratamento e expresso em dias como a média $\pm$ erro padrão (SE).
 25

Análise estatística de retardo em crescimento de tumor entre os vários grupos de tratamento foi realizada através do teste t de Student.

Os resultados são mostrados nas figuras 10A-10B e sumarizados na Tabela F.

Tabela F

Grupos de Tratamento	Dose de Fármaco (mg/kg)	Regime de Dose-gem	No. de Camundongos
1 Solução salina	-	Semanalmente 2x	4 ^a
2 Imunolipossoma 45:1	4	Semanalmente 2x	5
3 Imunolipossoma 30:1	4	Semanalmente 2x	5
4 Imunolipossoma 15:1	4	Semanalmente 2x	5
5 Imunolipossoma 7,5:1	4	Semanalmente 2x	5
6 Lipossomas de controle, nenhum anticorpo (Doxil [®])	4	Semanalmente 2x	5

Tabela F (Continuação)

Grupos de Tratamento	TVQT ^b (M ± SE, em dias)	Retardo de Crescimento (dias)	No. ^c de Curas
1 Solução salina	23,9 ± 7,5	-	-
2 Imunolipossoma 45:1	>35,1 ± 2,9	>11,2	1
3 Imunolipossoma 30:1	>32,9 ± 4,4	> 9,0	-
4 Imunolipossoma 15:1	>36,1 ± 1,9	>12,2	1
5 Imunolipossoma 7,5:1	>38,0 ± 0	>14,1	1
6 Lipossomas de controle, nenhum anticorpo (Doxil [®])	>29,2 ± 6,0	> 5,3	-

^aUm animal no Grupo 1 foi excluído do estudo devido à regressão de tumor.

5 ^bSe qualquer tumor individual em um grupo de tratamento não tivesse atingido seu volume de 4x no final do período de estudo de 38 dias, o dia 38 seria usado no cálculo, e um sinal '>' era anotado para este grupo.

^cTamanho do tumor <10 mm³ como para o dia 38.

Exemplo 8

Estudo de Variação de Dose *In vivo*

Camundongos nus/nus atímicos fêmeas (Harlan Laboratories, IN), aproximadamente 4-5 semanas de vida, foram usados para o estudo. O peso do corpo médio era aproximadamente 20 g. Os animais foram mantidos em gaiolas isoladoras em um ciclo de luz-e-escuro de 12 horas. Alimento e água estavam disponíveis *ad libitum*.

As células de mama humanas BT-474 foram mantidas em cultura *in vitro* (meio RPMI 1640 suplementado com 10 µg/mL de insulina bovina, 300 mg/mL de L-glutamina e 10% de soro bovino fetal) a 37° C em incubadora de CO₂ a 5% umidificada. Células de câncer de mama de fase log foram tripsinizadas e coletadas de frascos de cultura de célula para dar uma concentração final de 15×10^7 células/mL. Uma injeção subcutânea foi feita (30 x 10⁶ células em 0,2 mL) na parte de trás da área do pescoço de cada camundongo. Um pélete de estradiol (0,72 mg de 17β estradiol, Innovative Research of America, Sarasota, FL) foi também implantado subcutaneamente no flanco de cada camundongo dois dias antes da inoculação da célula de tumor para aumentar a tumorigenicidade. O tratamento começou 17 dias após inoculação da célula de tumor quando o volume de tumor médio para todos os grupos de tratamento variou de 106 a 126 mm³.

Os grupos de tratamento são sumarizados na Tabela G. Sete animais foram designados para cada grupo de tratamento. Formulações de lipossoma e imunolipossoma foram administradas intravenosamente (IV) às veias do rabo laterais de camundongos retidos em uma gaiola de contenção de latão (40° C) no volume de aproximadamente 0,2 mL. Imediatamente antes de cada injeção, os camundongos foram mantidos aquecidos em uma caixa acrílica bem ventilada com um bulbo de luz de aquecimento. A dose de doxorubicina usada para a formulação de lipossoma e as formulações de imunolipossoma era 2, 3 ou 4 mg/kg. Todos os tratamentos continuaram uma vez por semana por três semanas.

Tabela G

Grupos de Tratamento	Dose de Fármaco (mg/kg)	Regime de Dose-gem	Via de Inje.
1 Solução salina	-	Semanalmente 3x	-
2 Lipossoma de controle nenhum anticorpo (Doxil®)	2	Semanalmente 3x	IV
3 Lipossoma de controle nenhum anticorpo (Doxil®)	3	Semanalmente 3x	IV
4 Lipossoma de controle nenhum anticorpo (Doxil®)	4	Semanalmente 3x	IV
5 Imunolipossoma 15:1	2	Semanalmente 3x	IV
6 Imunolipossomas 15:1	3	Semanalmente 3x	IV
7 Imunolipossomas 15:1	4	Semanalmente 3x	IV

Tabela G (continuação)

Grupos de Tratamento	No. de Ca-mun-dongos	TVTT ^b (M ± SE, em dias)	Retardo de Crescimen-to (dias)
1 Solução salina	7	11,1 ± 1,9	-
2 Lipossoma de controle nenhum anticorpo (Doxil®)	7	16,7 ± 4,8	5,6
3 Lipossoma de controle nenhum anticorpo (Doxil®)	6	26,0 ± 3,9	14,9
4 Lipossoma de controle nenhum anticorpo (Doxil®)	7	>34,2 ± 9,0	>23.2
5 Imunolipossoma 15:1	7	>36,1 ± 6,6	>25,0
6 Imunolipossomas 15:1	5	>29,5 ± 8,6	>18,4
7 Imunolipossomas 15:1	6	>49,0	>37,9

^aTempo de triplicação do volume do tumor

Os tumores foram medidos em três dimensões duas vezes por semana por

5 até 49 dias. O volume do tumor foi calculado de acordo com a fórmula:

$$V = \frac{1}{2} \times D_1 \times D_2 \times D_3;$$

onde D_{1-3} são diâmetros perpendiculares medidos em milímetros (mm).

O tempo de triplicação do tumor (TVTT), definido como o tempo requerido para que um tumor cresça para três vezes (3x) o seu volume inicial (no momento de tratamento), foi usado como um ponto final de estudo. O

- 5 tempo de triplicação de volume do tumor foi determinado para cada grupo de tratamento e expresso em dias como a média $\pm$ erro padrão (SE). Os pesos do corpo do animal foram medidos duas vezes por semana para avaliar a toxicidade do fármaco.

- 10 Análise estatística de retardo em crescimento de tumor entre os vários grupos de tratamento foi realizada através do teste t de Student. Os resultados são mostrados na figura 11.

Exemplo 9

Farmacocinética e Estudo de Toxicidade *In vivo*

- 15 Trinta e oito macacos cinomólogos inocentes (*Macaca fascicularis*), 3 a 8 anos de idade e pesando 2,5 a 4,5 kg, foram aleatorizados para seis grupos de tratamento, com 3 machos e 3 fêmeas por grupo, sumarizado na Tabela H.

Tabela H

Grupo	No. de Animais (M/F)	Dose (mg/kg)	Conc. de Dose (mg/mL)	Volume de Dose (mL/kg)
1 Solução salina	3/3	0	0	10
2 Imunolipossoma 15:1 placebo	3/3	0	0	10
3 Imunolipossoma 15:1, Baixo	3/3	1	1	1
4 Imunolipossoma 15:1, Leve	3/3	5	1	5
5 Imunolipossoma 15:1, Alto	3/3	10	1	10
6 Lipossoma PEGuilado (Doxil [®] , comparador)	3/3	10	2	5

- 20 Imunolipossomas tendo 15 anticorpos anti-HER2 de cadeia simples, em média, foram preparados conforme acima descrito. No Dia 1, os animais receberam uma injeção intravenosa lenta única (~1 mL/min) em

uma veia periférica, e monitorados por 28 dias pós-dose. Observações clínicas e monitoramento do consumo de alimento foram realizados pelo menos uma vez por dia. Os pesos do corpo foram medidos duas vezes por dia. Sangue foi coletado para hematologia e análise química de soro pré-dose nos Dias 1 (1 hora pós-dose), 4, 14 e 28. Sangue foi coletado para análise toxicocinética em pré-dose e 5 min, 1, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas seguindo o término da dose. As amostras de soro foram analisadas quanto à doxorrubicina no plasma e concentração de anticorpo. Os resultados são mostrados nas figuras 12-14.

10 Exemplo 10

Estudo de Toxicidade de Dose Repetida *In vivo*

Setenta macacos cinomólogos inocentes (*Macaca fascicularis*), 3 a 8 anos de idade e pesando 2,5 a 4,5 kg, foram aleatorizados para sete grupos de tratamento, com 5 machos e 5 fêmeas por grupo, sumarizado na

15 Tabela 1.

Tabela I

Grupo	Nº de Animais (M/F)	Dose (mg/kg)	Conc. de Dose (mg/mL)	Volume de Dose (mL/kg)
1 Solução salina	5/5	0	0	0
2 Imunolipossoma 15:1 placebo	5/5	0	0	0
3 Imunolipossoma 15:1, Baixo	5/5	0,5	6	36
4 Imunolipossoma 15:1, Leve	5/5	2	24	144
5 Imunolipossoma 15:1, Alto	5/5	4	48	288
6 Lipossoma PEGuilado (Doxil®, comparador)	5/5	4	48	288
7 Doxorrubicina (fármaco livre)	5/5	4	48	288

Imunolipossomas tendo 15 anticorpos de cadeia simples com afinidade de ligação para o receptor de célula HER2, em média, foram preparados conforme acima descrito. Os animais receberam a dose indicada intravenosamente uma vez a cada quatro semanas por um total de seis tra-

tamentos. Sangue foi coletado para hematologia e análise química do soro pré-dose e em pontos de tempo selecionados. As amostras de sangue foram analisadas quanto à doxorrubicina no plasma e os resultados são mostrados nas figuras 15A-15C.

- 5 Embora vários aspectos exemplares e modalidades tenham sido discutidos acima, aqueles versados na técnica vão reconhecer certas modificações, permutações, adições e subcombinações deles. É então pretendido que as reivindicações apenas que seguem e reivindicações introduzidas no futuro sejam interpretadas para incluir todas tais modificações, permutações,
- 10 adições e subcombinações uma vez que estão dentro de seu verdadeiro espírito e escopo.

Listagem de Sequência

<110> Alza Corporation
Hjortsvang, Kristen
Guo, Luke
Wong, Francis M.P.
Najafi, Azar
Ruang, Anthony
Abra, Robert
Kelley, Laura

<120> COMPOSIÇÃO DE IMUNOLIPOSSOMA PARA DIRECIONAMENTO A UM RECEPTOR CELULAR HER2

<130> 553258195W00

<140> Ainda não determinado

<141> Aqui apresentado

<150> US 60/674,029

<151> 2005-04-22

<150> US 60/736,669

<151> 2005-11-14

<160> 2

<170> versão da Patente 3.3

<210> 1

<211> 738

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ala	Gly	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Cys	Thr	Thr	
			20					25				30			
Gly	Gly	Thr	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
			35				40					45			
Thr	Cys	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Ala	Cys	Thr	Cys	Thr	Cys	Cys	Thr
			50				55				60				
Gly	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Thr
			65				70				75			80	
Cys	Ala	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Ala	Thr	
				85				90				95			
Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Cys	Cys
			100				105					110			
Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala
			115				120					125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Cys
			130				135					140			
Thr	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys
			145				150				155			160	
Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Thr	Ala	Ala	Cys	Ala	Cys	Ala	Thr	Ala
				165						170				175	
Cys	Thr	Ala	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Gly	Thr	Gly
			180					185					190		
Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Gly	Gly	Thr	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala
			195				200					205			

Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Thr Cys
 210 215 220
 Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Gly Cys Thr Gly Thr Ala Thr
 225 230 235 240
 Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys
 245 250 255
 Thr Gly Ala Gly Ala Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys
 260 265 270
 Gly Gly Cys Cys Gly Thr Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr
 275 280 285
 Gly Cys Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Cys Ala Ala Gly Thr Ala
 290 295 300
 Ala Cys Gly Cys Gly Thr Thr Cys Gly Cys Ala Thr Thr Thr Gly Ala
 305 310 315 320
 Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala
 325 330 335
 Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr
 340 345 350
 Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Gly Gly
 355 360 365
 Thr Thr Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys
 370 375 380
 Thr Cys Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Ala Thr
 385 390 395 400
 Cys Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys
 405 410 415
 Gly Cys Ala Gly Cys Cys Gly Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Gly
 420 425 430
 Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys
 435 440 445
 Ala Gly Ala Gly Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys
 450 455 460
 Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys
 465 470 475 480
 Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Thr Cys Gly Gly Gly Cys Ala Gly
 485 490 495
 Gly Thr Thr Ala Thr Gly Gly Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Thr Gly
 500 505 510
 Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Cys Ala
 515 520 525
 Gly Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala Cys
 530 535 540
 Thr Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Ala Ala
 545 550 555 560
 Cys Ala Cys Cys Ala Ala Thr Cys Gly Gly Cys Cys Cys Thr Cys Ala
 565 570 575
 Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Gly Ala Thr
 580 585 590
 Thr Cys Thr Cys Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Thr Cys
 595 600 605
 Thr Gly Gly Cys Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Cys
 610 615 620
 Cys Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Thr Gly Gly Gly Cys
 625 630 635 640
 Thr Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr Gly Ala
 645 650 655
 Gly Gly Cys Thr Gly Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Cys
 660 665 670
 Cys Ala Gly Thr Cys Cys Thr Ala Thr Gly Ala Cys Ala Gly Cys Ala
 675 680 685
 Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Gly Thr
 690 695 700

Gly Thr Thr Cys Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala Cys Cys
 705 710 715 720
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Cys Cys Thr Ala Gly
 725 730 735

Gly Thr

<210> 2
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Arg Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Met Thr Ser Asn Ala Phe Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
 130 135 140
 Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro
 165 170 175
 Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser
 180 185 190
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Phe Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
 195 200 205
 Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Lys Leu Thr Val Leu Gly
 245

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo

lipossomas compreendidos de (i) lipídeos de formação de vesícula; (ii) um lipopolímero; (iii) um conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, um polímero hidrofílico e um anticorpo que se liga especificamente a um domínio extracelular de um receptor HER2; e (iv) um fármaco capturado, o dito conjugado presente em uma quantidade eficaz para prover, em média, mais do que cerca de 2 e menos do que cerca de 25 anticorpos por lipossoma.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, onde o dito anticorpo tem um peso molecular entre 20.000-50.000 Dáltons.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, onde o dito anticorpo tem pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2.

4. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, onde o dito polímero hidrofílico é polietileno glicol tendo um peso molecular entre 750-5000 Dáltons.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, onde o dito fármaco capturado é um fármaco citotóxico ou um agente antitumor.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, onde o dito fármaco capturado é uma antraciclina.

7. Composição de acordo com a reivindicação 6, onde o dito fármaco é doxorrubicina.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, onde a dita quantidade de conjugado provê menos do que cerca de 20 anticorpos por lipossoma, em média, 48 horas após administração *in vivo*.

9. Formulação de lipossoma compreendendo

lipossomas compreendidos de (i) pelo menos um lipídeo de formação de vesícula rígido; (ii) um lipopolímero compreendido de uma porção hidrofóbica e polietileno glicol; (iii) um conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, polietileno glicol e um anticorpo de cadeia simples que se

liga especificamente a um domínio extracelular de um receptor HER2; o dito anticorpo de cadeia simples tendo a identidade de SEQ ID NO:2 ou substituições conservativas dela; e (iv) um fármaco capturado tendo atividade antitumor.

5 onde os ditos lipossomas são caracterizados por uma quantidade de conjugado eficaz para prover mais do que cerca de 2 e menos do que cerca de 15 anticorpos por lipossoma 96 horas após administração *in vitro*, conforme evidenciado por um ensaio *in vitro* onde os lipossomas são incubados a 37° C por 96 horas e dissociação do anticorpo de cadeia simples a partir do lipossoma é determinada.

10 10. Formulação de acordo com a reivindicação 10, onde o dito lipídeo de formação de vesícula rígido é fosfatidilcolina de soja hidrogenada.

11. Formulação de acordo com a reivindicação 9 ou reivindicação 10, onde os ditos lipossomas compreendem ainda colesterol.

15 12. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 9-11, onde o dito fármaco capturado é uma antraciclina.

13. Formulação de acordo com a reivindicação 12, onde o dito fármaco capturado é doxorrubicina.

20 14. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 9-11, onde a dita quantidade de conjugado provê menos do que cerca de 12 anticorpos por lipossoma, em média, 48 horas após administração *in vivo*.

25 15. Formulação de imunolipossoma compreendendo lipossomas compreendidos de (i) pelo menos um lipídeo de formação de vesícula rígido; (ii) um lipopolímero compreendido de uma porção hidrofóbica e polietileno glicol; (iii) um conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, polietileno glicol e um anticorpo de cadeia simples que se liga especificamente a um domínio extracelular de um receptor HER2, o dito anticorpo de cadeia simples tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 2; e (iv) um fármaco capturado tendo atividade antitumor,

30 a dita formulação de imunolipossoma quando administrada *in vivo* provendo uma área sob a curva que é maior do que ou não mais do que 25% menor do que a área sob a curva de lipossomas compreendidos de

componentes similares mas sem o dito anticorpo.

16. Formulação de acordo com a reivindicação 15, onde o dito lipídeo de formação de vesícula rígido é fosfatidilcolina de soja hidrogenada.

17. Formulação de acordo com a reivindicação 15 ou reivindicação 16, onde os ditos lipossomas compreendem ainda colesterol.

18. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-17, onde o dito fármaco capturado é uma antraciclina.

19. Formulação de acordo com a reivindicação 18, onde o dito fármaco capturado é doxorubicina.

20. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-17, onde a dita quantidade de conjugado provê maior do que dois anticorpos por lipossoma e menos do que cerca de 20 anticorpos por lipossoma, em média, 48 horas após administração *in vivo*, conforme evidenciado por um ensaio *in vitro* onde os lipossomas são incubados a 37° C por 48 horas e dissociação do anticorpo de cadeia simples a partir do lipossoma é determinada.

21. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-17, onde a dita quantidade de conjugado provê mais do que dois anticorpos por lipossoma e menos do que cerca de 15 anticorpos por lipossoma, em média, 96 horas após administração *in vivo*, conforme evidenciado por um ensaio *in vitro* onde os lipossomas são incubados a 37° C por 96 horas e dissociação do anticorpo de cadeia simples a partir do lipossoma é determinada.

22. Formulação de imunolipossoma compreendendo lipossomas compreendidos de (i) pelo menos um lipídeo de formação de vesícula rígido; (ii) um lipopolímero compreendido de uma porção hidrofílica e polietileno glicol; (iii) um conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, polietileno glicol e um anticorpo de cadeia simples que se liga especificamente a um domínio extracelular de um receptor HER2 e tendo uma seqüência identificada como SEQ ID NO: 2; e (iv) um fármaco capturado tendo atividade antitumor,

onde 96 horas após administração dos ditos lipossomas, entre

30-60% dos anticorpos dissociam de cada lipossoma para prover uma composição, 96 horas após administração *in vivo*, que tem menos do que cerca de 25 anticorpos por lipossoma, conforme evidenciado por um ensaio *in vitro* onde os lipossomas são incubados a 37° C por 96 horas e dissociação do anticorpo de cadeia simples a partir do lipossoma é determinada.

23. Composição de lipossoma de acordo com o processo de provisão de lipossomas tendo um revestimento externo de cadeias de polímero hidrofílico e um fármaco capturado;

incubação dos ditos lipossomas com uma quantidade de conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, polietileno glicol e um anticorpo de cadeia simples que especificamente se liga a um domínio extracelular de um receptor HER2; a dita quantidade de conjugado sendo selecionada para prover mais do que cerca de 2 e menos do que cerca de 15 anticorpos por lipossoma em média 96 horas após administração *in vivo*, conforme evidenciado por um ensaio *in vitro* onde os lipossomas são incubados a 37° C por 96 horas e dissociação do anticorpo de cadeia simples a partir do lipossoma é determinada.

24. Composição de acordo com a reivindicação 23, onde o dito anticorpo tem uma sequência identificada como SEQ ID NO: 2.

25. Composição de acordo com a reivindicação 23 ou reivindicação 24, onde o dito fármaco é doxorrubicina.

26. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 23-25, onde a dita quantidade de conjugado provê entre cerca de 2-10 anticorpos por lipossoma, em média.

27. Composição compreendendo

lipossomas compreendidos de (i) lipídeos de formação de vesícula; (ii) um lipopolímero; (iii) um conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, um polímero hidrofílico e um anticorpo que se liga especificamente a um domínio extracelular de um receptor HER2; e (iv) um fármaco capturado, os ditos lipossomas antes da administração *in vivo* tendo menos do que 25 anticorpos por lipossoma, onde após administração *in vivo*, os ditos lipossomas perdem 20-50% dos ditos anticorpos ainda retraindo ligação

do dito receptor HER2 suficiente citotoxicidade.

28. Composição de acordo com a reivindicação 27, onde o dito anticorpo é SEQ ID NO: 2.

29. Composição de acordo com a reivindicação 27 ou reivindicação 28, onde o dito fármaco é doxorrubicina.

30. Método de preparação de uma composição de lipossoma compreendendo:

provisão de lipossomas compreendidos de (i) lipídeos de formação de vesícula; (ii) um lipopolímero; (iii) um conjugado compreendido de uma porção hidrofóbica, um polímero hidrofílico e um anticorpo que especificamente se liga a um domínio extracelular de um receptor HER2; o dito conjugado incluído em uma primeira quantidade suficiente para prover um primeiro número selecionado de anticorpos por lipossoma; e (iv) um fármaco capturado,

contato dos ditos lipossomas com sangue;
determinação do número de anticorpos por lipossoma em um ou mais pontos de tempo quando do contato dos ditos lipossomas com sangue;
seleção, com base na dita determinação, de uma segunda quantidade de um conjugado suficiente para prover um segundo número, maior, de anticorpos por lipossomas a fim de prover pelo menos dois anticorpos por lipossoma após contato com sangue.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, onde o dito contato inclui contato dos ditos lipossomas com sangue *in vitro*.

32. Método de acordo com a reivindicação 30, onde o dito contato inclui contato dos ditos lipossomas com sangue *in vivo*.

33. Método de acordo com a reivindicação 31 ou 32, onde a dita provisão inclui provisão de lipossomas tendo um conjugado compreendido de um fosfolipídeo, uma porção hidrofílica de polietileno glicol e um anticorpo de cadeia simples tendo uma sequência identificada aqui como SEQ ID NO: 2.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, onde a dita provisão inclui provisão de lipossomas tendo doxorrubicina como o fármaco cap-

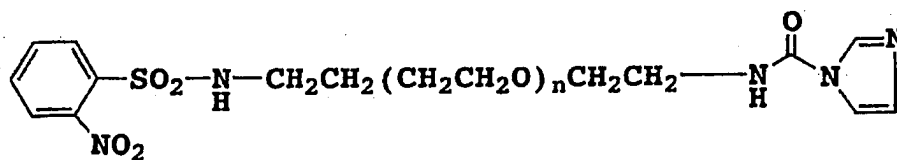
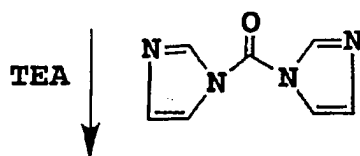
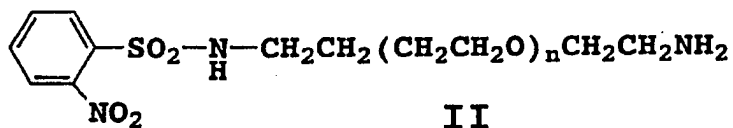
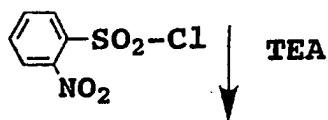
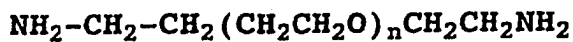
turado.

35. Método de acordo com a reivindicação 30, onde a dita seleção compreende seleção de uma segunda quantidade de conjugado eficaz para prover menos do que 50 anticorpos por lipossoma.

5 36. Método de acordo com a reivindicação 30, onde a dita provisão inclui provisão de lipossomas tendo uma primeira quantidade de conjugado que provê menos do que 150 anticorpos por lipossoma.

10 37. Método de acordo com a reivindicação 30, onde a dita seleção compreende seleção de uma segunda quantidade de conjugado eficaz para prover 30 ou menos anticorpos por lipossoma.

I



III

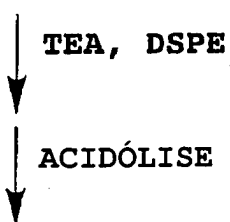


Fig. 1A

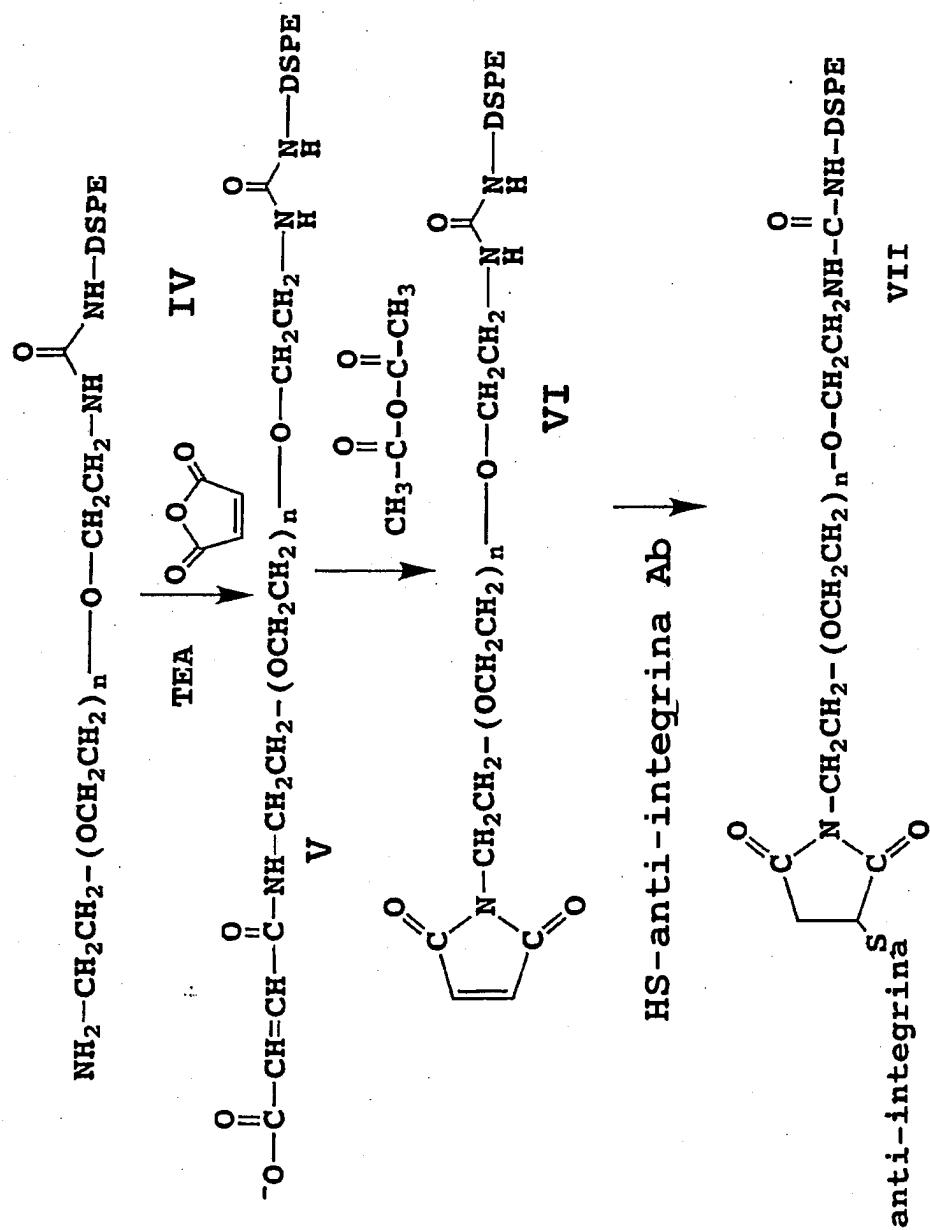
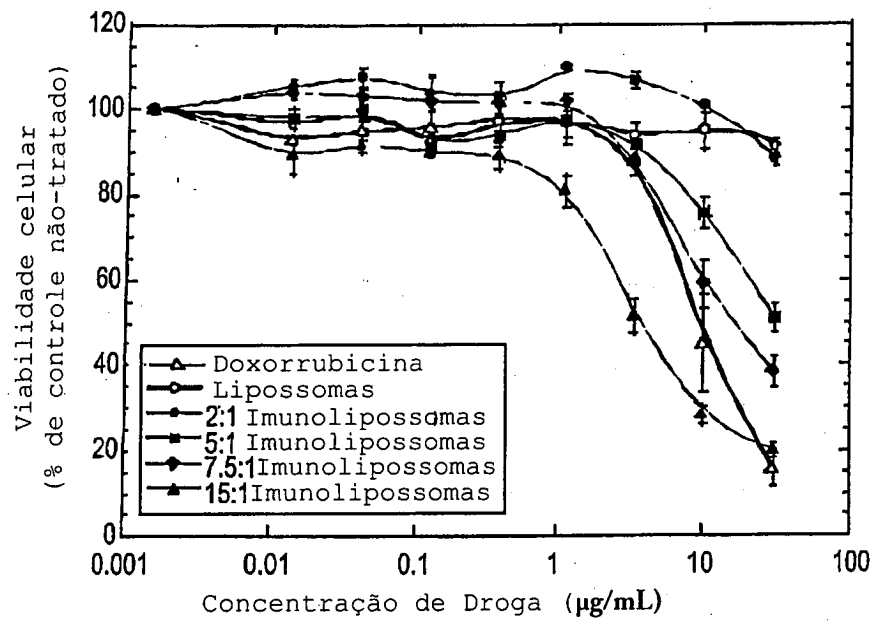
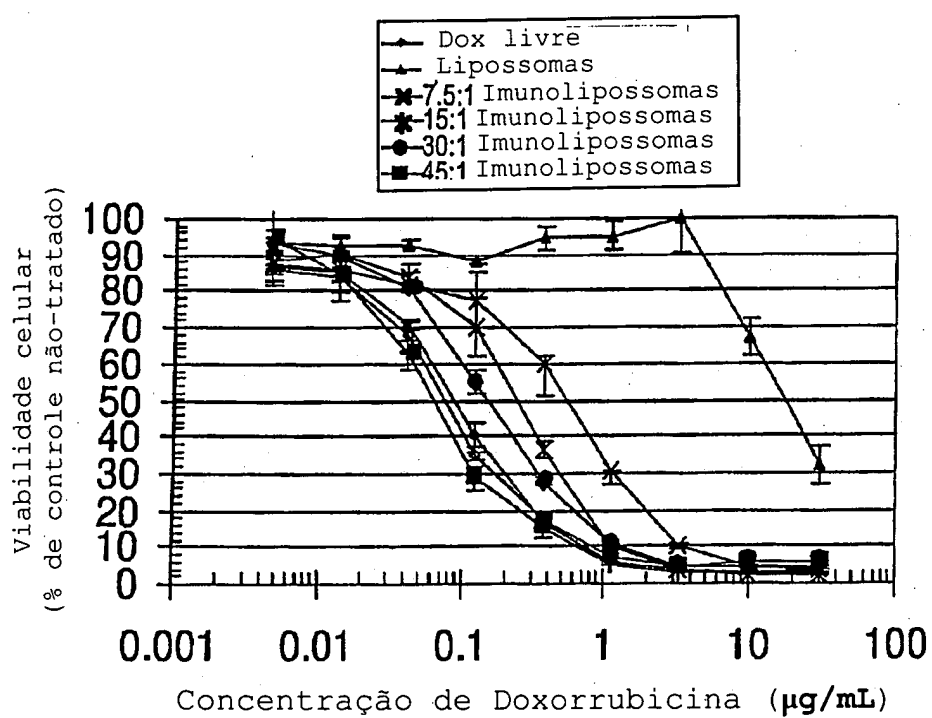
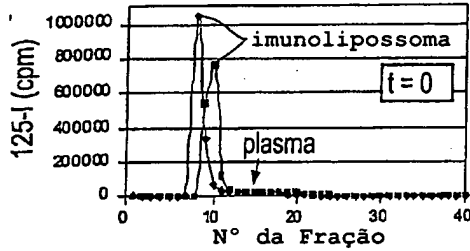
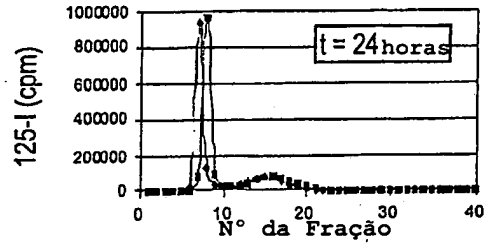
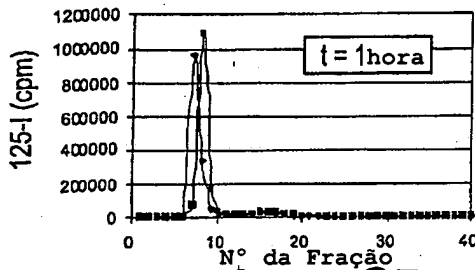
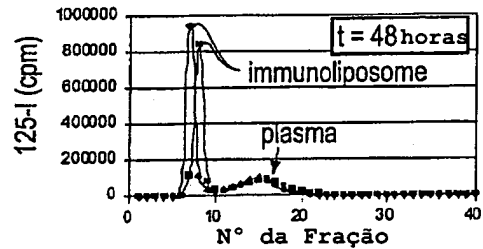
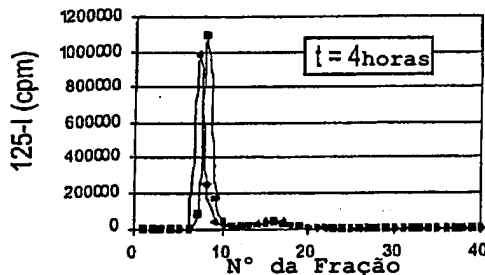
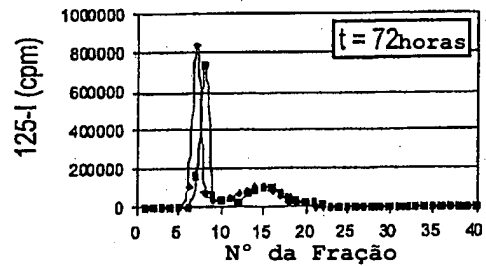
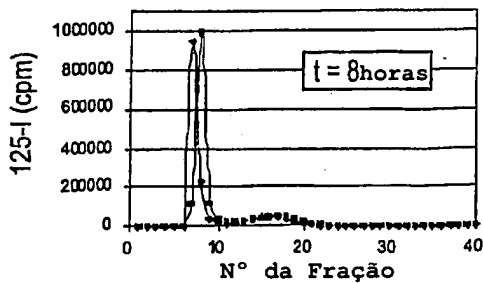
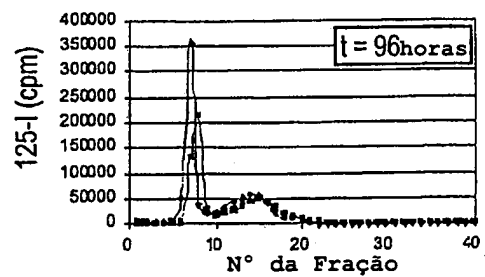


Fig. 1B

**Fig. 2A**

**Fig. 2B**

**Fig. 3A****Fig. 3E****Fig. 3B****Fig. 3F****Fig. 3C****Fig. 3G****Fig. 3D****Fig. 3H**

6/22

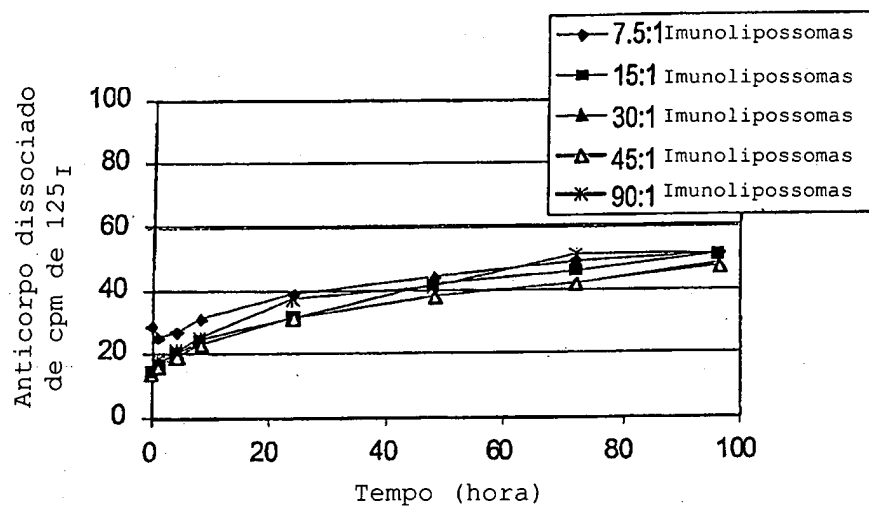


Fig. 4A

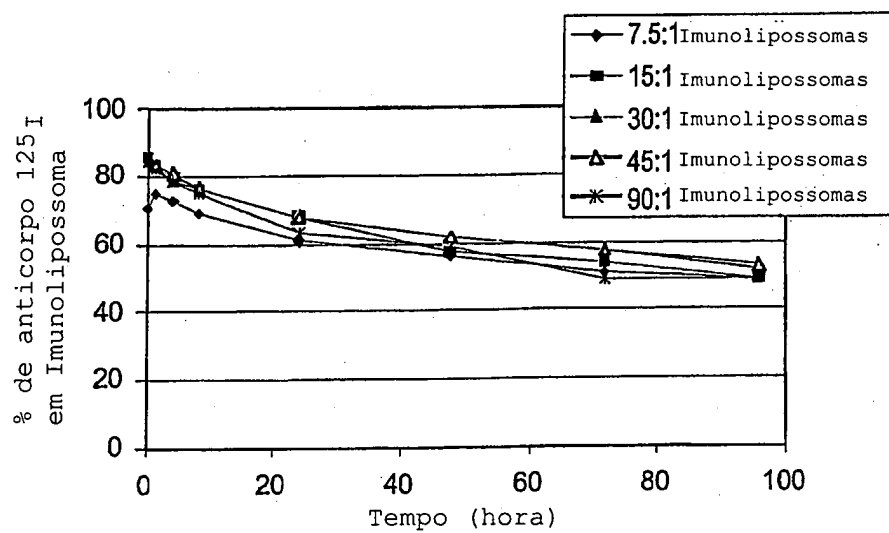


Fig. 4B

7/22

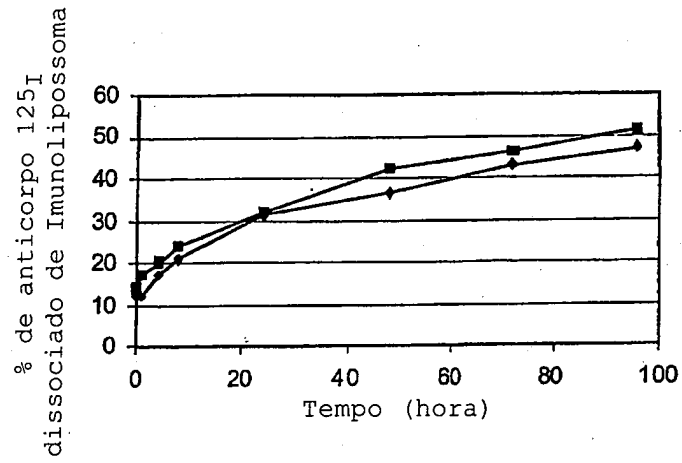


Fig. 5A

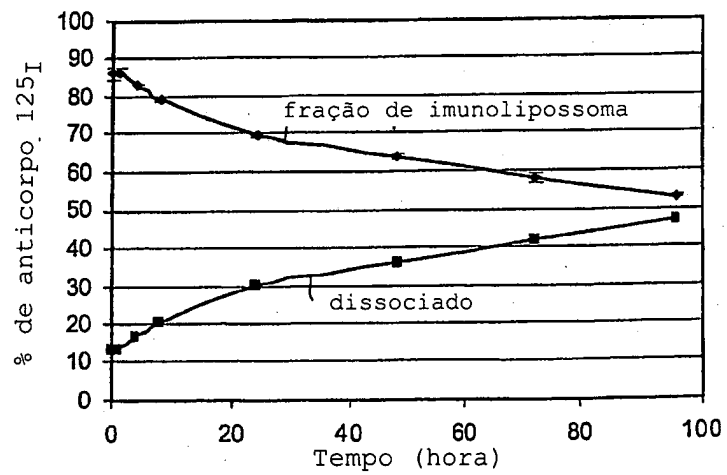


Fig. 5B

8/22

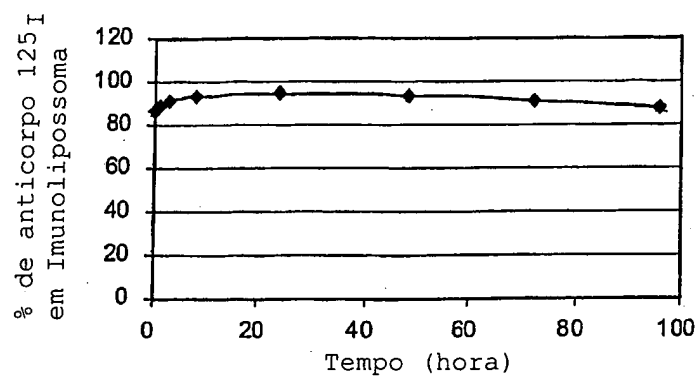


Fig. 6A

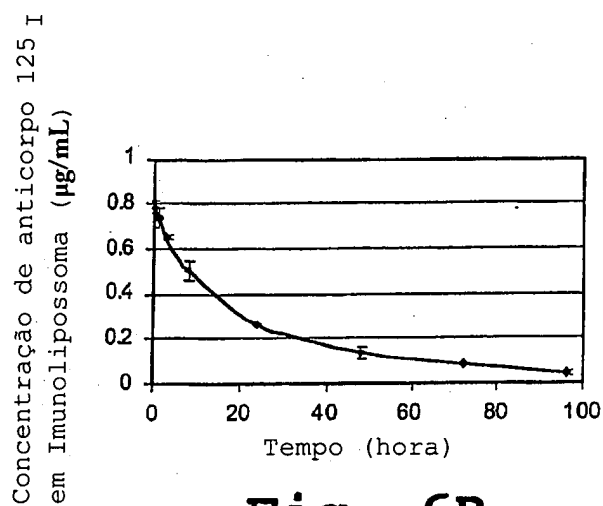


Fig. 6B

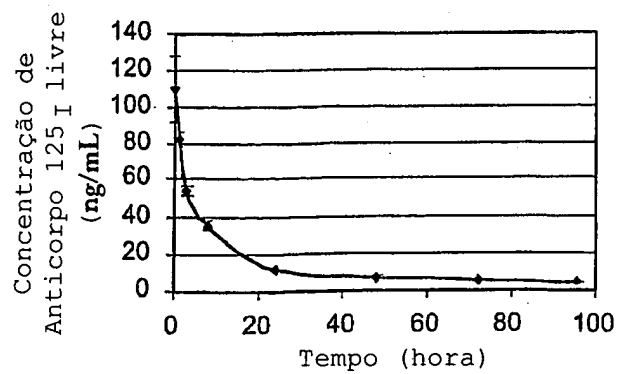


Fig. 6C

9/22

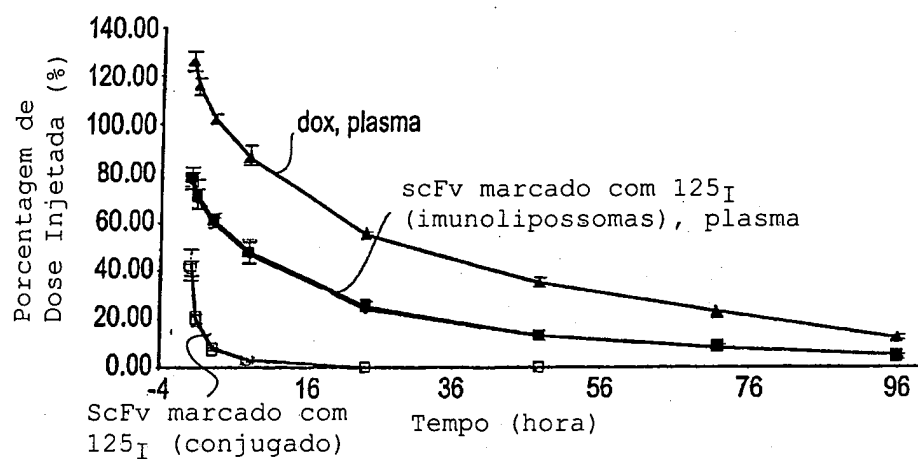


Fig. 7A

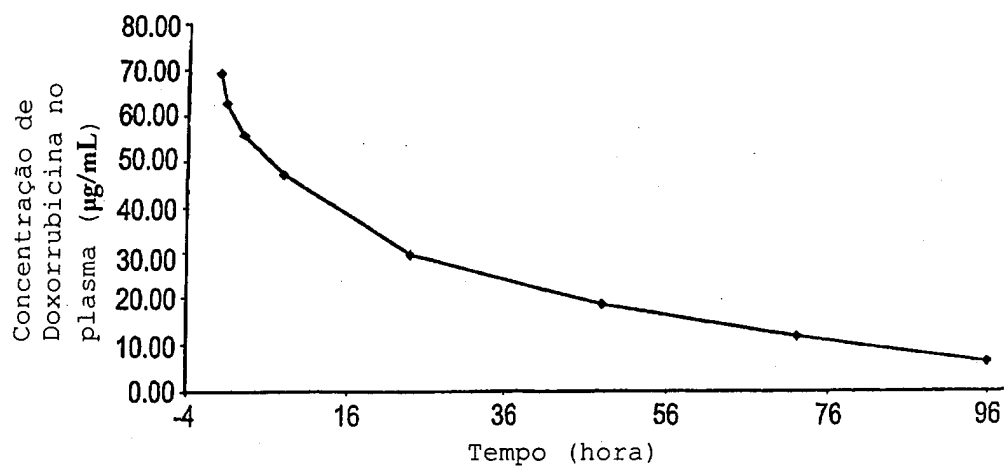


Fig. 7B

10/22

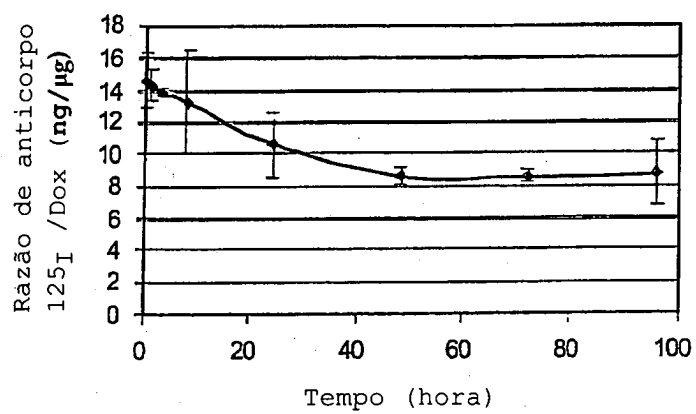


Fig. 8

11/22

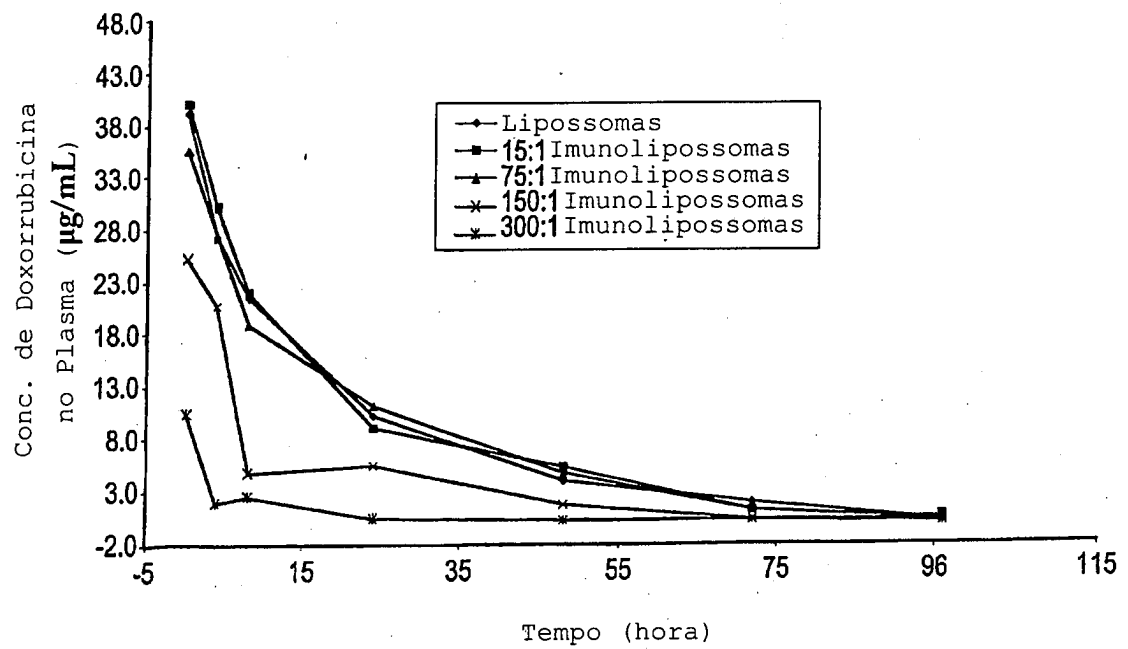


Fig. 9

12/22

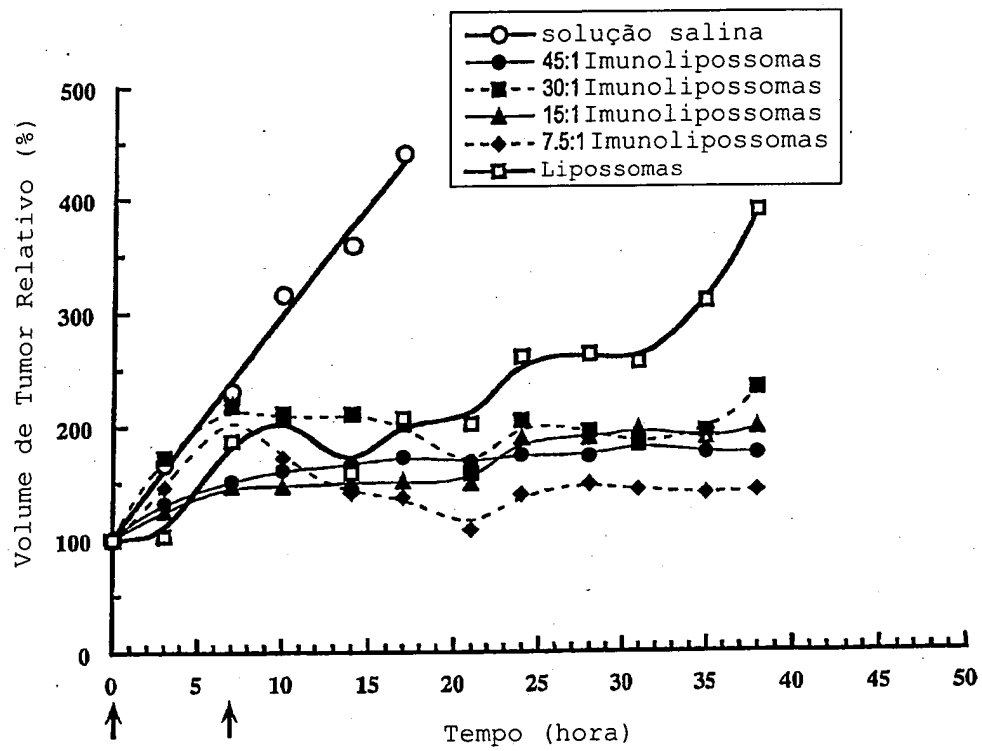
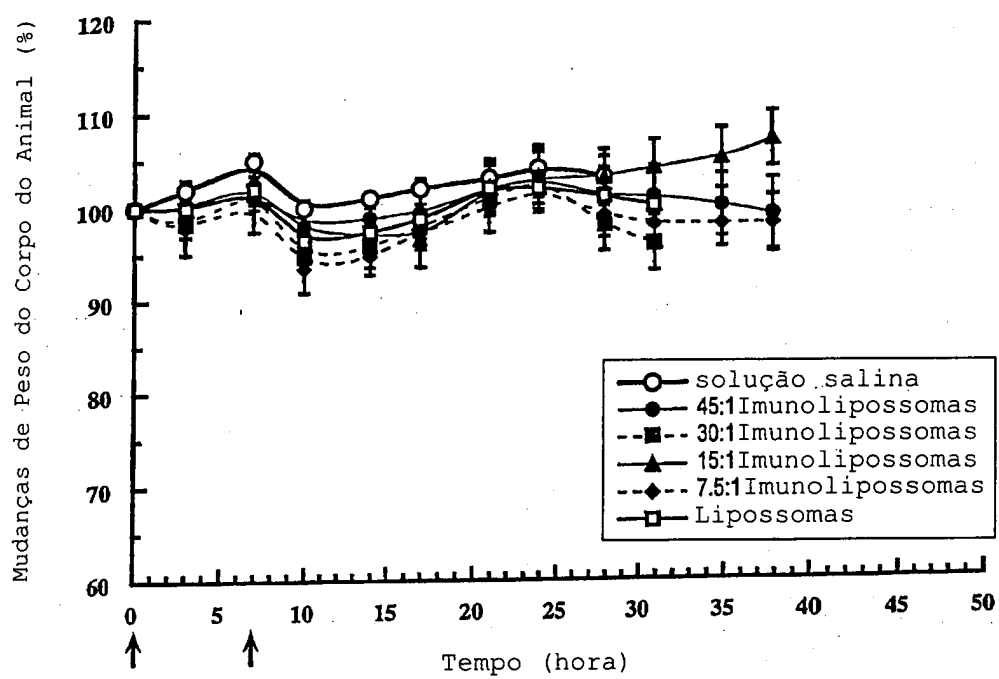
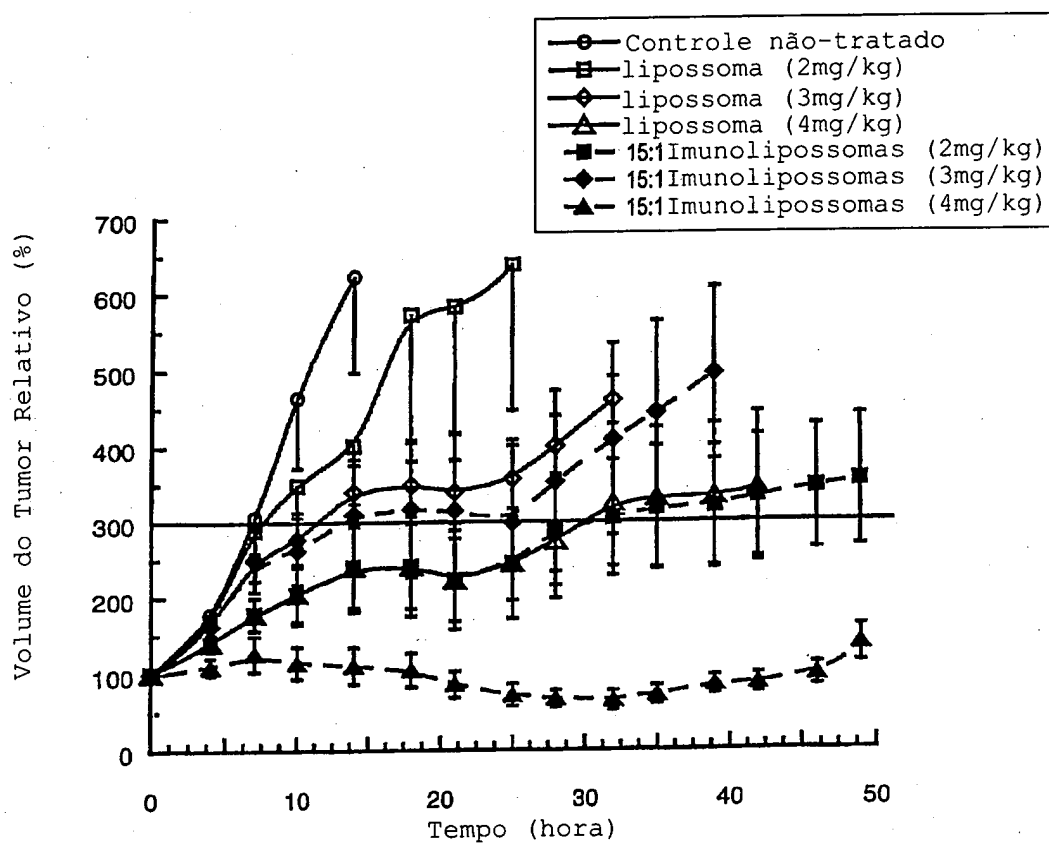
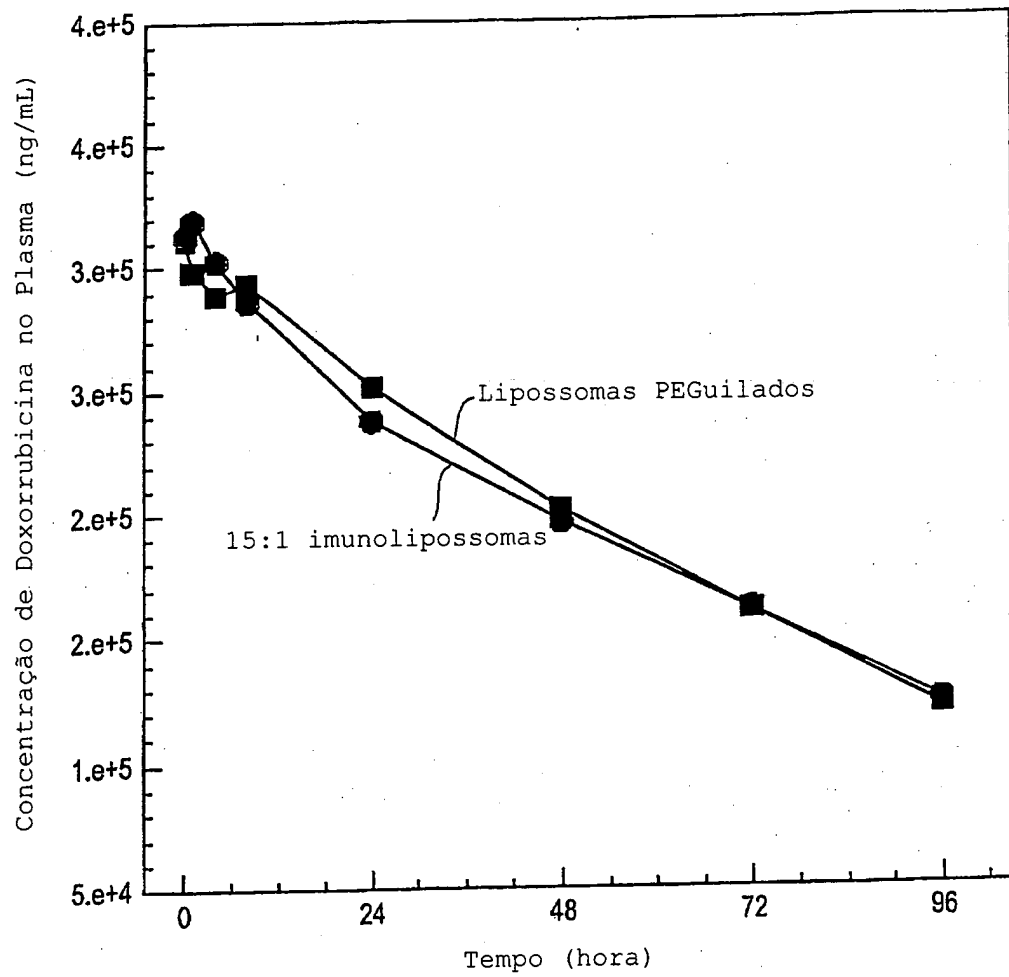
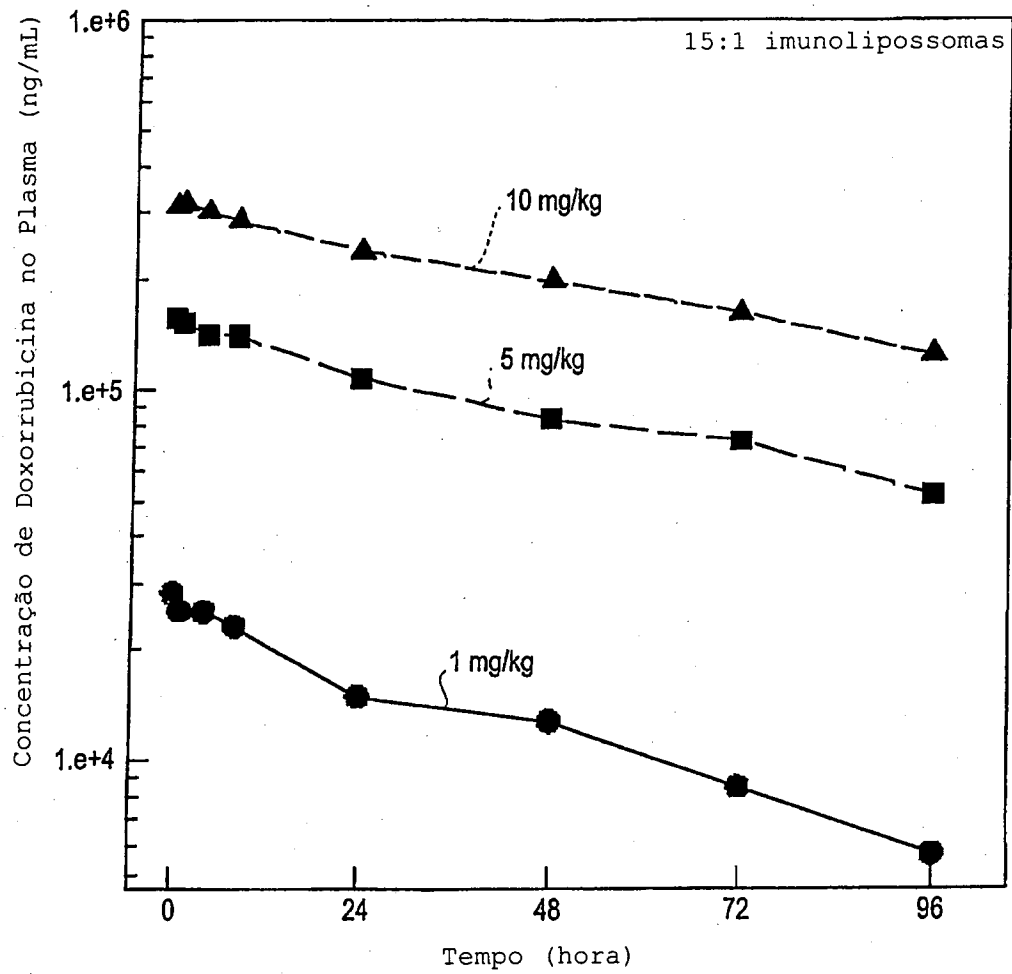


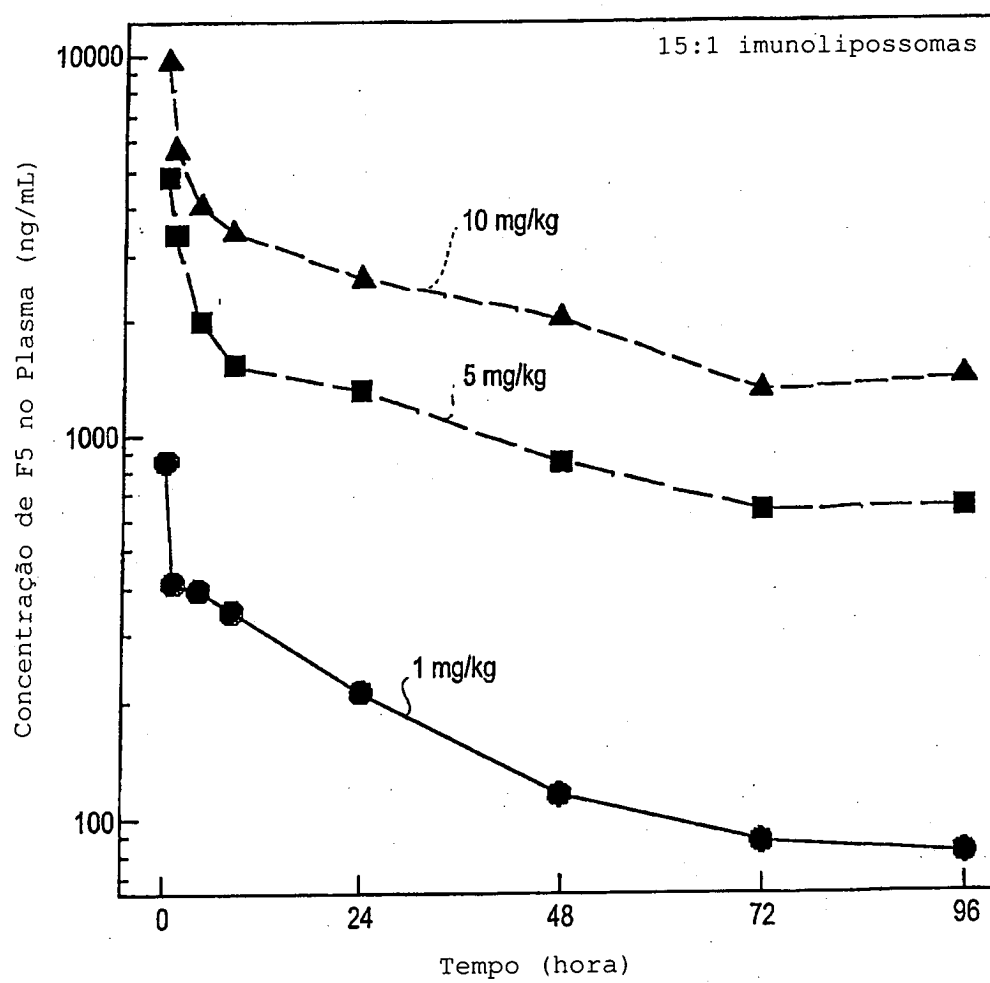
Fig. 10A

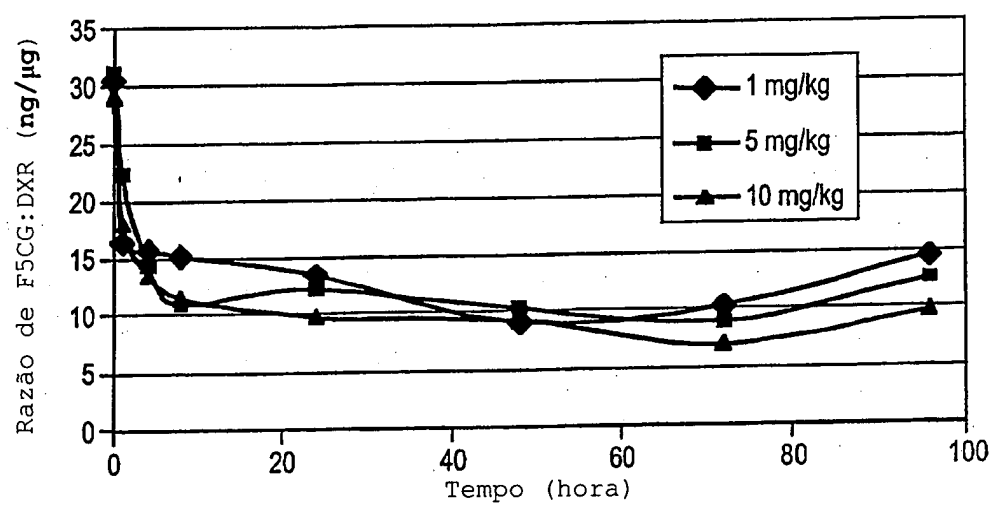
**Fig. 10B**

**Fig. 11**

**Fig. 12**

**Fig. 13A**

**Fig. 13B**

**Fig. 14A**

19/22

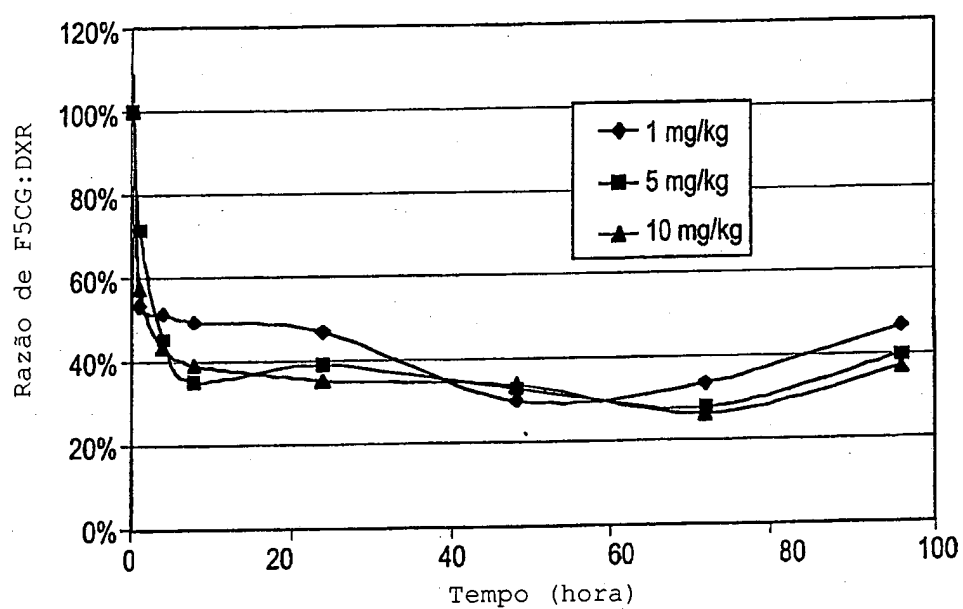
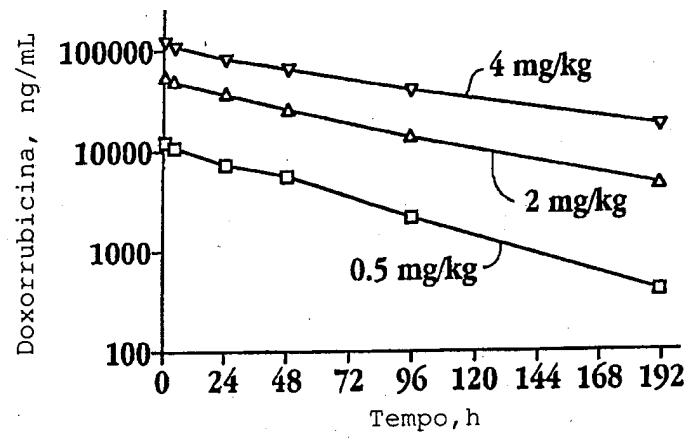
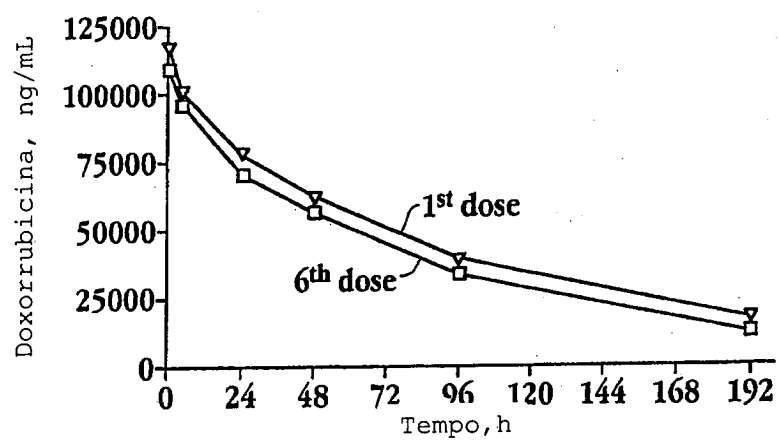
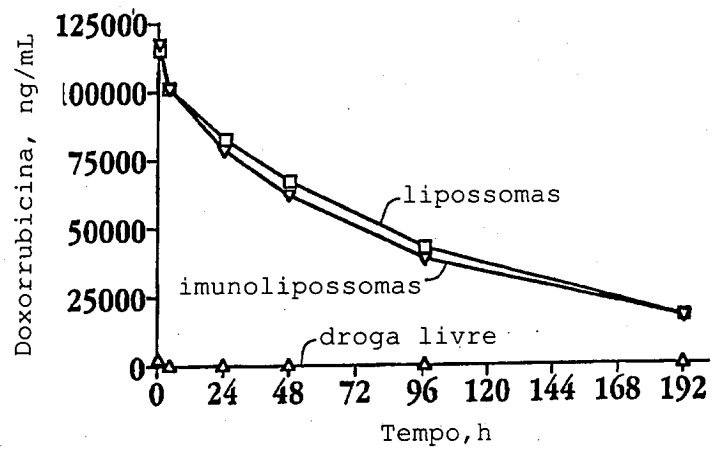


Fig. 14B

**Fig. 15A**

**Fig. 15B**

**Fig. 15C**

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÃO DE IMUNOLIPOSSOMA PARA DIRECIONAMENTO A UM RECEPTOR CELULAR HER2"**.

5 A presente invenção refere-se a uma composição de imunolipossoma compreendida de lipossomas carregando um ligante para direcionamento a células expressando um receptor de fator de crescimento, tal como HER2, é descrita. Ligação do imunolipossoma a células expressando HER2 resulta em internalização do imunolipossoma para aplicação citoplásmica de um fármaco capturado.