

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 064**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05738885 .2**
96 Fecha de presentación: **22.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1744764**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

54 Título: **Formulaciones liposomales de agentes de antraciclina y análogos de citidina**

30 Prioridad:
22.04.2004 US 565210 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.10.2012

73 Titular/es:
**CELATOR PHARMACEUTICALS, INC.
303B COLLEGE ROAD EAST
PRINCETON, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:
**MAYER, Lawrence;
JOHNSTONE, Sharon y
HARASYM, Troy**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 388 064 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones liposomales de agentes de antraciclina y análogos de citidina

Campo técnico

5 La invención se refiere a composiciones para mejorar la liberación de combinaciones de agentes terapéuticos. Más particularmente, la invención se refiere a sistemas de liberación que proporcionan combinaciones del agente de antraciclina daunorubicina y el análogo de citidina citarabina.

Técnica antecedente

10 La progresión de muchas enfermedades que ponen en peligro la vida tales como cáncer, SIDA, enfermedades infecciosas, trastornos inmunes y trastornos cardiovasculares está influenciada por múltiples mecanismos moleculares. Debido a esta complejidad, la obtención de curaciones con un solo agente se ha encontrado con un éxito limitado. De esta manera, con frecuencia se han usado combinaciones de agentes para combatir la enfermedad, particularmente en el tratamiento de cánceres. Parece ser que hay una fuerte correlación entre el número de agentes administrados y las tasas de la curación para cánceres tales como la leucemia linfocítica aguda y el cáncer colorrectal metastásico (Frei, et al., Clin. Cancer Res. (1998) 4: 2027-2037; Fisher, M. D.; Clin Colorectal Cancer (2001) Aug; 1(2): 85-6).

15 Los antibióticos de antraciclina tales como daunorubicina, doxorubicina, epirubicina y sus derivados comprenden agentes antineoplásicos conocidos. Principalmente se emplean fármacos basados en daunorubicina, tales como clorhidrato de daunorubicina, porque se intercalan con el ADN, influyendo en diversas funciones del ADN, incluyendo la síntesis de ADN y ARN. Presentan actividad contra la leucemia linfocítica aguda, la leucemia granulocítica aguda, la leucemia mielocítica aguda, la fase aguda de la leucemia mielocítica crónica y la leucemia no linfocítica aguda. Se ha demostrado que la doxorubicina es eficaz en el tratamiento de leucemias agudas, linfomas malignos y tumores sólidos seleccionados tales como tumores de cáncer de mama. La idarubicina presenta una actividad similar a estos antimetabolitos y se ha usado junto con citarabina para la leucemia mielocítica aguda (LMA) de cariotipo adverso. Giles, F.J., et al., J. Clin. Oncol. (2003) 21(9): 1722-7.

25 Los análogos de citidina, incluyendo tres ejemplos de dichos análogos citarabina, 5-Azacitidina y gemcitabina, son agentes antineoplásicos conocidos. Por ejemplo, estos compuestos han demostrado eficacia para inhibir la síntesis de ADN en leucemia y células cancerosas. Estas propiedades han permitido que estos compuestos traten eficazmente la leucemia mielocítica aguda, la leucemia linfoblástica aguda y síndromes mielodisplásicos, cáncer pancreático y cáncer de pulmón.

30 El documento US 2004/0052864 analiza la administración de un inhibidor de la metilación de ADN no encapsulado y un agente antineoplásico no encapsulado, de forma individual o en un cóctel de fármacos libres, para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular anormal. Sin embargo, en esta publicación no se sugirieron preparaciones farmacéuticas diseñadas para controlar la liberación o las semividas de los fármacos.

35 De forma similar, la Patente de Estados Unidos Nº 5.736.155 analiza la preparación de agentes neoplásicos encapsulados en liposomas. Se contempla que los agentes antineoplásicos individuales y múltiples se administran de forma simultánea o secuencial, sin embargo, no se sugirió la combinación de un antibiótico de antraciclina junto con un análogo de citidina.

40 El documento US 2003/0147945 desvela composiciones que comprenden vehículos de liberación que tienen asociadas de forma estable con los mismos combinaciones no antagonistas de dos o más agentes que, según se indica, son útiles para conseguir efectos no antagonistas cuando se administran las combinaciones de fármacos.

45 Hay varios inconvenientes que limitan el uso terapéutico de cócteles de fármacos. Por ejemplo, la administración de cócteles de fármacos libres con frecuencia da como resultado una eliminación rápida de uno o todos los fármacos antes de alcanzar el sitio del tumor. Por esta razón, muchos fármacos se han incorporado en vehículos de liberación diseñados para "protegerlos" de mecanismos que de otra manera darían como resultado su eliminación del torrente sanguíneo. Es bien sabido que los liposomas tienen la capacidad de proporcionar este efecto "protector" y, por lo tanto, pueden prolongar la semivida de agentes terapéuticos. Sin embargo, la formulación de fármacos específicos o más de un fármaco en vehículos de liberación ha resultado ser difícil porque la composición de lípidos del vehículo con frecuencia afecta de forma diferente a la farmacocinética de los fármacos individuales. Por lo tanto, una composición que es adecuada para la retención y liberación de un fármaco puede no ser adecuada para la retención y liberación de un segundo fármaco.

55 Los investigadores de la presente invención han identificado formulaciones de vehículos de liberación particulares necesarias para acomodar una combinación de una antraciclina y un análogo de citidina (particularmente, daunorubicina y citarabina), que dan como resultado una retención superior de los fármacos y una liberación sostenida de fármaco de cada agente. Además, han demostrado que pueden mantenerse satisfactoriamente relaciones sinérgicas de estos fármacos, cuando se encapsulan en liposomas, en el compartimento sanguíneo a lo largo del tiempo, dando como resultado una mayor eficacia en comparación con el cóctel de fármacos libres y los

fármacos individuales en liposomas.

Divulgación de la invención

5 La invención se refiere a composiciones para administrar cantidades eficaces de combinaciones de fármacos de antraciclina y análogo de citidina (es decir, daunorubicina con citarabina) usando vehículos de liberación liposomales que tienen asociados de forma estable con los mismos al menos uno de dichos agentes de antraciclina y uno de dichos fármacos basados en análogo de citidina. Estas composiciones permiten que dichos dos o más agentes se liberen en el sitio de enfermedad de una forma coordinada, asegurando de esta manera que los agentes estén presentes en el sitio de enfermedad en una relación deseada. Este resultado se conseguirá tanto si los agentes se co-encapsulan en un vehículo de liberación basado en lípidos, como si se encapsulan en vehículos de liberación basados en lípidos separados administrados de tal forma que se mantengan relaciones deseadas en el sitio de enfermedad. La farmacocinética (PK) de la composición se controla por los propios vehículos de liberación basados en lípidos de tal forma que se consigue una liberación coordinada (siempre que las PK de los sistemas de liberación sean comparables).

15 De esta manera, en un aspecto, la invención proporciona una composición de liposomas para administración parenteral que comprende daunorubicina y citarabina asociadas con los liposomas en una relación no antagonista terapéuticamente eficaz como se define en la reivindicación 1. La relación no antagonista terapéuticamente eficaz de los agentes se determina evaluando la actividad o los efectos biológicos de los agentes en cultivos celulares relevantes o sistemas sin células, así como en homogeneizados de tumor procedentes de biopsias de pacientes individuales, en un intervalo de concentraciones. Puede usarse cualquier método que dé como resultado la determinación de una relación de agentes que mantenga un efecto terapéutico deseado.

20 La composición comprende al menos una de las antraciclinas mencionadas anteriormente y uno de los agentes de citidina mencionados anteriormente en una relación molar entre la antraciclina y el agente de citidina que presenta un efecto biológico deseado en las células relevantes en cultivo, sistemas sin células u homogeneizados de tumor. La relación es la relación a la que los agentes son no antagonistas. Por células "relevantes", los solicitantes se refieren a al menos un cultivo celular o línea celular que es apropiada para el ensayo del efecto biológico deseado. Cuando estos agentes se usan como agentes antineoplásicos, las células "relevantes" son las de líneas celulares identificadas por el Programa de Desarrollo Terapéutico (DTP) del Instituto Nacional del Cáncer (NCI)/Institutos Nacionales de la Salud (NIH) como útiles en su programa de descubrimiento de fármacos anticancerosos. Actualmente, la investigación del DTP utiliza 60 líneas de células tumorales humanas diferentes. Sería necesario demostrar la actividad deseada al menos en una de dichas líneas celulares. Por "homogeneizado de tumor", el solicitante se refiere a células generadas por la homogeneización de biopsias o tumores del paciente. La extracción de tumores enteros o biopsias de tumor puede conseguirse mediante técnicas médicas convencionales por un médico cualificado y la homogeneización del tejido en células individuales puede realizarse en el laboratorio usando varios métodos bien conocidos en la técnica.

35 En el presente documento también se describe un método para liberar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de daunorubicina:citarabina en una diana deseada mediante la administración de las composiciones de la invención.

40 También se describe en el presente documento un método para liberar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de antraciclina:análogo de citidina mediante la administración de una antraciclina asociada de forma estable con un primer vehículo de liberación y un análogo de citidina asociado de forma estable con un segundo vehículo de liberación. El primer y segundo vehículos de liberación pueden estar contenidos en viales separados, administrándose los contenidos de los viales a un paciente de forma simultánea o secuencial. En un aspecto, la relación entre la antraciclina y el análogo de citidina es no antagonista.

45 También se describe en el presente documento un método para preparar una composición terapéutica que comprende liposomas que contienen una relación de al menos una antraciclina y un análogo de citidina que proporciona un efecto terapéutico deseado, comprendiendo dicho método proporcionar un panel de al menos una antraciclina y un análogo de citidina, donde el panel comprende al menos una, pero preferiblemente una multiplicidad de relaciones de dichos fármacos, ensayar la capacidad de los miembros del panel para ejercer un efecto biológico en un cultivo celular relevante, sistema sin células u homogeneizado de tumor sobre un intervalo de concentraciones, seleccionar un miembro del panel en el que la relación proporcione un efecto terapéutico deseado en dicho cultivo celular, sistema sin células u homogeneizado de tumor sobre un intervalo de concentraciones adecuado; y asociar de forma estable la relación de fármacos representada por el miembro satisfactorio del panel en vehículos de liberación de fármaco basados en lípidos. El efecto terapéutico deseado mencionado anteriormente es no antagonista.

55 Como se describe adicionalmente más adelante, para diseñar una combinación apropiada de acuerdo con el método descrito anteriormente, las relaciones no antagonistas se seleccionan como las que tienen un índice de combinación (CI) $\leq 1,1$. Se diseñan formulaciones liposomales adecuadas de tal forma que incorporen de forma estable una cantidad eficaz de una combinación de antraciclina:análogo de citidina (es decir, daunorubicina:citarabina) y permitan la liberación sostenida de los dos fármacos *in vivo*. Las formulaciones preferidas contienen al menos un

lípidio cargado negativamente, tal como fosfatidilglicerol.

Breve descripción de los dibujos

5 La FIGURA 1A es un gráfico que muestra el índice de combinación (IC) representado en función de la fracción de células de leucemia linfocítica murina P388 afectadas (f_a) por combinaciones de daunorubicina:citarabina (o Ara-C) a diversas relaciones molares: 10:1 (cuadrados), 5:1 (triángulos), 1:1 (círculos blancos), 1:5 (triángulos invertidos) y 1:10 (círculos rellenos).

La FIGURA 1B es un gráfico que muestra la combinación (IC) representada en función de la fracción de células de leucemia linfocítica murina L1210 afectadas (f_a) por combinaciones de daunorubicina:citarabina (o Ara-C) a diversas relaciones molares: 10:1 (cuadrados), 5:1 (triángulos), 1:1 (rombos), 1:5 (triángulos invertidos) y 1:10 (círculos).

10 La FIGURA 1C es un gráfico que muestra el IC frente a diversas relaciones molares de daunorubicina:citarabina (10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10) en células de leucemia linfocítica murina P388. Se comparan los valores de IC a concentraciones de fármaco suficientes para producir un 75% (DE75) y un 90% (DE90) de inhibición del crecimiento de células tumorales a las diferentes relaciones molares de daunorubicina:citarabina.

15 La FIGURA 1D es un gráfico que muestra el IC frente a diversas relaciones molares de daunorubicina:citarabina (10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10) en células de leucemia linfocítica murina L1210. Se comparan los valores de IC a concentraciones de fármaco suficientes para producir un 75% (DE75) y un 90% (DE90) de inhibición del crecimiento de células tumorales a las diferentes relaciones molares de daunorubicina:citarabina.

20 La FIGURA 2A es un gráfico que muestra las curvas de eliminación en plasma de daunorubicina y citarabina a diversos puntos de tiempo después de la administración intravenosa a ratones BDF-1 en liposomas de DSPC:DSPG:CHOL (relación molar 7:2:1).

25 La FIGURA 2B es un gráfico de la relación de daunorubicina:citarabina (mol:mol) en el plasma en función del tiempo después de la administración intravenosa de liposomas de DSPC:DSPG:CHOL (relación molar 7:2:1) con una carga dual de daunorubicina:citarabina (relación molar aproximadamente 1:5). Los puntos de datos representan las relaciones molares de daunorubicina:citarabina determinadas en plasma (+/desviación típica) en los puntos de tiempo especificados.

30 La FIGURA 3A es un gráfico que muestra la eficacia de daunorubicina:citarabina (relación molar aproximadamente 1:5) encerradas en liposomas co-cargadas en comparación con fármacos individuales encapsulados en liposomas y un cóctel de fármacos libres administrados por vía i.v. (Q3DX3) contra el modelo de leucemia linfocítica P388 en ratones. Los ratones se organizaron en grupos de tratamiento apropiados que consistían en grupos de control y tratamiento que incluían solución salina (círculos), daunorubicina liposomal (triángulos), citarabina liposomal (cuadrados), cóctel libre de daunorubicina:citarabina (9:600 mg/kg) (triángulos invertidos) y daunorubicina:citarabina co-cargadas en liposomas de DSPC:DSPG:Chol (7:2:1, mol:mol) que dan como resultado una relación molar final de daunorubicina:citarabina de aproximadamente 1:5 (rombos).

35 La FIGURA 3B es un gráfico que muestra la eficacia de daunorubicina:citarabina (relación molar aproximadamente 1:5) encerradas en liposomas co-cargadas en comparación con fármacos individuales encapsulados en liposomas y un cóctel libre administrado por vía i.v. (Q3DX3) contra el modelo de leucemia linfocítica L1210 en ratones. Los ratones se organizaron en grupos de tratamiento apropiados que consistían en grupos de control y tratamiento que incluían solución salina (círculos), daunorubicina liposomal (triángulos), citarabina liposomal (cuadrados), cóctel libre de daunorubicina:citarabina (12:30 mg/kg) (rombos blancos) y daunorubicina:citarabina co-cargadas en liposomas de DSPC:DSPG:Chol (7:2:1, mol:mol) que dan como resultado una relación molar final de daunorubicina:citarabina de aproximadamente 1:5 (rombos rellenos).

Modos de realizar la invención¹

¹Abreviaturas

DSPC: diestearioilfosfatidilcolina; PG:

45 fosfatidilglicerol; DSPG: diestearioilfosfatidilglicerol; PI: fosfatidilinositol; SM: esfingomielina; Chol o CH: colesterol; CHE: colesteril hexadecil éter;

VUP: vesícula unilamelar pequeña; VUG: vesícula unilamelar grande; VML: vesícula multilamelar;

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolio; EDTA: ácido etilendiaminatetraacético; HEPES:

50 ácido N-[2-hidroxietil]-piperazina-N-[2-etanosulfónico]; HBS: solución salina tamponada con HEPES (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4); SHE: sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, EDTA 30 mM; TEA: trietanolamina; IC: índice de combinación; f_a : fracción afectada.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos científicos o terminologías usadas en el presente documento tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados entendidos comúnmente se definen en el presente documento para proporcionar claridad y/o para facilitar su consulta, y no debe considerarse que la inclusión de dichas definiciones en el presente documento necesariamente represente una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende generalmente en la técnica. Muchas de las técnicas y procedimientos descritos o mencionados en el presente documento se entienden bien y se emplean comúnmente usando la metodología convencional por los expertos en la materia. Cuando es apropiado, generalmente se realizan procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles en el mercado de acuerdo con los protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante a menos que se indique otra cosa.

Como se usa en el presente documento, "un" o "una" significa "al menos uno (o una)" o "uno (o una) o más".

La invención proporciona composiciones que comprenden liposomas que encapsulan al menos un antibiótico de antraciclina (es decir, daunorubicina) y un agente análogo de citosina (es decir, citarabina), donde el antibiótico de antraciclina y el agente análogo de citosina están presentes en una relación molar de antibiótico de antraciclina: agente análogo de citosina (es decir, daunorubicina:citarabina) de aproximadamente 1:5.

La relación molar mencionada anteriormente de la antraciclina:análogo de citidina presenta un efecto no antagonista en células relevantes u homogeneizados de tumor.

En realizaciones adicionales de la invención, los vehículos de liberación basados en lípidos descritos anteriormente comprenden un tercer o cuarto agente. Puede incluirse cualquier agente terapéutico, de diagnóstico o cosmético.

Los vehículos de liberación basados en lípidos de la presente invención pueden usarse no sólo en administración parenteral, sino también para la liberación tópica, nasal, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, de aerosol u oral o mediante la aplicación del vehículo de liberación sobre o dentro de un dispositivo implantable natural o sintético en o cerca del sitio diana con fines terapéuticos o para la obtención de imágenes médicas y similares. Preferiblemente, los vehículos de liberación basados en lípidos de la invención se usan en administración parenteral, más preferiblemente, en administración intravenosa.

Análogos de citidina

Los antimetabolitos o, más particularmente, análogos de citidina tales como citarabina, 5-Azaciditina y gemcitabina (2',2'-Difluorodesoxiciditina) son agentes antineoplásicos conocidos. En la técnica también puede hacerse referencia a los análogos de citidina como análogos de nucleósido de citosina. Los antimetabolitos son compuestos que son suficientemente similares a un agente químico natural como participar en una reacción bioquímica normal en las células, pero suficientemente diferentes como para interferir con la división y las funciones normales de las células. Estos compuestos generalmente inhiben un proceso metabólico normal.

La citarabina es un antimetabolito nucleósido de pirimidina. Este compuesto es un análogo de 2'-desoxiciditina con el 2'-hidroxilo en posición *trans* con respecto al 3'-hidroxilo del azúcar. La citarabina se considera equivalente a la 4-amino-1-β-d-arabinofuranosil-2(1H)-pirimidinona, 1-β-d-arabinofuranosilcitosina, Ara-C, arabinósido de β-citosina, araciditina, CHX-3311, U-19920, Alexan, Arabitin, Aracytine, Cytarbel, Cytosar, Erpalfa, Iretan y Udiciil. En análogos de citidina tales como la citarabina, el resto de azúcar comprende una arabinosa en lugar de una ribosa. La citarabina se considera útil en la terapia de la leucemia mielocítica aguda (LMA) y ha demostrado eficacia en la remisión de este trastorno. Sin embargo, el mecanismo de acción de la citarabina no se conoce completamente, aunque la incorporación de esta nucleotidasa en el ADN conduce a una inhibición de la polimerización por terminación de la síntesis de la cadena.

La citarabina tiene que "activarse" mediante la conversión del nucleótido 5-monofosfato (AraCMP) para terminar la síntesis de la cadena. Después, AraCMP puede reaccionar con nucleótido quinasa seleccionadas para formar nucleótidos difosfato y trifosfato (AraCDP y AraCTP). La incorporación de citarabina en el ADN es específica de la fase S, de manera que se ha abogado por la dosificación durante al menos un ciclo celular completo para obtener la inhibición de la síntesis de ADN. La inhibición de la síntesis de ADN se produce a bajas concentraciones de AraCTP e inhibe el alargamiento de la cadena de ADN por incorporación de AraC en la parte terminal de una cadena de ADN en crecimiento. Además, parece haber una correlación entre la cantidad de AraC incorporada en la cadena y la inhibición de la síntesis de ADN.

Los sujetos pueden desarrollar resistencia a la citarabina. Dicha resistencia generalmente se debe a una deficiencia de desoxiciditina quinasa, que produce AraCMP. Además, ciertas enzimas degradativas tales como la citidina desaminasa (que desamina AraC produciendo arauridina no tóxica) y dCMP (que convierte AraCMP en AraUMP inactivo) también afectan a la eficacia.

Un inconveniente de la citarabina es su toxicidad. Este compuesto es un potente agente mielosupresor capaz de producir leucopenia severa, trombocitopenia y anemia con cambios megaloblásticos notables. También se han detectado alteraciones gastrointestinales, fiebre, conjuntivitis, neumonitis, disfunción hepática, dermatitis y efectos secundarios neurotóxicos, generalmente cuando se administran dosis elevadas.

La 5-Azacitidina (Azacitidina; 5-AzaC) es un compuesto que presenta actividad antineoplásica. Este compuesto se considera útil para el tratamiento de la LMA, leucemia linfoblástica aguda y síndromes mielodisplásicos. Ciertos estudios actuales están evaluando los efectos de este compuesto en la beta talasemia, leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásico, tumores sólidos avanzados o metastásicos, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de próstata. Se ha demostrado que la 5-AzaC inhibe la metilación del ADN, lo cual a su vez afecta a la expresión génica. Los efectos secundarios incluyen una reducción en el recuento de glóbulos blancos y rojos y de plaquetas, náuseas, vómitos, fatiga y diarrea, entre otros efectos.

La gemcitabina es un análogo de nucleósido que presenta actividad antitumoral. La gemcitabina HCl consiste en un monoclóhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) y se considera eficaz en el tratamiento del cáncer pancreático y el cáncer pulmonar. En general, la gemcitabina impide que las células fabriquen ADN y ARN al interferir con la síntesis de ácidos nucleicos. Esta acción detiene el crecimiento de las células cancerosas, haciendo que las células mueran. Los efectos secundarios incluyen reducción del recuento de glóbulos blancos y plaquetas, náuseas, vómitos, fatiga, diarrea, síntomas parecidos a la gripe, y exantemas, entre otros efectos.

Antibióticos de antraciclina

Los antibióticos de antraciclina tales como la daunorubicina y doxorubicina y sus derivados comprenden agentes antineoplásicos conocidos producidos por el hongo *Streptomyces peucetius*. La idarubicina (4-desmetoxidaunorubicina) comprende un derivado sintético de daunorubicina que carece del grupo metoxi en C4 del anillo de aglicona. Estos compuestos se intercalan con el ADN, afectando a diversas funciones del ADN, incluyendo la síntesis de ADN y ARN. La interacción con el ADN generalmente produce roturas de una sola cadena y/o las dos cadenas e intercambio de cromátidas hermanas. Se ha demostrado que una forma farmacéutica particular de daunorubicina (clorhidrato de daunorubicina) previene la división celular en dosis que no interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos. El mecanismo por el cual se realiza la escisión del ADN no se entiende completamente, pero se cree que está mediado por la acción de la topoisomerasa II o por la generación de radicales libres. Además, también se sabe que las antraciclinas interactúan con las membranas celulares y alteran sus funciones, lo cual puede intervenir en sus acciones antitumorales y en la cardiotoxicidad.

La daunorubicina (daunomicina, rubidomicina, leukaemomicina C, RP-13057, CERUBIDINE[®]) se considera útil en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda, leucemia granulocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, la fase aguda de la leucemia mielocítica crónica y la leucemia no linfocítica aguda. Además, se ha demostrado que este compuesto tiene alguna actividad en tumores sólidos y contra linfomas. La daunorubicina es un glicósido formado por una aglicona tetracíclica – daunomicinona, y un aminoazúcar - daunosamina. La absorción oral de la daunorubicina es baja, y la mayoría de las veces se administra por vía intravenosa. La semivida de distribución es de 45 minutos y necesita 19 horas para su eliminación. La daunorubicina se elimina mediante la conversión en una forma menos activa, daunorubicinol. La daunorubicina y sus derivados tienen ciertas toxicidades tales como depresión de médula ósea, estomatitis, alopecia, alteraciones gastrointestinales, disritmias cardíacas y edema pulmonar. El inconveniente reconocido más ampliamente de estas composiciones es el potencial de cardiomiopatía en formas agudas o crónicas, que puede convertirse rápidamente en una situación que pone en peligro la vida. La cardiotoxicidad, en particular, se manifiesta como insuficiencia cardíaca congestiva en el 15-40% de los pacientes sometidos a la terapia. En general, dichos efectos secundarios se deben a la dosificación utilizada, aumentando la aparición de estos efectos secundarios a las dosis superiores. Sin embargo, se ha reconocido que la administración concomitante de dexrazoxano (ADR-529) o amifostina (WR-2721 o WP-1065) reducirá la lesión cardíaca producida por estas composiciones. Además, hay indicios que sugieren que la lesión cardíaca durante la terapia con antraciclina puede reducirse mediante la administración simultánea de quelantes de hierro tales como agentes quelantes basados en dipiridoxilo y ácido aminopolicarboxílico, y sus quelatos metálicos. Véase la Patente de Estados Unidos N° 6.147.094.

La doxorubicina (adriamicina, rubrex, 12-naftacenodiona, 14-hidroxi-daunomicina, NSC-123127) difiere de la daunorubicina únicamente porque tiene un grupo hidroxiacetilo en lugar del grupo acetilo de la daunorubicina, en la posición 8. La doxorubicina ha resultado eficaz en el tratamiento de leucemias agudas, linfomas malignos y tumores sólidos seleccionados tales como tumores de cáncer de mama. Esta composición se ha utilizado junto con ciclofosfamida, vincristina y procarbazona en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin. Se han demostrado otras utilidades terapéuticas adicionales para sarcomas, mieloma de células plasmáticas, carcinoma de tiroides metastásico, carcinoma gástrico, carcinoma broncogénico, carcinoma de células de transición y carcinomas del ovario, endometrio, tiroides, testículos y cuello del útero. Las toxicidades de la doxorubicina son similares a las indicadas anteriormente para la daunorubicina. Se ha demostrado que análogos de doxorubicina, tales como epirubicina (4'-epidoxorubicina), derivados de morfolino y la antracenediona mitoxantrona relacionada, tienen menos toxicidad cardíaca con alta actividad clínica.

Determinación de relaciones de daunorubicina:citarabina no antagonistas *in vitro*

Los agentes de antraciclina y análogos de citidina mencionados anteriormente se encapsularán en liposomas en relaciones sinérgicas o aditivas (es decir, no antagonistas). La determinación de relaciones de agentes que presentan efectos de combinación sinérgicos o aditivos puede realizarse usando diversos algoritmos basados en los tipos de datos experimentales descritos más adelante. Estos métodos incluyen métodos de isobogramas (Loewe,

et al., *Arzneim-Forsch* (1953) 3:285-290; Steel, et al., *Int. J. Radiol. Oncol. Biol. Phys.* (1979) 5:27-55), el método de producto fraccional (Webb, *Enzyme and Metabolic Inhibitors* (1963) Vol. 1, pág. 1-5. New York: Academic Press), el método de simulación de Monte Carlo, CombiTool, ComboStat y el método de efecto mediana de Chou-Talalay basado en una ecuación descrita en Chou, *J. Theor. Biol.* (1976) 39:253-276; y Chou, *Mol. Phannacol.* (1974) 10:235-247). Las alternativas incluyen la fracción de supervivencia (Zoli, et al., *Int. J. Cancer* (1999) 80:413-416), la respuesta en porcentaje a unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos en comparación con los controles (Pannacciulli, et al., *Anticancer Res.* (1999) 19:409-412) y otras (Berenbaum, *Pharmacol. Rev.* (1989) 41:93-141; Greco, et al., *Pharmacol Rev.* (1995) 47:331-385).

Se prefiere el método de efecto mediana de Chou-Talalay. El análisis utiliza una ecuación en la que la dosis que produce un efecto particular, f_a , se proporciona por:

$$D = D_m [f_a / (1 - f_a)]^{1/m}$$

en la que D es la dosis del fármaco usado, f_a es la fracción de células afectadas por esa dosis, D_m es la dosis para el efecto mediana que significa la potencia y m es un coeficiente que representa la forma de la curva de dosis-efecto (m es 1 para reacciones de primer orden).

Esta ecuación puede manipularse adicionalmente para calcular un índice de combinación (IC) basándose en la ecuación de efecto de múltiples fármacos como se describe por Chou y Talalay, *Adv. Enzyme Reg.* (1984) 22:27-55; y por Chou, et al., en: *Synergism and Antagonism in Chemotherapy*, Chou and Rideout, eds., Academic Press: New York 1991:223-244. Se encuentra un programa informático (CalcuSyn) para este cálculo en Chou y Chou ("Dose-effect analysis with microcomputers: quantitation of ED50, LD50, synergism, antagonism, low-dose risk, receptor ligand binding and enzyme kinetics": *CalcuSyn Manual and Software*; Cambridge: Biosoft 1987).

La ecuación del índice de combinación se basa en la ecuación de efecto de múltiples fármacos de Chou-Talalay derivada de modelos cinéticos enzimáticos. Una ecuación determina únicamente el efecto aditivo en lugar de sinergia y antagonismo. Sin embargo, de acuerdo con el programa CalcuSyn, la sinergia se define como un efecto aditivo mayor que el esperado, y el antagonismo como un efecto aditivo menor que el esperado. Chou y Talalay en 1983 propusieron la designación de IC = 1 como efecto aditivo, de forma que a partir de la ecuación de efecto de múltiples fármacos de dos fármacos, podemos obtener:

$$IC = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 \text{ [Ec. 1]}$$

para fármacos mutuamente excluyentes que tienen modos de acción iguales o similares, y se propone además que

$$IC = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + ((D)_1 / (D)_2) / ((D_x)_1 / (D_x)_2) \text{ [Ec. 2]}$$

para fármacos mutuamente no excluyentes que tienen modos de acción totalmente independientes. $IC < 1$, $= 1$ y > 1 indica sinergia, efecto aditivo y antagonismo respectivamente. La ecuación 1 o la ecuación 2 dictan que el fármaco 1, $(D)_1$, y el fármaco 2, $(D)_2$, (en los numeradores) en combinación inhiben en un x % en el experimento real. De esta manera, la inhibición del x % observada experimentalmente puede no ser un número redondo, sino que la mayoría de las veces tiene una fracción decimal. $(D_x)_1$ y $(D_x)_2$ (en los denominadores) de las ecuaciones 1 y 2 son las dosis de fármaco 1 y fármaco 2 solos, respectivamente, que inhiben en un x %.

Por simplicidad, normalmente se supone exclusividad mutua cuando están implicados más de dos fármacos en combinaciones (*CalcuSyn Manual and Software*; Cambridge: Biosoft 1987).

Una combinación de dos fármacos puede usarse adicionalmente como una sola unidad farmacéutica para determinar interacciones sinérgicas o aditivas con un tercer agente. Además, una combinación de tres agentes puede usarse como una unidad para determinar interacciones no antagonistas con un cuarto agente, y así sucesivamente.

Los datos experimentales subyacentes generalmente se determinan *in vitro* usando células en cultivo o sistemas sin células. Preferiblemente, el índice de combinación (IC) se representa en función de la fracción de células afectadas (f_a) como se muestra en las Figuras 1A y 1B y, como se ha explicado anteriormente, es un parámetro sustituto del intervalo de concentraciones. Son combinaciones preferidas de agentes las que presentan sinergia o aditividad sobre un intervalo sustancial de valores de f_a . Se seleccionan combinaciones de agentes si son no antagonistas sobre al menos un 5% del intervalo de concentraciones en el que están afectadas más del 1% de las células, es decir, un intervalo de f_a mayor de 0,01. Preferiblemente, una porción mayor de la concentración total presenta un IC favorable; por ejemplo un 5% de un intervalo de f_a de 0,2-1,0. Más preferiblemente, el 10% de este intervalo presenta un IC favorable. Incluso más preferiblemente, se utiliza el 20% del intervalo de f_a , preferiblemente más del 50% y aún más preferiblemente más de al menos un 70% del intervalo de f_a de 0,2 a 1,0 en las composiciones. Las combinaciones que presentan sinergia sobre un intervalo sustancial de valores de f_a pueden reevaluarse en una diversidad de relaciones de agentes para definir la relación óptima para aumentar la fuerza de la interacción no antagonista y aumentar el intervalo de f_a sobre el cual se observa sinergia.

Aunque sería deseable tener sinergia en el intervalo entero de concentraciones en el cual están afectadas las

5 células, se ha observado que, en muchos casos, los resultados son considerablemente más fiables en un intervalo de f_a de 0,2-0,8 cuando se usa un método espectrofotométrico tal como el ensayo de MTT detallado en el Ejemplo 1. De esta manera, aunque se explica que la sinergia presentada por las combinaciones de la invención existe dentro del amplio intervalo de 0,01 o mayor, es preferible que la sinergia se establezca en el intervalo de f_a de 0,2-0,8. Sin embargo, pueden usarse otros ensayos más sensibles para evaluar la sinergia a valores de f_a mayores de 0,8, por ejemplo, ensayos de bioluminiscencia o clonogenicidad.

10 La relación de combinación óptima puede usarse adicionalmente como una sola unidad farmacéutica para determinar interacciones sinérgicas o aditivas con un tercer agente. Además puede usarse una combinación de tres agentes como una unidad para determinar las interacciones no antagonistas con un cuarto agente, y así sucesivamente.

Como se ha indicado anteriormente, los estudios *in vitro* en cultivos celulares se realizarán con células “relevantes”. La elección de las células dependerá del uso terapéutico deseado del agente. Una línea celular o tipo de cultivo celular relevante únicamente necesita presentar el efecto no antagonista requerido para proporcionar una base para que las composiciones entren dentro del alcance de la invención.

15 Por ejemplo, en una realización preferida de la invención, la combinación de agentes está destinada a una terapia anticancerosa. En otra realización, la combinación de agentes está destinada a una terapia de leucemia o linfoma. Entonces se realizarán elecciones apropiadas de las células a ensayar y la naturaleza del ensayo. En particular, las líneas de células tumorales son un material adecuado y la medición de la muerte celular o la estasis celular es un criterio de valoración apropiado. Como se analizará adicionalmente más adelante, en el contexto de intentar encontrar combinaciones no antagonistas adecuadas para otras indicaciones, podrían emplearse otras células diana y criterios distintos de la citotoxicidad o estasis celular.

20 Para determinaciones que implican agentes antitumorales, las líneas celulares pueden obtenerse a partir de depósitos de líneas celulares convencionales (NCI o ATCC, por ejemplo), procedentes de instituciones académicas u otras organizaciones incluyendo fuentes comerciales. Las líneas celulares preferidas incluirían una o más seleccionadas de líneas celulares identificadas por el Programa de Desarrollo Terapéutico del NCI/NIH. La investigación de líneas de células tumorales usada por este programa actualmente identifica 60 líneas de células tumorales diferentes que representan leucemia, melanoma y cánceres de pulmón, colon, cerebro, ovario, mama, próstata y riñón. El efecto no antagonista requerido sobre un intervalo de concentraciones deseado necesita mostrarse sólo en un tipo celular individual; sin embargo, se prefiere que presenten este efecto al menos dos líneas celulares, más preferiblemente tres líneas celulares, más preferiblemente cinco líneas celulares y más preferiblemente 10 líneas celulares. Las líneas celulares pueden ser líneas de células tumorales establecidas o cultivos primarios obtenidos a partir de muestras del paciente. Las líneas celulares pueden proceder de cualquier especie, pero la fuente preferida será un mamífero y, en particular, un ser humano. Las líneas celulares pueden alterarse genéticamente por selección en diversas condiciones de laboratorio y/o por la adición o deleción de material genético exógeno. Las líneas celulares pueden transfectarse por cualquier técnica de transferencia génica incluyendo, pero sin limitación, métodos de transfección basados en plásmidos o en virus. Las modificaciones pueden incluir la transferencia de ADNc que codifica la expresión de una proteína o péptido específico, un elemento regulador tal como una secuencia promotora o potenciadora o ADN o ARN antisentido. Las líneas celulares de cultivos de tejidos modificadas por ingeniería genética pueden incluir líneas con y sin genes supresores de tumores, es decir, genes tales como p53, pTEN y p16; y líneas creadas mediante el uso de métodos dominantes negativos, métodos de inserción de genes y otros métodos de selección. Las líneas celulares de cultivos de tejidos preferidas que pueden usarse para cuantificar la viabilidad celular, por ejemplo, para ensayar agentes antitumorales, incluyen, pero sin limitación P388, L1210, HL-60, MOLT-4, KBM-3, WeHi-3, H460, MCF-7, SF-268, HT29, HCT-116, LS180, B16-F10, A549, Capan-1, CAOV-3, IGROV1, PC-3, MX-1 y MDA-MB-231.

45 En un aspecto, el efecto proporcionado (f_a) se refiere a muerte celular o estasis celular después de la aplicación de un agente citotóxico a un cultivo celular. La muerte o viabilidad celular puede medirse, por ejemplo, usando los siguientes métodos:

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	REFERENCIA
Ensayo de MTT	Mosmann, J. Immunol. Methods (1983) 65(1-2):55-63.
Exclusión de colorante azul tripán	Bhuyan, et al., Experimental Cell Research (1976) 97:275-280.
Incorporación de tritio (^3H)-timidina radiactiva o ensayo de intercalación de ADN	Senik, et al., Int. J. Cancer (1975) 16(6):946-959.
Ensayo de liberación de cromo-51 radiactivo	Brunner, et al., Immunology (1968) 14:181-196.
Fuga de enzima glutamato piruvato transaminasa, creatina fosfoquinasa y lactato deshidrogenasa	Mitchell, et al., J. of Tissue Culture Methods (1980) 6 (3&4):113-116.

Captación de rojo neutro	Borenfreund and Puerner, Toxicol. Lett. (1985) 39: 119-124.
Actividad fosfatasa alcalina	Kyle, et al., J. Toxicol. Environ. Health (1983) 12:99-117.
Tinción con yoduro de propidio	Nieminen, et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. (1992) 115: 147-155.
Retención de bis-carboxietil-carboxifluoresceína (BCECF)	Kolber, et al., J. Immunol. Methods (1988) 108:255-264.
Potencial de membrana mitocondrial	Johnson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77: 990-994
Ensayos clonogénicos	Puck, et al., J. of Experimental Medicine (1956) 103: 273-283
Ensayo VIDA/MUERTE de Viabilidad/Citotoxicidad Ensayos de sulforodamina B (SRB)	Morris, Biotechniques (1990) 8:296-308. Rubinstein, et al., J. Natl. Cancer Inst. (1990) 82: 1113-1118

5 Las relaciones no antagonistas de dos o más agentes pueden determinarse para indicaciones de enfermedad distintas del cáncer y esta información puede usarse para preparar formulaciones terapéuticas de dos o más fármacos para el tratamiento de estas enfermedades. Con respecto a los ensayos *in vitro*, pueden seleccionarse muchos criterios de valoración medibles a partir de los cuales definir la sinergia de fármacos, siempre que estos criterios de valoración sean terapéuticamente relevantes para la enfermedad específica.

10 Como se ha indicado anteriormente, los estudios *in vitro* en cultivos celulares se realizarán con células "relevantes". La elección de las células dependerá del uso terapéutico deseado del agente. Los estudios *in vitro* en biopsias de pacientes individuales o tumores enteros pueden realizarse con un "homogeneizado del tumor", generado por homogeneización de la muestra o muestras del tumor en células individuales.

15 Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, el efecto proporcionado (f_a) puede referirse a la muerte celular o estasis celular después de la aplicación de un agente citotóxico a un cultivo celular "relevante" u "homogeneizado de tumor" (véase el Ejemplo 1). La muerte o viabilidad celular puede medirse usando varios métodos conocidos en la técnica.

15 Preparación de vehículos de liberación basados en lípidos

20 Los vehículos lipídicos para uso en esta invención son liposomas. Los liposomas pueden prepararse como se describe en Liposomes: Rational Design (A.S. Janoff, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY), o por técnicas adicionales conocidas por los expertos en la materia. Los liposomas adecuados para uso en esta invención incluyen vesículas unilamelares grandes (VUG), vesículas multilamelares (VML), vesículas unilamelares pequeñas (VUP) y liposomas de fusión por interdigitalización.

25 Los liposomas para uso en esta invención se preparan para contener un lípido de fosfatidilcolina, particularmente diestearilfosfatidilcolina (DSPC). Los liposomas de la invención también contienen un esteroles, particularmente colesterol. Los liposomas también pueden contener lípidos terapéuticos, incluyendo los ejemplos lípidos de éter, ácido fosfatídico, fosfonatos, ceramida y análogos de ceramida, esfingosina y análogos de esfingosina y lípidos que contienen serina.

30 También pueden prepararse liposomas con conjugados de polímero hidrófilo estabilizador de la superficie-lípido, tales como polietilenglicol-DSPE, para aumentar la longevidad en la circulación. Los liposomas para uso en la invención incorporan el lípido cargado negativamente diestearoil fosfatidilglicerol (DSPG) para aumentar la longevidad en la circulación del vehículo. Los liposomas para uso en la invención comprenden DSPC, DSPG y colesterol en una relación molar de aproximadamente 7:2:1.

35 En una realización, las composiciones de liposomas de acuerdo con esta invención preferiblemente se usan para tratar cánceres. La liberación de fármacos encapsulados en un sitio de tumor se consigue mediante la administración de liposomas de la invención. Preferiblemente, los liposomas tienen un diámetro menor de 300 nm. Más preferiblemente, los liposomas tienen un diámetro menor de 200 nm. El sistema vascular del tumor generalmente tiene más fugas que el sistema vascular normal debido a la presencia de fenestraciones o huecos en el endotelio. Esto permite que vehículos de liberación de 200 nm o menos de diámetro penetren en la capa de células endoteliales discontinua y la membrana basal subyacente que rodea a los vasos que suministran sangre a

un tumor. La acumulación selectiva de los vehículos de liberación en sitios de tumor después de la extravasación conduce a una mayor liberación de fármacos contra el cáncer y eficacia terapéutica.

Pueden utilizarse diversos métodos para encapsular agentes activos en liposomas. La "encapsulación" incluye la asociación covalente o no covalente de un agente con el vehículo de liberación basado en lípidos. Por ejemplo, esto puede realizarse por interacción del agente con la capa o capas externas del liposoma o la captura de un agente dentro del liposoma, consiguiéndose el equilibrio entre diferentes partes del liposoma. De esta manera, la encapsulación de un agente puede realizarse por asociación del agente por interacción con la bicapa de los liposomas por interacción covalente o no covalente con los componentes lipídicos o captura en el interior acuoso del liposoma, o en equilibrio entre la fase acuosa interna y la bicapa. "Carga" se refiere al hecho de encapsular uno o más agentes en un vehículo de liberación.

La encapsulación de la combinación deseada puede conseguirse mediante encapsulación en vehículos de liberación separados o dentro del mismo vehículo de liberación.

Las técnicas para la encapsulación dependen de la naturaleza de los vehículos de liberación. Por ejemplo, pueden cargarse agentes terapéuticos en liposomas usando métodos de carga tanto pasivos como activos. Los métodos pasivos de encapsulación de agentes activos en liposomas implican la encapsulación del agente durante la preparación de los liposomas. Esto incluye un método de captura pasivo descrito por Bangham, et al. (J. Mol. Biol. (1965) 12:238). Esta técnica da como resultado la formación de vesículas multilamelares (VML) que pueden convertirse en vesículas unilamelares grandes (VUG) o vesículas unilamelares pequeñas (VUP) tras la extrusión. Otro método adecuado de encapsulación pasiva incluye una técnica de inyección de éter descrita por Deamer y Bangham (Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629) y la técnica de Evaporación en Fase Inversa descrita por Szoka y Paphadjopoulos (P.N.A.S. (1978) 75:4194). Además, otro método adecuado de encapsulación pasiva implica equilibrio pasivo después de la formación de liposomas. Este proceso implica la incubación de liposomas reformados en condiciones alteradas o no ambientales (basadas en la temperatura, presión, etc.) y la adición de un agente terapéutico (por ejemplo, análogo de citidina o agente de antraciclina) al exterior de los liposomas. El agente terapéutico después se equilibra en el interior de los liposomas, a través de la membrana liposomal. Los liposomas después se devuelven a condiciones ambientales y se retira el agente terapéutico no encapsulado, si está presente, mediante diálisis u otro método adecuado.

Los métodos activos de encapsulación incluyen la técnica de carga en gradiente de pH descrita en las Patentes de Estados Unidos N° 5.616.341, 5.736.155 y 5.785.987 y la carga de metal activa. Un método de carga en gradiente de pH es el método de carga basado en citrato que utiliza citrato como tampón interno a un pH de 4,0 y un tampón exterior neutro. Otros métodos empleados para establecer y mantener un gradiente de pH a través de un liposoma implican el uso de un iónoforo que puede insertarse en la membrana de liposoma y transportar iones a través de las membranas en un intercambio con protones (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.837.282). También puede usarse una técnica reciente y preferida que utiliza metales de transición para dirigir la captación de fármacos en liposomas mediante formación de complejos en ausencia de un iónoforo. Esta técnica se basa en la formación de un complejo de fármaco-metal en lugar del establecimiento de un gradiente de pH para dirigir la captación de fármaco.

También pueden acoplarse métodos de captación pasivos y activos para preparar una formulación de liposomas que contiene más de un agente encapsulado.

Administración de composiciones de la invención *in vivo*

Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones de vehículo de administración de la presente invención pueden administrarse a animales de sangre caliente, incluyendo seres humanos, así como a especies de aves domésticas. Para el tratamiento de enfermedades humanas, un médico cualificado determinará cómo deben utilizarse las composiciones de la presente invención con respecto a la dosis, programa y vía de administración usando protocolos establecidos. Dichas aplicaciones también pueden utilizar el aumento de la dosis si los agentes encapsulados en las composiciones de vehículos de liberación de la presente invención presentan toxicidad reducida para tejidos sanos del sujeto.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por vía parenteral, es decir, por vía intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Más preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa o intraperitoneal por una inyección en embolada o de infusión. Por ejemplo, véase Rahman, et al., patente de Estados Unidos N° 3.993.754; Sears, patente de Estados Unidos N° 4.145.410; Papahadjopoulos, et al., patente de Estados Unidos N° 4.235.871; Schneider, patente de Estados Unidos N° 4.224.179; Lenk, et al., patente de Estados Unidos N° 4.522.803; y Fountain, et al., patente de Estados Unidos N° 4.588.578.

En otros métodos, las preparaciones farmacéuticas o cosméticas de la presente invención pueden ponerse en contacto con el tejido diana por aplicación directa de la preparación en el tejido. La aplicación puede realizarse por procedimientos tópicos "abiertos" o "cerrados". Por "tópico" se entiende la aplicación directa de la preparación multifármaco en un tejido expuesto al entorno, tal como la piel, orofaringe, canal auditivo externo y similares. Los procedimientos "abiertos" son los procedimientos que incluyen la incisión de la piel de un paciente y la visualización

directa del tejido subyacente en el que se aplican las preparaciones farmacéuticas. Esto se realiza, en general, por un procedimiento quirúrgico tal como una toracotomía para acceder a los pulmones, laparotomía abdominal para acceder a las vísceras abdominales, u otra estrategia quirúrgica directa para acceder al tejido diana. Los procedimientos "cerrados" son procedimientos invasivos en los que los tejidos diana internos no se visualizan directamente, sino que se accede a ellos mediante la inserción de instrumentos a través de pequeñas heridas en la piel. Por ejemplo, las preparaciones pueden administrarse en el peritoneo por un lavado con aguja. Como alternativa, las preparaciones pueden administrarse a través de dispositivos endoscópicos.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de liberación de la invención se preparan de acuerdo con técnicas convencionales y pueden comprender agua, agua tamponada, solución salina al 0,9%, glicina al 0,3%, dextrosa al 5%, soluciones de sacarosa iso-osmóticas y similares, incluyendo glicoproteínas para conseguir una mayor estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables necesarias para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico y similares. Además, la suspensión de vehículo de liberación puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen a los lípidos frente a las lesiones por radicales libres y peroxidativas de lípidos durante el almacenamiento. Son adecuados inactivadores de radicales libres lipófilos tales como alfa-tocoferol y quelantes específicos de hierro solubles en agua tales como ferrioxamina.

La concentración de vehículos de liberación en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, tal como de menos de aproximadamente un 0,05%, normalmente desde un 2-5%, o al menos aproximadamente dicho valor, hasta un 10-30% en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede aumentarse para reducir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Como alternativa, los vehículos de liberación compuestos de lípidos irritantes pueden diluirse a bajas concentraciones para reducir la inflamación en el sitio de administración. Para el diagnóstico, la cantidad de vehículos de liberación administrados dependerá del marcador particular usado, la patología que se esté diagnosticando y el criterio del médico.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por vía intravenosa. La dosificación para las formulaciones del vehículo de liberación dependerá de la relación entre fármaco y lípido y la opinión del médico a cargo de la administración basada en la edad, peso y estado del paciente.

Además de composiciones farmacéuticas, pueden prepararse formulaciones adecuadas para uso veterinario y administrarse de una manera adecuada para el sujeto. Los sujetos veterinarios preferidos incluyen especies de mamífero, por ejemplo, primates no humanos, perros, gatos, vacas, caballos, ovejas y aves domesticadas. Los sujetos también pueden incluir animales de laboratorio, por ejemplo, en particular, ratas, conejos, ratones y cobayas.

Kits

Los agentes terapéuticos de las composiciones de la invención pueden formularse por separado en composiciones individuales en las que cada agente terapéutico está asociado de forma estable con vehículos de liberación apropiados. Estas composiciones pueden administrarse por separado a sujetos siempre que la farmacocinética de los vehículos de liberación esté coordinada de forma que se mantenga la relación de agentes terapéuticos administrados en la diana para el tratamiento. De esta manera, es útil construir kits que incluyen, en recipientes separados, una primera composición que comprende vehículos de liberación asociados de forma estable con al menos un primer agente terapéutico y, en un segundo recipiente, una segunda composición que comprende vehículos de liberación asociados de forma estable con al menos un segundo agente terapéutico. Los recipientes después pueden envasarse en el kit.

El kit también incluirá instrucciones en cuanto al modo de administración de las composiciones en un sujeto, que incluyen al menos una descripción de la relación de cantidades de cada composición a administrar. Como alternativa, o además, el kit se construye de forma que las cantidades de composiciones en cada recipiente estén premedidas de forma que el contenido de un recipiente en combinación con el contenido del otro represente la relación correcta. Como alternativa, o además, los recipientes pueden marcarse con una escala de medición que permita la dispensación de cantidades apropiadas de acuerdo con la escala visible. En la administración pueden usarse los propios recipientes; por ejemplo, el kit podría contener las cantidades apropiadas de cada composición en jeringas separadas. Las formulaciones que comprenden la relación correcta pre-formulada de agentes terapéuticos también pueden envasarse de esta forma de manera que la formulación se administre directamente desde una jeringa pre-ensada en el kit.

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la invención mediante referencia a realizaciones específicas. Estos ejemplos, aunque ilustran ciertos aspectos específicos de la invención, no representan las limitaciones o circunscriben el alcance de la invención desvelada.

Ejemplos

Ejemplo 1

La sinergia de daunorubicina:citarabina *in vitro* es dependiente de la relación de fármacos

5 Muchas combinaciones de dos o más fármacos tienen la capacidad de presentar efectos sinérgicos. De forma similar, combinaciones de dos o más fármacos iguales también pueden mostrar interacciones aditivas o antagonistas. Para identificar relaciones de daunorubicina y citarabina (también conocida como Ara-C) que sean sinérgicas, se ensayaron diversas combinaciones de daunorubicina y citarabina con respecto a sus efectos citotóxicos *in vitro*. Más específicamente, se identificaron relaciones de fármacos que demuestran sinergia en un amplio intervalo de concentraciones de fármaco.

10 La medición de los efectos aditivos, sinérgicos o antagonistas se realizó usando relaciones molares de daunorubicina:citarabina (DN:Ara-C) de 10:1, 5:1, 1:1, 1:5 y 1:10 en células de leucemia linfocítica murina P388 y L1210. Se utilizó el protocolo de ensayo de citotoxicidad de MTT colorimétrico basado en tetrazolio convencional (Mosmann, et al., J. Immunol Methods (1983) 65(1-2):55-63) para determinar la lectura de la fracción de células afectadas. En resumen, las células viables reducen la sal de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para dar formazán azul que puede leerse espectrofotométricamente. Se someten células, tales como células de leucemia linfocítica murina P388 o L1210, a pases en ratones BDF-1 y se retiran, cuando sea necesario, y se transfieren a matraces de 75 cm² en medio de cultivo celular nuevo y se añaden a placas de cultivo celular de 96 pocillos a una concentración de 10.000 o 6.000 células P388 o L1210 por pocillo, respectivamente, en 100 µl por pocillo. Después, las células se dejan incubar durante 24 horas a 37 °C, con un 5% de CO₂ y >75% de humedad para promover la adhesión celular. Al día siguiente, se preparan diluciones de fármaco en serie en placas de cultivo de células de 12 pocillos. Los agentes, previamente preparados en diversas soluciones, se diluyen en medio de cultivo celular nuevo. Los agentes se administran a los pocillos apropiados para agentes individuales (20 µl) y a combinaciones específicas de agentes dobles de relación fija (incrementos de 20 µl). Los volúmenes totales de los pocillos se llevan a 200 µl con medio nuevo. La exposición al fármaco se realiza durante 72 horas.

25 Después de la exposición al fármaco, se añade reactivo MTT (1 mg/ml de solución salina tamponada con fosfato) a cada pocillo a un volumen de 50 µl por pocillo y se incuba durante 4 horas. Después se aspiran los contenidos de los pocillos y se añaden 150 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pocillo para romper las células y solubilizar el precipitado de formazán dentro de las células. Las placas de 96 pocillos se agitan en un agitador de placas durante un mínimo de 2 minutos, y se leen en un espectrofotómetro de microplacas ajustado a una longitud de onda de 570 nm. Se registran las lecturas de densidad óptica (DO) y los valores de DO de los pocillos blancos que contienen medio solo se restan de todos los pocillos que contienen células. La supervivencia celular después de la exposición a los agentes se obtiene como un porcentaje de las células de los pocillos de control no expuestas a fármaco. Todos los pocillos se realizan por triplicado y se calculan los valores medios.

35 Después se determinó un índice de combinación para cada dosis de daunorubina:citarabina usando Calculusyn que se basa en la teoría de análisis de dosis-efecto de Chou y Talalay, en la que se ha usado una "ecuación de efecto mediana" para calcular varias ecuaciones bioquímicas que se usan ampliamente en la técnica. Ciertas derivaciones de esta ecuación han dado lugar a ecuaciones de orden superior tales como las usadas para calcular el Índice de Combinación (IC). Como se ha mencionado anteriormente, el IC puede usarse para determinar si combinaciones de más de un fármaco y diversas relaciones de cada combinación son antagonistas ($IC > 1,1$), aditivas ($0,9 \leq IC \leq 1,1$) o sinérgicas ($IC < 0,9$). Los gráficos de IC típicamente se ilustran de manera que IC representa el eje y frente a la proporción de células afectadas, o fracción afectada (fa), en el eje x. Los datos de las Figuras 1A y 1B, representados como IC frente a la fracción de células de leucemia linfocítica murina P388 o L1210 afectadas (fa), respectivamente, ilustra que ciertas combinaciones de daunorubicina y citarabina particulares son antagonistas mientras que otras son sinérgicas o aditivas. A relaciones de daunorubicina:citarabina (DN:Ara-C) de 1:10, 1:5 y 1:1, se observa sinergia en células P388 a valores de fa de 0,75 y superiores (Figura 1A). Esto demuestra que una relación de 1:1, 1:10 y 1:5 es sinérgica a concentraciones suficientes para provocar una destrucción significativa de células tumorales. Las relaciones de 1:5 y 1:10 de daunorubicina:citarabina también son no antagonistas en células L1210 en intervalo adecuado de valores de fa (Figura 1B). Por el contrario, las relaciones de 5:1 y 10:1 de daunorubicina:citarabina son antagonistas en células P388 y L1210 en un amplio intervalo de valores de fa. La dependencia de IC de la relación de daunorubicina:citarabina también se presenta en las Figuras 1C y 1D, en las que se comparan los valores de IC a concentraciones de fármaco suficientes para producir una inhibición del crecimiento de células tumorales del 75% (DE75) y 90% (DE90) a las diferentes relaciones molares de daunorubicina:citarabina en células P388 y L1210. Basándose en estos resultados, se seleccionó una relación molar de daunorubicina:citarabina de 1:5 para la formulación en vehículos de liposomas de relaciones de fármacos fijas.

55 Ejemplo 2

La daunorubicina y la citarabina pueden cargarse de forma dual en liposomas

Pudieron generarse liposomas que contenían tanto daunorubicina como citarabina usando liposomas de DSPC/DSPG/Colesterol (relación molar 7:2:1) que contenían citarabina captada pasivamente que se cargaron de

forma activa con daunorubicina. En resumen, se prepararon espumas de lípidos disolviendo lípidos (DSPC:DSPG:CHOL (relación molar 7:2:1)) mezclados a una concentración de 100 mg/lípido/ml de concentración final en una mezcla de cloroformo:metanol:H₂O (95:4:1 vol/vol). El disolvente después se retiró por evaporación al vacío y las espumas de lípido resultantes se hidrataron con una solución que consistía en Cu(gluconato)₂ 100 mM, trietanolamina (TEA) 220 mM, pH 7,4 y citarabina a 50 mg/ml (203 mM) (que contenía ³H-citarabina como indicador) a 70 °C. Las VML resultantes se extruyeron 10 veces a 70 °C para generar vesículas unilamelares grandes. El diámetro medio de los liposomas resultantes se determinó por análisis QELS (dispersión cuasi-elástica de luz) y fue de aproximadamente 100 nm +/- 20 nm. Posteriormente, los liposomas se sometieron a intercambio de tampón en sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, EDTA 1 mM (SHE), pH 7,4, usando diálisis de flujo tangencial, retirando de esta manera cualquier citarabina y Cu(gluconato)₂/TEA no encapsulado. Las relaciones molares entre citarabina y lípidos se determinaron usando recuento de centelleo de líquidos para determinar la concentración de lípidos (¹⁴C-DPPC) y la concentración de citarabina (³H-Citarabina).

Se añadió daunorubicina a estos liposomas a una relación molar diana final de daunorubicina:citarabina de 1:5. La carga de daunorubicina en los liposomas se facilitó incubando las muestras a 50 °C durante 30 minutos. Después de la carga, la muestra se enfrió a temperatura ambiente. La eficacia de encapsulación de fármacos se evaluó después de la elución de los liposomas a través de una columna de centrifugación de sephadex G-50.

La eficacia de carga de daunorubicina se determinó usando absorbancia a 480 nm frente a una curva patrón. Se determinó la relación entre fármaco y lípidos en cada punto de tiempo usando absorbancia a 480 nm para la medición de daunorubicina y recuento de centelleo de líquidos para determinar las concentraciones de lípidos. La Tabla 1 muestra la relación media de daunorubicina/lípidos y la relación de citarabina/lípidos después de la encapsulación del fármaco y la retirada del fármaco libre. Por la Tabla 1 es evidente que la daunorubicina, añadida a una relación inicial entre daunorubicina y lípidos de 0,042:1, puede cargarse eficazmente en liposomas de DSPC/DSPG/Chol (relación molar 7:2:1), que contienen citarabina atrapada pasivamente a una relación entre fármaco y lípidos de 0,234.

Tabla 1: Daunorubicina:citarabina co-cargadas en liposomas de DSPC:DSPG:CHOL (7:2:1 mol:mol)

Daunorubicina; relación molar de lípidos	Citarabina; relación molar de lípidos	Relación daunorubicina:citarabina
0,0418+/-0,0041	0,234+/-0,0239	0,178+/-0,013

- Los datos representan la medida +/- desviación típica, n = 10

Ejemplo 3

Relaciones de mantenimiento de fármacos *in vivo*

Para determinar si la daunorubicina y la citarabina podrían mantenerse en la relación de fármaco:fármaco 1:5 en el intervalo sinérgico *in vivo*, se administraron liposomas de DSPC/DSPG/Chol (7:2:1 mol:mol), que contenían daunorubicina y citarabina encapsuladas por vía intravenosa a ratones y se supervisó a lo largo del tiempo la relación de fármaco/fármaco en plasma.

En resumen, se prepararon espumas de lípidos disolviendo una mezcla de lípidos (DSPC:DSPG:CHOL (relación molar 7:2:1)) a una concentración de 100 mg de lípido/ml de concentración final en una mezcla de cloroformo 2:metanol:H₂O (95:4:1 vol/vol). Después se retiró el disolvente por evaporación al vacío y las espumas de lípidos resultantes se hidrataron con una solución que consistía en Cu(gluconato)₂ 100 mM, trietanolamina (TEA) 220 mM, pH 7,4 y 50 mg/ml (203 mM) de citarabina (que contenía cantidades muy pequeñas de ³H-citarabina) a 70 °C. Las VML resultantes se extruyeron a 70 °C para generar vesículas unilamelares grandes. El diámetro medio de los liposomas resultantes se determinó por análisis QELS (dispersión cuasi-elástica de luz) y fue de aproximadamente 100 nm +/- 20 nm. Posteriormente, los liposomas se sometieron a intercambio de tampón en sacarosa a 300 mM, fosfato sódico 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4 y después en sacarosa a 300 mM, fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, usando diálisis de flujo tangencial, retirando de esta manera cualquier citarabina y Cu(gluconato)₂/TEA no encapsulado.

A estos liposomas se les añadió daunorubicina de tal forma que la relación molar final entre daunorubicina y citarabina fuera de aproximadamente 1:5. La carga de daunorubicina en los liposomas se facilitó incubando las muestras a 50 °C durante 30 minutos. Después de la carga, la muestra se enfrió a temperatura ambiente. La eficacia de encapsulación de fármaco se evaluó después de la elución de los liposomas a través de una columna de centrifugación de Sephadex G-50. Las relaciones entre citarabina y lípidos se determinaron usando recuento de centelleo de líquidos para determinar las concentraciones de lípidos (¹⁴C-DPPC) y las concentraciones de citarabina (³H-citarabina). La eficacia de carga de daunorubicina se midió usando absorbancia a 480 nm frente a una curva patrón. La relación entre fármacos y lípidos se determinó usando absorbancia a 480 nm para la medición de la daunorubicina y recuento de centelleo de líquidos para determinar las concentraciones de lípidos y citarabina.

La preparación después se inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola en ratones BDF-1. Las dosis de las formulaciones liposomales fueron 5 mg/kg de daunorubicina y 12,5 mg/kg de citarabina. En los puntos de tiempo indicados después de la administración intravenosa, se recogió sangre por punción cardiaca (3 ratones por punto de tiempo) y se puso en micro-recipientes revestidos de EDTA. Las muestras se centrifugaron para separar el plasma y el plasma se transfirió a otro tubo. Los niveles en plasma de daunorubicina y citarabina se cuantificaron con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La Figura 2A muestra las curvas de eliminación en plasma para daunorubicina y citarabina a diversos puntos de tiempo después de la administración intravenosa a ratones BDF-1 cuando se suministraron en los liposomas descritos anteriormente. Una hora después de la inyección i.v., la concentración de daunorubicina en plasma fue de 167 nmol/ml y se observó una concentración de 872 nmol de citarabina/ml de plasma. Cuatro horas después de la inyección, la concentración de daunorubicina fue de 143 nm/ml y la concentración de citarabina fue de 781 nmol/ml.

La Figura 2B muestra que los niveles en plasma de daunorubicina y citarabina se mantuvieron eficazmente en un intervalo sinérgico durante un periodo prolongado después de la administración intravenosa a ratones BDF-1 cuando los fármacos se suministraron simultáneamente en los liposomas descritos anteriormente. Los puntos de datos representan las relaciones molares de daunorubicina:citarabina determinadas en plasma (+/- desviación típica) a los puntos de tiempo especificados. Por lo tanto, los vehículos de liberación diseñados de forma apropiada tales como liposomas pueden liberar la relación deseada de daunorubicina y citarabina *in vivo*.

Ejemplo 4

La daunorubicina y la citarabina co-formuladas en liposomas a una relación sinérgica demuestran una eficacia antitumoral superior

Para maximizar la actividad terapéutica de combinaciones de fármacos y capturar los efectos sinérgicos beneficiosos observados *in vitro*, la combinación de fármacos necesita liberarse en el sitio del tumor a la relación fármaco:fármaco óptima. Se creó una formulación de liposomas individual que contenía los dos fármacos a relaciones fijas consideradas sinérgicas en cultivos de tejidos, que permitía la liberación de los fármacos coordinada *in vivo* como se ilustra en el ejemplo 3. La actividad antitumoral de esta formulación después se evaluó en modelos de leucemia linfocítica murina P388 y L1210.

Se prepararon liposomas de DSPC/DSPG/Chol (relación molar 7:2:1) co-encapsulados con daunorubicina y citarabina a una relación molar sinérgica de aproximadamente 1:5 como se describe en el Ejemplo 3.

Para realizar estudios de tumores en ratones, en los animales se inocularon 1×10^6 células tumorales P388 o L1210 que después se dejaron crecer durante 24 horas antes de iniciar el tratamiento. Los ratones se organizaron en grupos de tratamiento apropiados que consistían en grupos de control y de tratamiento que incluían solución salina, Daunorubicina liposomal, Citarabina liposomal, cóctel de fármacos libre y daunorubicina:citarabina co-cargadas en liposomas de DSPC:DSPG:Chol (7:2:1, mol:mol) que daban como resultado una relación molar de daunorubicina:citarabina final de aproximadamente 1:5. En los ratones se inyectó por vía intravenosa el volumen requerido de muestra para administrar la dosis prescrita a los animales basándose en los pesos individuales de los ratones los días 1, 4 y 7 después de las inoculaciones de las células tumorales. Los animales se pesaron y se supervisaron para comprobar la supervivencia y las observaciones en vida se recogen en el momento de medir el peso. La Figura 3 ilustra los resultados de estos experimentos.

Como indica la Figura 3A, se observó una actividad antitumoral significativamente mayor para la formulación de liposomas que contenía daunorubicina:citarabina co-cargadas a una relación molar de aproximadamente 1:5 en comparación con cada agente individual formulado individualmente en liposomas, así como el cóctel de fármacos libres administrado a su dosis máxima tolerada (DMT). El grupo de control de tampón tuvo un tiempo medio de supervivencia de 8 días. Los animales tratados con daunorubicina liposomal a una dosis de 5 mg/kg presentaron un tiempo medio de supervivencia de 16 días correspondiente a un aumento en el tiempo de supervivencia del 100%. Los ratones tratados con citarabina liposomal a 12,5 mg/kg presentaron un tiempo medio de supervivencia de 22 días correspondiente a un aumento en el tiempo de supervivencia del 175% y los ratones tratados con daunorubicina y citarabina co-cargadas a una relación molar de fármaco de aproximadamente 1:5 dentro de liposomas de DSPC:DSPG:Chol (7:2:1, mol:mol) presentaron un tiempo medio de supervivencia >60 días y un aumento en la duración de la vida >650% con 9/10 supervivientes a largo plazo. En comparación, los ratones tratados con la daunorubicina:citarabina como un cóctel de fármacos libre a su DMT (basada en la dosis máxima de los dos fármacos libres) no respondieron tan bien a la terapia antitumoral, como se refleja por el tiempo medio de supervivencia de 27 días y el aumento correspondiente de la duración de la vida del 237%.

De forma similar, como se observa en la Figura 3B, se consiguió una actividad antitumoral superior para la formulación de liposomas con daunorubicina y citarabina co-cargadas a una relación molar de aproximadamente 1:5 en comparación con el cóctel de fármacos libres correspondiente o cada fármaco cargado en un liposoma individualmente. El grupo de control de tampón tuvo un tiempo medio de supervivencia de 7 días. Los ratones tratados con daunorubicina encapsulada en liposomas o citarabina encapsulada en liposomas tuvieron un tiempo medio de supervivencia de 20 y 43,5 días, respectivamente. En comparación, los animales tratados con

daunorubicina y citarabina co-cargadas a una relación molar de aproximadamente 1:5 en liposomas de DSPC/DSPG/Chol (relación molar 7:2:1) presentaron un tiempo medio de supervivencia mayor de 60 días.

Estos resultados demuestran que fijando las relaciones sinérgicas de daunorubicina:citarabina al encapsularlas dentro de liposomas diseñados de manera apropiada, se puede mejorar espectacularmente la actividad antitumoral.

5 Los ejemplos anteriores se incluyen sólo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Son posibles muchas variaciones de lo descrito anteriormente. Como para los expertos en la materia serán evidentes modificaciones y variaciones de los ejemplos descritos anteriormente, se pretende que esta invención se limite únicamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 Las citas de las publicaciones o documentos anteriores no deben considerarse una admisión de que nada de lo anterior sea técnica anterior pertinente, ni constituye ninguna admisión en cuanto al contenido o fecha de estas publicaciones o documentos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición adecuada para administración parental en un sujeto, comprendiendo dicha composición daunorubicina y citarabina encapsuladas en liposomas, en una relación molar de daunorubicina:citarabina de aproximadamente 1:5, y
- 5 en la que los liposomas comprenden diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), diestearoilfosfatidil-glicerol (DSPG) y colesterol en una relación molar de aproximadamente 7:2:1.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que daunorubicina y citarabina están co-encapsuladas.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2 para uso en un método para tratar leucemia en un sujeto.
4. La composición de la reivindicación 3, en la que el sujeto es un ser humano.

FIGURA 1A

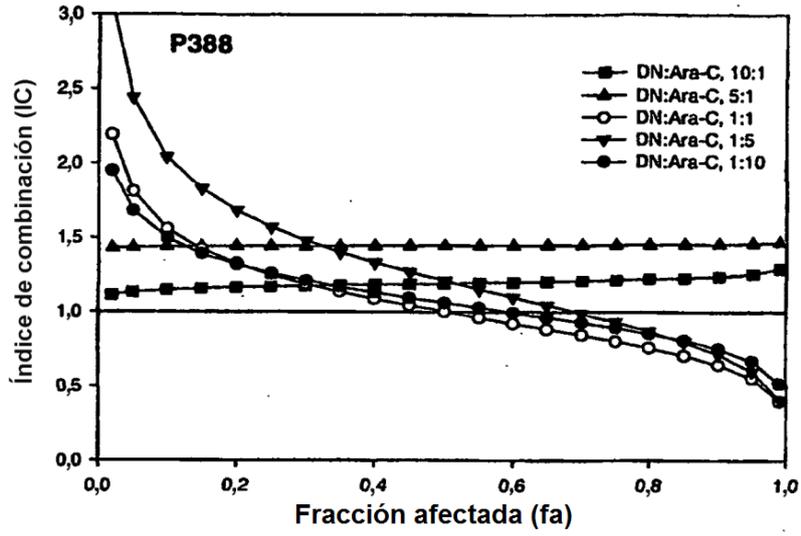


FIGURA 1B

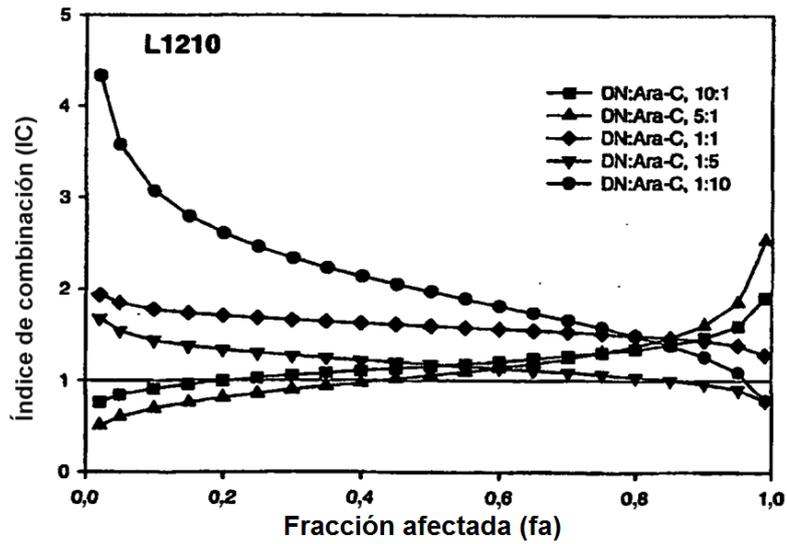


FIGURA 1C

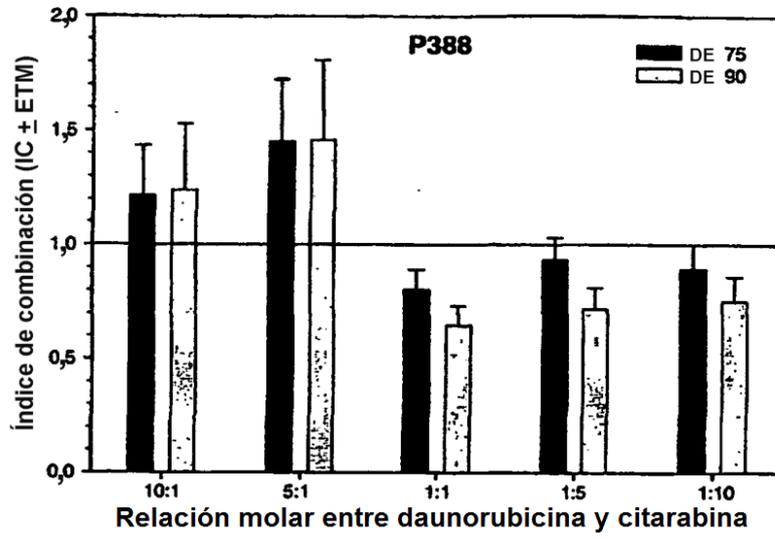


FIGURA 1D

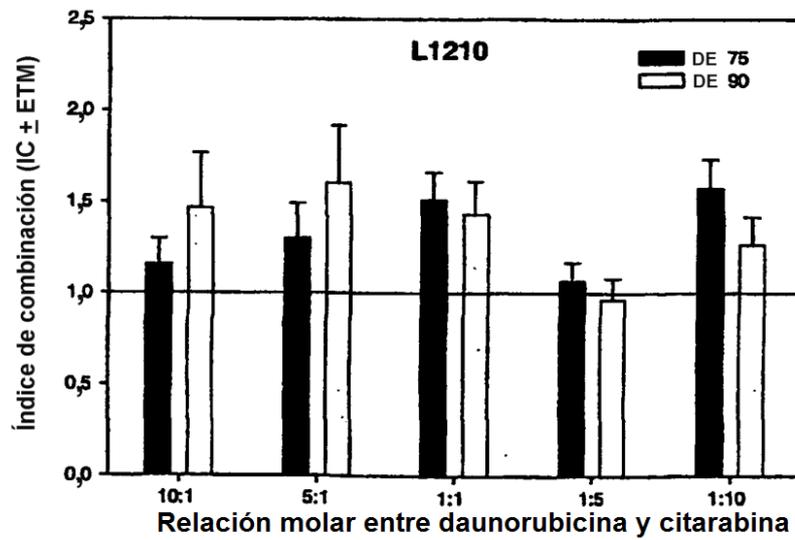


FIGURA 2A

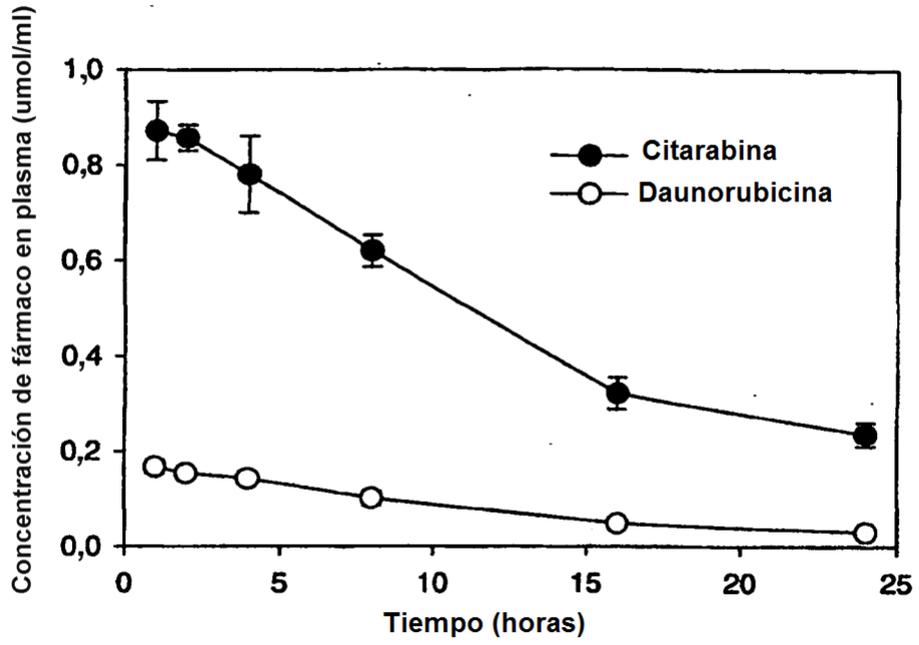


FIGURA 2B

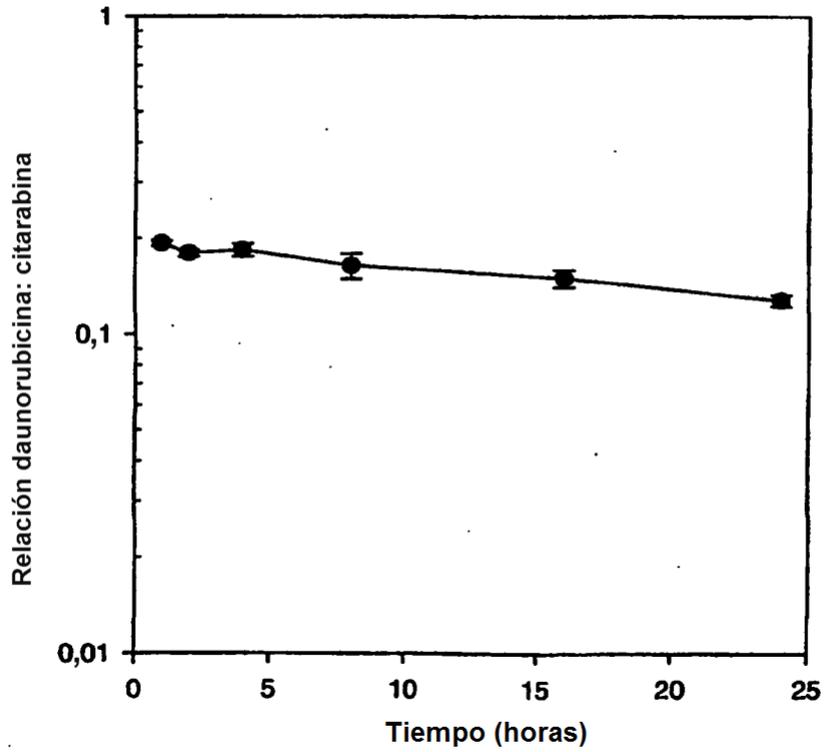


FIGURA 3A

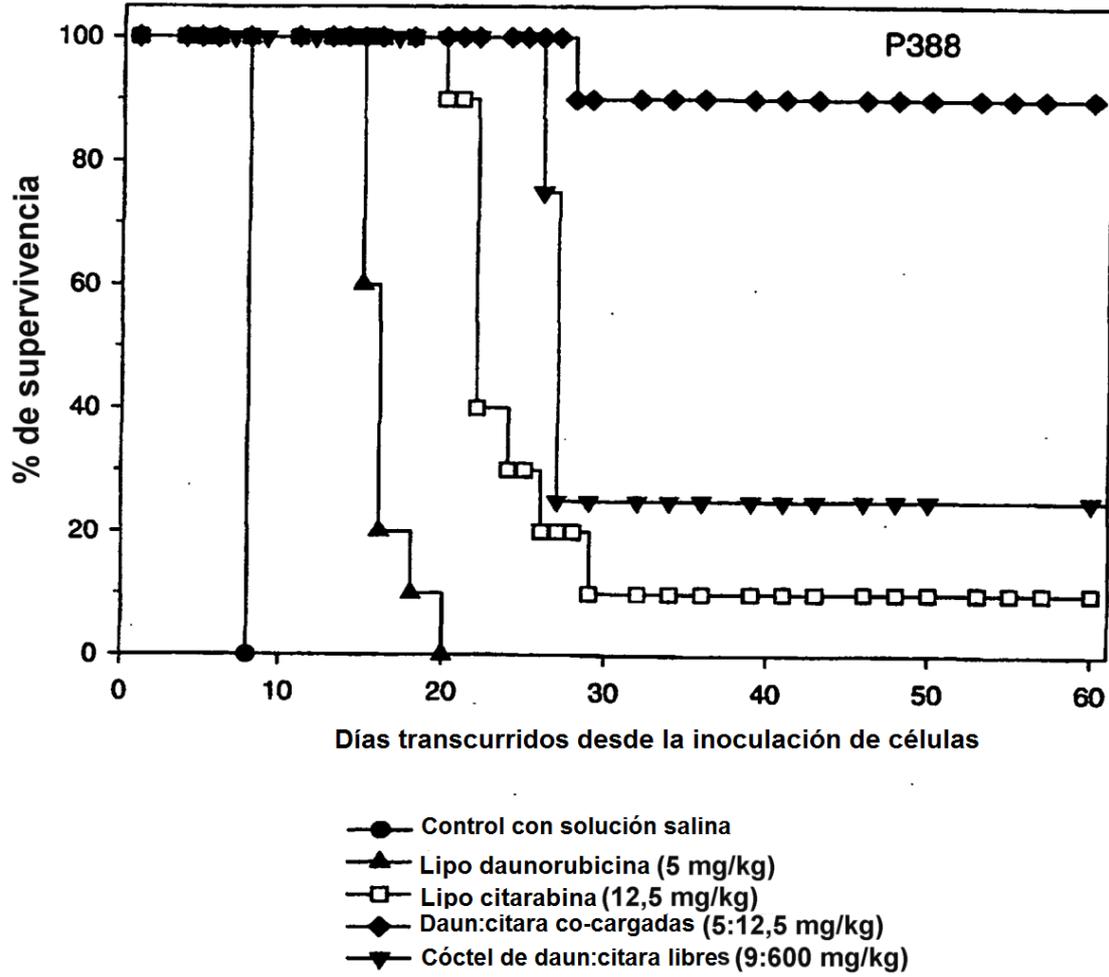


FIGURA 3B

