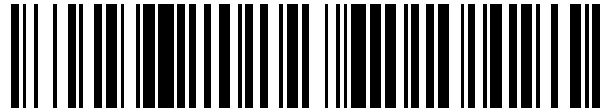


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 759**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008 E 08871849 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2187869**

54 Título: **Formulaciones farmacológicas de platino mejoradas**

30 Prioridad:

17.08.2007 US 965179 P

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

12.11.2015

73 Titular/es:

**CELATOR PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
303B COLLEGE ROAD EAST
PRINCETON, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**TARDI, PAUL;
JOHNSTONE, SHARON y
MAYER, LAWRENCE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 550 759 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 farmacológicas de platino mejoradas

5 Campo técnico

La invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa, en el que las composiciones proporcionan una encapsulación y liberación mejoradas de fármacos a base de platino. Más particularmente, la invención se refiere a sistemas de liberación de fármacos de platino que proporcionan una eficacia terapéutica superior y se combinan con eficacia con agentes terapéuticos adicionales para su uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

Técnica anterior

15 En los últimos años, los agentes terapéuticos basados en metales han desempeñado un papel importante en los tratamientos quimioterapéuticos. En particular, se está demostrando que los compuestos basados en platino son algunos de los fármacos antineoplásicos más eficaces usados en la práctica clínica. Los agentes de platino se usan principalmente porque forman aductos de ADN que bloquean la síntesis de ADN y ARN e inducen apoptosis. Cisplatino, carboplatino y oxaliplatino dominan el mercado mundial del cáncer con platino y se ha convertido en elementos cruciales en la práctica de atención convencional para numerosos tumores sólidos, incluidos los cánceres de ovarios, pulmón, colorrectal, testicular, vejiga urinaria, gástrico, melanoma y de cabeza y cuello. El oxaliplatino tiene un mecanismo de acción diferente al del cisplatino o el carboplatino y se ha demostrado que es especialmente importante en los tratamientos contra cánceres que han exhibido resistencia contra un tratamiento de primera línea con cisplatino o carboplatino.

25 Uno de los inconvenientes del uso de fármacos a base de platino es la toxicidad. Los efectos secundarios habituales incluyen daños renales y nerviosos, pérdida de audición high-end y náuseas y vómitos prolongados. El cisplatino, en particular, tiene una semivida muy corta en sangre, lo que tiene como resultado nefrotoxicidad aguda debido a la excreción del fármaco por los riñones. Debido a que el fármaco se elimina tan rápidamente, es necesaria la administración de dosis elevadas con el fin de lograr una actividad terapéutica. El aumento del índice terapéutico (aumento de la eficacia sin aumentar la toxicidad) de estos fármacos es una necesidad continua en el campo y todavía no se ha divulgado un método ideal.

35 En los últimos años, se han investigado los vehículos de liberación de fármacos por su capacidad para mejorar la vida de circulación del cisplatino con el fin de reducir la toxicidad y aumentar la eficacia. Lo ideal sería que tales sistemas vehículo permanezcan en la circulación durante largos períodos de tiempo, para como a acumularse en sitios de tumor y liberar gradualmente el fármaco a fin de ejercer sus efectos terapéuticos. Uno de los inconvenientes de los vehículos de liberación de platino actuales es que las formulaciones que están diseñadas para cargar cantidades suficientes de fármaco y circular durante un tiempo prolongado muestran poca actividad terapéutica. Se ha propuesto que la mala biodisponibilidad del fármaco a base de platino encapsulado es la razón de la menor actividad óptima. A este respecto, los vehículos de liberación que contienen fármaco se eliminan del cuerpo antes de liberar el fármaco de los liposomas en el sitio de la enfermedad. Otras formulaciones de liposomas liberan el fármaco rápidamente y muestran alguna actividad aún no óptima. Es probable en el presente documento que el fármaco liberado se elimine del cuerpo antes de que tenga tiempo suficiente para acumularse en el sitio de la enfermedad.

45 SPI-077 es una formulación liposómica pegilada de cisplatino hecha de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), diesteiril fosfatidiletanolamina-polietilenglicol (DSPE-PEG) y colesterol. En ensayos clínicos se ha estudiado extensamente como tratamiento para los cánceres de cabeza y cuello, de ovarios y de pulmón no microcítico (véanse las patentes de EE.UU. N° 5.945.122 y 6.126.966). La presencia del polímero de PEG hidrófilo recubriendo las superficies interior y exterior de los liposomas actúa potenciando la vida útil de circulación de estos vehículos evadiendo el aclaramiento mediante los macrófagos del sistema inmunológico. Aunque está diseñado para cargar cisplatino y acumularse en el sitio del tumor, los datos de fase II muestran que SPI-077 parece inferior al cisplatino convencional en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (Thatcher, et al. (1995) Ann Oncol 6:S83-S95). Los propios autores afirman que la actividad terapéutica mínima es probablemente debida a la "liberación insuficiente de cisplatino de los liposomas" (Meerum, et al. (2002) Cancer Chemother Pharmacol, 49:21 – 210); por tanto, aunque los liposomas pueden circular durante periodos prolongados de tiempo, el cisplatino no se libera de los liposomas y, en última instancia, se eliminan del cuerpo junto con los liposomas intactos.

60 Ensayos clínicos más recientes han investigado Lipoplatin™, una formulación de cisplatino en micelas hecha de complejos de cisplatino-dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) en al menos el 30% de etanol que están rodeadas por una bicapa lipídica compuesta por PC de soja, DSPE-metoxi-PEG y colesterol (véase la patente de EE.UU. 6.511.676). La presencia de DPPG, un lípido de carga negativa, actúa aumentando el atrapamiento del cisplatino y estimulando la conversión en su forma acuosa. El cisplatino tiene dos sitios de unión a ligando altamente reactivos que, cuando están en un entorno bajo en cloro de Lipoplatin™, formarán complejo con el lípido DPPG con carga negativa. De forma similar a SPI-077, estos liposomas están rodeados por un recubrimiento de PEG que actúa potenciando la vida en circulación del vehículo. Los datos clínicos que comparan Lipoplatin™ con cisplatino libre en

pacientes con cáncer de cabeza y cuello avanzado arrojan luz sobre el perfil farmacocinético de los fármacos en combinación con 5-FU (Jehn, et al. (2007) *Anticancer Res.*, Jan–Feb; 27(1A):471 – 5). Los autores indican que la formulación liposómica da lugar a "un mayor aclaramiento del cuerpo y semivida más corta que el cisplatino convencional" y que esto puede confirmar la observación clínica de menor toxicidad. La semivida terminal para este cisplatino liposomal fue de menos de la mitad que la del cisplatino libre y este aclaramiento más rápido podría conducir a una actividad terapéutica reducida.

Otros intentos para aumentar la actividad terapéutica del cisplatino incluyen la encapsulación en liposomas compuestos por fosfatidiletanolamina (PE) o fosfatidilcolina de huevo (EPC) (Hwang, et al (2007) *J. of Dermatological Science*; Apr., 46(1): 11 – 20). Aunque los liposomas PE encapsularon niveles altos de cisplatino, se cargó cisplatino insignificante en los liposomas EPC. Los autores informan de que la presencia de un solo par de electrones en el átomo de nitrógeno del grupo de cabeza de la etanolamina permite que el cisplatino hidratado forme un quelato y, por tanto, permanece encapsulado. No obstante, sugieren que la ausencia del par solitario de electrones en el grupo de cabeza de la colina puede dar lugar a una barrera estérica para bloquear la captación de cisplatino al interior de los liposomas. Los autores también informan de que los liposomas EPC cargados con cisplatino demostraron una citotoxicidad más débil contra los melanomas en comparación con el cisplatino libre.

La solicitud de patente PCR internacional de propiedad conjunta nº WO04/087105 divulga composiciones de liposomas capaces de liberar fármacos a base de platino coencapsulados con fluoropirimidinas a proporciones específicas. Aunque los liposomas pudieron mantener con éxito una proporción platino:fluoropirimidina sinérgica en la sangre, no se divulgaron composiciones que contenían un agente de platino individualmente. Los liposomas descritos se desarrollaron exclusivamente para hacer coincidir las velocidades de liberación de ambos tipos de fármacos y no se describió la optimización de la liberación y la eficacia terapéutica de los agentes individuales. Además, los liposomas dan a conocer en el documento WO04 / 087105 estaban compuestos por combinaciones de lípido formador de vesículas cargado y no se consideraron ni describieron "liposomas mezclados" de la presente invención que están diseñadas específicamente para mejorar el índice terapéutico de los agentes de platino.

El documento EP 0280492 A2 describe el uso de liposomas mezclados, por ejemplo en el Ejemplo 21, en el que los liposomas contienen diestearioilfosfatidilcolina (DSPC) y dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), de modo que en el interior de los liposomas hay cisplatino. Las membranas de los liposomas no contienen colesterol (Col) ni contienen fosfatidilglicerol (DPPG) o diestearioilfosfatidilglicerol (DSPG).

De un modo similar, el documento EP0225130 A2 también divulga liposomas mezclados que contienen DPPC y DSPC en los que está atrapado el cisplatino. De nuevo, las formulaciones de liposoma no contienen colesterol y DPPG o DSPG.

El documento WO2007/035783 A2 describe composiciones que comprenden liposomas que tienen la formulación DSPC/DPPC/DSPG/Col a una proporción molar de 35:35:20:10, en las que el cisplatino y un análogo de citidina, tal como gemcitabina, se cargan por separado en formulaciones de liposoma y se administran a modelos de células tumorales.

Aunque en la técnica se han notificado mejoras, no se ha divulgado una formulación ideal que equilibre con éxito la encapsulación de fármaco de platino y la liberación, así como una toxicidad reducida y una mayor eficacia. Los presentes inventores han identificado formulaciones de liposomas mezclados en las que la mezcla de lípidos de fosfatidilcolina formadoras de vesículas neutras tales como diestearioilfosfatidilcolina (DSPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (PDDC) tiene como resultado un equilibrio óptimo de las velocidades de encapsulación del fármaco de platino y la liberación del intermedio que conduce a un incremento significativo del índice terapéutico de estos fármacos.

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los principales obstáculos en las terapias con fármaco de platino es la toxicidad. Una complicación adicional a esta toxicidad es el hecho de que las combinaciones de fármacos se utilizan normalmente para tratar la enfermedad metastásica. Por lo tanto, la toxicidad limitante de la dosis de fármacos adicionales en la combinación puede actuar reduciendo la concentración de fármaco de platino permisible. Por esta razón, es necesario identificar formulaciones capaces de liberar fármacos a base de platino con agentes terapéuticos adicionales. De particular interés es la combinación de irinotecán o derivados de camptotecina con cisplatino.

Las combinaciones de irinotecán/cisplatino se han examinado ampliamente preclínicamente tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han observado pruebas de sinergia cuando los dos fármacos libres están expuestos simultáneamente a las células tumorales de pulmón humano en cultivo (Takada, et al, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* (1992) 33: 226 y Kano, et al, *Int. J. Cancer* (1992) 50: 604) y una mayor actividad antitumoral obtenida para la combinación en dos modelos de xenoinjerto de cáncer de pulmón humano fue sugestiva de sinergia *in vivo* (Kudoh, et al, *Jpn. J. Cancer Res.* (1993) 84:203.) De manera similar, la patente de EE.UU. Nº 6.545.010 muestra la sinergia de estos agentes no encapsulados en el tratamiento de ratones portadores de adenocarcinomas de colon. Se ha postulado la hipótesis de que estos dos fármacos pueden sinergizar en virtud de la inhibición por el irinotecán de la actividad de la topoisomerasa I que es necesaria para reparar las lesiones del ADN causadas por los aductos de ADN-cisplatino.

Más recientemente, los estudios *in vitro* en una línea de cáncer de pulmón no microcítico indicaron que la sinergia entre irinotecán y cisplatino era dependiente de la relación de los dos fármacos (véase la solicitud de patente de EE.UU. de propiedad conjunta 2003/0147945) y que esta relación de dependencia era se asociaba con alteraciones de la acumulación intracelular del fármaco (Zastre, et al , Cancer Chemother. Pharmacol. 2006 (Online First)). La solicitud de patente de EE.UU. 2003/0147945 trata la administración de combinaciones sinérgicas de cisplatino e irinotecán; sin embargo, no se describieron formulaciones de liposomas mezclados de la presente invención diseñadas para optimizar la actividad *in vivo* de cisplatino.

Se ha encontrado que la que liberación de relaciones sinérgicas fijadas de irinotecán:cisplatino utilizando nuevas formulaciones de liposomas mezclados de cisplatino de la presente invención podría mejorar significativamente el índice terapéutico de estos medicamentos combinados.

Divulgación de la invención

La invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa, en el que las composiciones aumentan el índice terapéutico de agentes terapéuticos basados en platino. Estas composiciones permiten una carga adecuada de fármaco, liberación del fármaco optimizada, toxicidad reducida y eficacia superior. Los vehículos de liberación basados en lípidos mezclados están comprendidos por una mezcla de lípidos de fosfatidilcolina con cadenas acilo de longitudes variables. Estas formulaciones tienen como resultado en un delicado equilibrio de la encapsulación y liberación de fármacos. Como se ve en el presente documento, la liberación de fármacos de platino intermedios permite una eficacia terapéutica mejorada y una toxicidad reducida.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa en un sujeto, en la que la composición comprende:

Liposomas que consisten en fosfatidilglicerol (DPPG) o diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG); colesterol (Col) y cantidades equimolares de diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) que encapsulan un fármaco a base de platino.

En combinación con una camptotecina hidrosoluble encapsulada en liposomas, en los que los liposomas que encapsulan el fármaco a base de platino consisten en DSPC:DPPC:DSPG:Col o DSPC:DPPC:DPPG:Col en una proporción molar 35:35:20:10.

Las composiciones permiten liberar el fármaco a base de platino y la camptotecina en el lugar de la enfermedad de un modo coordinado, suponiendo de este modo que los agentes estén presentes en el lugar de la enfermedad en una proporción deseada. Este resultado se alcanzara si los agentes están coencapsulados en los vehículos de liberación a base de lípidos mezclados especificados anteriormente o si están encapsulados por separado en vehículos de liberación (liposomas) a base de lípidos mezclados administrados de un modo tal que las proporciones deseadas se mantengan en el sitio de la enfermedad. Las farmacocinéticas (FC) de la composición están controladas por los propios vehículos de liberación a base de lípidos mezclados de forma que se consigue dicha liberación coordinada (siempre que las FC de los sistemas de liberación sean comparables).

En el presente documento se describe un método para liberar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación fármaco a base de platino/agente terapéutico en una diana deseada administrando las composiciones subyacentes a la invención.

En un aspecto, la composición de liposomas mezclados para administración parenteral comprende un fármaco a base de latino y una camptotecina hidrosoluble asociada con los liposomas en proporciones terapéuticamente eficaces que pueden ejercer un efecto deseado, preferentemente sinérgico. La relación terapéuticamente eficaz de los agentes se determina mediante la evaluación de la actividad biológica o los efectos de los agentes en el cultivo celular relevante o los sistemas libres de células, así como homogeneizados de células tumorales a partir de biopsias de pacientes individuales, en una serie de concentraciones. Se puede usar cualquier método que da lugar a la determinación de una proporción de agentes que mantiene un efecto terapéutico deseado. Por células "relevantes", los solicitantes se refieren a al menos un cultivo celular o línea celular que es adecuado para probar el efecto biológico deseado. Dado que estos agentes se usan como agentes antineoplásicos, las células "pertinentes" son las de las líneas de células identificadas por el Programa de Desarrollo Terapéutico (PDT) del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) / Institutos Nacionales de Salud (NIH), como útiles en su programa de descubrimiento de fármacos antineoplásicos. Actualmente el cribado de DTP utiliza 60 líneas celulares tumorales humanas diferentes. Sería necesario demostrar la actividad deseada en al menos una de dichas líneas celulares. Por "homogeneizado de células tumorales", el solicitante se refiere a las células generadas a partir de la rotura mecánica o química de biopsias o tumores de pacientes en muestras de células enteras. La extracción de tumores enteros o biopsias de tumores puede lograrse mediante técnicas médicas estándar por un médico cualificado y la homogeneización del tejido en células individuales, enteras puede llevarse a cabo en el laboratorio utilizando una serie de métodos bien conocidos en la técnica. Las combinaciones preferidas son irinotecán y cisplatino o irinotecán y carboplatino.

Un método para liberar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de fármaco de platino / agente terapéutico implica la administración de un fármaco a base de platino asociado de forma estable con un primer vehículo de liberación mezclado y un agente terapéutico adicional asociado de forma estable con un segundo vehículo de liberación. Los vehículos de liberación primero y segundo pueden estar contenidos en viales separados, administrándose el contenido de los viales se administran a un paciente simultánea o secuencialmente. En una realización, la proporción del fármaco a base de platino y el agente terapéutico administrados no es antagonista.

Como se describe más adelante, preferentemente, en el diseño de una combinación apropiada de acuerdo con el método descrito anteriormente, las proporciones no antagonistas se seleccionan como aquellas que tienen un índice de combinación (IC) de: $\leq 1,1$. La proporción no antagonista de los agentes se determina mediante la evaluación de la actividad biológica o los efectos de los agentes en el cultivo de células pertinente o sistemas libres de células en un intervalo de concentraciones y, en una realización, la aplicación de un algoritmo para determinar un "índice de combinación," (IC) en el que $IC < 1 =$ sinergia; $IC = 1 =$ aditividad e $IC > 1 =$ antagonismo. Como se describe más adelante, usando algoritmos reconocidos se puede calcular un índice de combinación se puede calcular en cada nivel de concentración. Preferentemente se selecciona proporciones en las que el IC representa sinergia o aditividad en una serie de concentraciones. Preferentemente, el IC es sinérgico en una amplia serie de concentraciones.

Las formulaciones liposomales mezclados están diseñadas de tal manera que incorporan de forma estable una cantidad eficaz de una combinación de fármaco de platino / agente terapéutico y permiten la liberación sostenida de ambos fármacos *in vivo*.

En un aspecto adicional, las composiciones proporcionan la administración de cantidades eficaces de combinaciones de camptotecina / cisplatino utilizando vehículos liposomales mezclados que se asocian de forma estable con al menos una camptotecina hidrosoluble y cisplatino. La composición comprende al menos una camptotecina hidrosoluble y cisplatino en una relación molar entre camptotecina hidrosoluble y cisplatino que exhibe un efecto biológico deseado, preferentemente sinérgico, en las células relevantes en cultivo o sistemas libres de células y homogeneizados de células tumorales. Preferentemente, la camptotecina hidrosoluble es irinotecán.

Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 es un gráfico que muestra la semivida de cisplatino frente a la eficacia (% de incremento en la vida útil, % ILS) de la formulación en varios liposomas mezclados de DSPC y / o DPPC.

La FIGURA 2 es un esquema que muestra la temperatura de fusión de transición y la dosis máxima tolerada de cisplatino o gemcitabina en varios liposomas mezclados de DSPC y / o DPPC.

La FIGURA 3 es un gráfico que compara la actividad de un cisplatino libre (círculos abiertos frente a cisplatino liposomal (triángulos rellenos) en liposomas de DSPC / DPPC / DSPG / colesterol (35: 35: 20: 10) o control de solución salina (círculos rellenos) administrados a ratones portadores de tumores de xenoinjerto de colon HCT 116 humanos.

La FIGURA 4A es un gráfico de la IC para irinotecán: cisplatino en diversas relaciones molares como una función de la fracción de células H460 humanas afectadas (f_a).

La FIGURA 4B es un gráfico de la IC para cisplatino:edelfosina en diversas relaciones molares como una función de la fracción de células H460 humanas afectadas (f_a).

La FIGURA 4C es un gráfico de la IC para cisplatino:daunorubicina en diversas relaciones molares como una función de la fracción de células H460 humanas afectadas (f_a).

La FIGURA 4D es un gráfico de la IC para cisplatino:topotecán a en diversas relaciones molares como una función de la fracción de células H460 humanas afectadas (f_a).

La FIGURA 5 es un gráfico de las concentraciones plasmáticas de irinotecán (círculos rellenos) y cisplatino (círculos abiertos) (nmoles/ml) como una función del tiempo tras la administración intravenosa en liposomas de DSPC/DPPC/DSPG/Col (35/35/20/10) mezclados separados cuando los fármacos se administran de forma simultánea en una proporción molar de irinotecán:cisplatino de 5:1.

La FIGURA 6A es un gráfico que compara la actividad de un cóctel de fármaco libre de irinotecán y cisplatino, (cuadrados rellenos), irinotecán y cisplatino coadministrados en una formulación de liposomas mezclados (triángulos rellenos) o control de solución salina (círculos rellenos) administrados a ratones portadores de tumores de xenoinjerto pancreáticos Capan-1. El irinotecán y el cisplatino se formularon por separado en liposomas de DSPC / DPPC / DSPG / colesterol (35/35/20/10) se combinaron y se coinyectaron en una relación molar de 5:1. Las flechas a lo largo del eje x indican el calendario de dosificación.

La FIGURA 6B es un gráfico que compara la actividad de un cóctel de fármaco libre de irinotecán y cisplatino, en dos calendarios de dosificación diferentes (triángulos rellenos y cuadrados abiertos), irinotecán y cisplatino coadministrados en una formulación de liposomas mezclados (triángulos abiertos) o control de solución salina (círculos rellenos) administrados a ratones portadores de tumores sólidos de xenoinjerto de cáncer de pulmón no microcítico H460. El irinotecán y el cisplatino se formularon por separado en liposomas de DSPC / DPPC / DSPG / colesterol (35/35/20/10) se combinaron y se coinyectaron en una relación molar de 7:1. Las flechas a lo largo del eje x indican el calendario de dosificación.

La FIGURA 7A es un gráfico que compara la actividad de cisplatino e irinotecán coadministrados en una formulación de liposomas mezclados (triángulos rellenos), irinotecán liposomal solo (cuadrados abiertos) o cisplatino liposomal solo (círculos abiertos), así como un control de solución salina (círculos rellenos)

administrados a ratones portadores de tumores sólidos de pulmón no microcítico humanos H460. El irinotecán y el cisplatino se formularon por separado en liposomas mezclados de DSPC / DPPC / DSPG / colesterol (35/35/20/10). Cuando se coinyectan, los fármacos se combinaron en una relación molar de 5: 1 de irinotecán:cisplatino. Las flechas a lo largo del eje x indican el calendario de dosificación.

La FIGURA 7B es un gráfico que compara la actividad de cisplatino e irinotecán coadministrados en una formulación de liposomas mezclados (triángulos rellenos), irinotecán liposomal solo (cuadrados abiertos) o cisplatino liposomal solo (círculos abiertos), así como un control de solución salina (círculos rellenos) administrados a ratones portadores de tumores sólidos de pulmón microcítico (CPMC) humanos H69. El irinotecán y el cisplatino se formularon por separado en liposomas mezclados de DSPC / DPPC / DSPG / colesterol (35/35/20/10). Cuando se coinyectan, los fármacos se combinaron en una relación molar de 7: 1 de irinotecán:cisplatino. Las flechas a lo largo del eje x indican el calendario de dosificación.

La FIGURA 7C es una tabla que resume el retraso en el crecimiento en porcentaje y los valores de log de destrucción celular (LCK) para irinotecán liposomal y cisplatino liposomal y coadministrados en una relación molar de 7:1 (CPX-571).

La FIGURA 8 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral (como el logaritmo de la destrucción celular) de irinotecán y cisplatino coadministrados en liposomas mezclados en una proporción sinérgica de 5: 1 y una proporción antagonista de 1: 2 a ratones portadores de tumores de xenoinjertos humanos de CPNMC H1299.

Modos de llevar a cabo la invención

Como se ha señalado anteriormente en el presente documento, las composiciones que subyacen a la invención comprenden vehículos de liberación basados en lípidos mezclados (liposomas) asociados de forma estable con un fármaco a base de platino y un agente terapéutico adicional (es decir, una camptotecina), en el que el fármaco a base de platino y el agente terapéutico adicional están presentes en relaciones molares del fármaco de platino / agente terapéutico que exhiben un efecto citotóxico, citostático o biológico deseado a las células pertinentes u homogeneizados de células tumorales. Preferentemente, el efecto citotóxico, citostático o biológico deseado no es antagonístico.

Los vehículos de liberación basados en lípidos mezclados son liposomas que consisten en una mezcla de DSPC, DPPC, DSPG o DPPG y colesterol en la relación molar 35: 35: 20: 10.

En una realización, las composiciones liposómicas mezcladas para su uso según la invención incluirán los liposomas descritos anteriormente asociados de forma estable con cisplatino o carboplatino e irinotecán, preferentemente, en una relación molar de cisplatino (o carboplatino): irinotecán que es no antagonista. La relación molar entre irinotecán y cisplatino puede ser superior a 4:1 o aproximadamente 1:4 o menos.

Las composiciones de vehículo de liberación basadas en lípidos mezclados descritos anteriormente pueden comprender un tercer o cuarto agente. Se puede incluir cualquier agente terapéutico, de diagnóstico o cosmético.

"Encapsulación", incluye la asociación covalente o no covalente de un agente con el vehículo de liberación basado en lípidos mezclados. Por ejemplo, esto puede ser mediante interacción del agente con la capa o capas externas del liposoma o atrapamiento de un agente dentro del liposoma, consiguiéndose el equilibrio entre diferentes porciones del liposoma. Por lo tanto la encapsulación de un agente puede ser por asociación del agente mediante la interacción con la bicapa de los liposomas mezclados a través de interacción covalente o no covalente con los componentes lipídicos o atrapamiento en el interior acuoso del liposoma, o en equilibrio entre la fase acuosa interna y la bicapa. "Carga" se refiere al acto de encapsular uno o más agentes en un vehículo de liberación.

Cuando se utilizan combinaciones de medicamentos, es importante que los agentes terapéuticos pueden "asociarse de forma estable" con los vehículos de liberación. Por "asociado de manera estable" se entiende que las composiciones son tales que cuando los agentes se liberan en una relación molar que es no antagonista, se mantiene una proporción no antagonista en la sangre de un sujeto durante al menos 1 hora después de la administración al sujeto. En algunas realizaciones, una proporción no antagonista se mantiene durante 4 horas o más, incluso durante 24 horas.

Por lo tanto, en las diversas realizaciones de la invención, cuando se emplea solamente un fármaco a base de platino, el fármaco se suministra en una composición de liposomas mezclados de la invención que encapsulan el fármaco a base de platino. En un aspecto adicional, el fármaco a base de platino y un agente farmacéutico adicional se pueden administrar juntos en una composición en una proporción no antagonista, en cuyo caso se necesita la asociación estable con los vehículos de liberación. En una realización, el fármaco a base de platino y el agente terapéutico adicional se encapsulan juntos en los liposomas mezclados de la invención. En otra realización, el fármaco a base de platino o el agente terapéutico adicional se asocia de forma estable con los liposomas mezclados de la invención y el otro miembro de la combinación se asocia de forma estable con un vehículo de liberación que tiene propiedades farmacocinéticas coordinadas con el fármaco contenido en los liposomas mezclados. El otro vehículo de liberación puede comprender liposomas, micelas, u otros vehículos de liberación y no se limita a los liposomas mezclados de la invención. Sin embargo, cuando se coadministra, cada agente contiene en sus propios

vehículos de liberación, la combinación debe mantener una proporción no antagonista en la sangre del sujeto durante al menos una hora o más.

Los vehículos de liberación basados en lípidos mezclados especificados anteriormente pueden usarse no solo en la administración parenteral, sino también en liberación tópica, nasal, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, aerosol u oral o mediante la aplicación del vehículo de liberación sobre o dentro de un dispositivo natural o sintético
5 dispositivo implantable en o cerca del sitio de destino con fines terapéuticos o de formación de imágenes médicas y similares. Preferentemente, los vehículos de liberación basados en lípidos mezclados especificados anteriormente de la invención se usan en la administración parenteral, lo más preferentemente, la administración intravenosa.

10 No se pretende que las formas de realización preferidas descritas en el presente documento sean exhaustivas o limiten el alcance de la invención a las formas exactas divulgadas. Se eligen y describen para explicar mejor los principios de la invención y su aplicación y uso práctico para permitir que otros expertos en la técnica comprendan sus enseñanzas

15 Preparación de vehículos de liberación a base de lípidos mezclados

Los vehículos de lípidos "mezclados" para su uso en las composiciones subyacentes a la presente invención son liposomas que consisten en fosfatidilglicerol (DPPG) o diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), colesterol, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), en el que la relación molar de
20 DSPC:DPPC:DSPG:Col o DSPC:DPPC:DPPG:Col es 35:35:20:10. De acuerdo con lo anterior, los "liposomas mezclados", "vehículos de liberación a base de lípidos mezclados" y "vehículos de lípidos mezclados" son liposomas que incluyen una mezcla de lípidos de fosfatidilcolina de varias longitudes de cadena acilo: una mezcla de cantidades equimolares de los lípidos de fosfatidilcolina, DSPC y DPPC. Los liposomas mezclados de la invención se pueden preparar como se describen en Liposomes: Rational Design (A.S. Janoff, ed.,

25 Marcel Dekker, Inc., New York, NY), o mediante técnicas adicionales conocidas para los expertos en la materia. Los liposomas adecuados para su uso en las composiciones subyacentes a la presente invención incluyen vesículas unilamelares grandes (VUG), vesículas multilamelares (VML), vesículas unilamelares pequeñas (VUP) y liposomas de fusión interdigitantes.

30 Como se ha señalado anteriormente en el presente documento, los liposomas mezclados de las composiciones que subyacen a la invención contienen también el esteroil, colesterol.

La incorporación del lípido cargado negativamente, fosfatidilglicerol (DPPG), a las formulaciones de liposomas aumenta la longevidad de circulación del vehículo. Las composiciones que subyacen a la presente invención pueden
35 hacer uso de liposomas mezclados bajos en colesterol que contienen DPPG para evitar la agregación, lo que aumenta el tiempo de residencia en sangre del vehículo.

En una realización, las composiciones de liposomas mezclados de acuerdo con la presente invención se usan preferentemente para tratar el cáncer, incluyendo cánceres resistentes a los fármacos tales como cánceres
40 resistentes al cisplatino. La liberación de fármacos encapsulados a un sitio del tumor se consigue mediante la administración de liposomas mezclados de la invención. Preferentemente, los liposomas mezclados tienen un diámetro de menos de 300 nm. Lo más preferentemente, los liposomas mezclados tienen un diámetro de menos de 200 nm. La vasculatura tumoral es generalmente más permeable que la vasculatura normal debido a fenestraciones o huecos en los endotelios. Esto permite que los vehículos de liberación de 200 nm o menos de diámetro penetren
45 en la capa discontinua de células endoteliales 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 los sitios tumorales tras la extravasación conduce a una mayor liberación de fármaco antineoplásico y eficacia terapéutica.

Se pueden usar varios métodos para encapsular agentes terapéuticos en liposomas mezclados.

50 La encapsulación de la combinación deseada puede lograrse a través de la encapsulación en los vehículos de liberación separados o dentro del mismo vehículo de liberación mezclado. Cuando se desea la encapsulación en liposomas separados, la composición lipídica de cada liposoma puede ser diferente para permitir la farmacocinética coordinada siempre y cuando al menos un agente de platino esté encapsulado en un liposoma mezclado. Mediante
55 la alteración de la composición de vehículo, las velocidades de liberación de los fármacos encapsulados pueden adaptarse para permitir la liberación de las relaciones deseadas de los fármacos en el sitio del tumor. Cuando están encapsulados en liposomas separados, las proporciones de los fármacos que se ha determinado para que proporcionen una actividad terapéutica no antagonista se pueden generar mediante la combinación de las cantidades apropiadas de cada fármaco encapsulado en liposomas antes de la administración. Alternativamente,
60 dos o más agentes pueden estar encapsulados dentro del misma liposoma mezclado.

Los agentes terapéuticos se pueden cargar en los liposomas mezclados utilizando métodos de carga tanto pasivos como activos. Los fármacos a base de platino, tal como el cisplatino, típicamente se cargan de forma pasiva. Los métodos pasivos de encapsulación de fármacos en liposomas con mayor frecuencia implican la encapsulación del
65 agente durante la preparación de los liposomas. Esto incluye un método de atrapamiento pasivo descrito en Bangham, et al. (J. Mol Biol. (1965) 12:238). Esta técnica da lugar a la formación de vesículas multilamelares (VML)

que se pueden convertir en vesículas unilamelares grandes (VUG) o vesículas unilamelares pequeñas (VUP) después de la extrusión. Los métodos adecuados adicionales de encapsulación pasiva incluyen una técnica de inyección de éter descrita por Deamer y Bangham (Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629) y la técnica de evaporación de fase inversa como se describe en Szoka y Papahadjopoulos (P.N.A.S. (1978) 75:4194). Los agentes tales como cisplatino también se pueden cargar de forma pasiva en liposomas preformados como se describe en los ejemplos.

Los métodos activos de encapsulación incluyen la técnica de carga por gradiente de pH descrita en las patentes de Estados Unidos N° 5.616.341, 5.736.155 y 5.785.987 y carga de metal activa. Los agentes de camptotecina normalmente se cargan de forma activa. Un método preferido de carga por gradiente de pH es el método de carga a base de citrato utilizando 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 implica el uso de un ionóforo que se puede insertar en la membrana del liposoma y transportar los iones a través de membranas a cambio de protones (véase la patente de EE.UU. 5.837.282) También se puede usar una técnica reciente que usa metales de transición para conducir la absorción de fármacos en los liposomas a través de la formación de complejos en ausencia de un ionóforo (véase la patente de EE.UU. de propiedad conjunta 7.238.367). Esta técnica se basa en la formación de un complejo fármaco-metal en lugar de la creación de un gradiente de pH para dirigir la absorción del fármaco. Una técnica de carga activa adicional descrita en la solicitud de PCT internacional de propiedad conjunta WO07 / 076117 hace uso de una solución acuosa de amina secundaria o terciaria en el espacio intraliposómico para dirigir la absorción de fármacos que contienen grupos amina protonables.

Los métodos pasivos y activos de atrapamiento también pueden acoplarse con el fin de preparar una formulación de liposomas que contiene más de un agente encapsulado.

Como se ha indicado anteriormente, las realizaciones en las que dos o más agentes terapéuticos se administran simultáneamente, solo uno de los agentes terapéuticos necesita encapsularse con los liposomas mezclados de la invención; el otro puede suministrarse en un vehículo de liberación alternativo con farmacocinéticas coordinadas con las de la parte de liposomas mezclados.

Agentes de platino

En los últimos años, los agentes terapéuticos basados en metales han desempeñado un papel importante en los tratamientos quimioterapéuticos. En particular, se está demostrando que los compuestos basados en platino son algunos de los fármacos antineoplásicos más eficaces usados en la práctica clínica. Los agentes de platino, como se incorporan en el presente documento, se usan principalmente porque forman aductos de ADN que bloquean la síntesis de ADN y ARN y apoptosis. La naturaleza de los aductos de platino / ADN ha sido ampliamente investigada por hidrólisis del ADN en los nucleótidos. Los estudios han demostrado que el aducto es típicamente una reticulación que implica el N-7 de las bases de purina del ADN (adenina (A) y guanina (G)). El complejo preferencial para los compuestos de platino tales como cisplatino, es una reticulación intracatenaria en los dinucleótidos GG (aparición de 62%) y AG (aparición de 22%). De hecho, se ha demostrado que la reticulación intracatenaria se correlaciona con la respuesta clínica a la terapia con cisplatino. Para poseer este tipo de actividad antitumoral un agente de platino debe tener dos grupos salientes relativamente lábiles para reaccionar con las bases del ADN. Típicamente, los agentes de platino tienen un átomo central de platino unido a cuatro ligandos, dos de los cuales son reactivos. En el caso del cisplatino, el átomo de platino está unido a dos grupos amino y dos cloruros (salientes).

Por tanto, los "agentes de platino" y "fármacos a base de platino" hacen referencia a fármacos terapéuticos que contienen un átomo de platino reactivo, incluyendo formas derivatizadas y no derivatizadas de cisplatino y sus compuestos relacionados que tienen las características esenciales de contener un átomo de platino reactivo.

Aproximadamente 3.000 análogos de platino se han sintetizado en los últimos 30 años; sin embargo, solo 6 están actualmente en uso clínico, incluidos cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Cisplatino, carboplatino y oxaliplatino dominan el mercado mundial del cáncer con platino y se ha convertido en elementos cruciales en la práctica de atención convencional para numerosos tumores sólidos, incluidos los cánceres de ovarios, pulmón, colorrectal, testicular, vejiga urinaria, gástrico, melanoma y de cabeza y cuello. El oxaliplatino tiene un mecanismo de acción diferente al del cisplatino o el carboplatino que se ha demostrado que es especialmente importante en modelos resistentes al cisplatino y en líneas celulares que expresan genes de resistencia.

El cisplatino (cis-diaminadioroplatino (H)) tiene un espectro de actividad bien establecido, principalmente en el tratamiento de tumores de pulmón, de ovarios y de células germinales. Su unión a ADN se ha demostrado que hace que el dúplex de ADN se doble y desenrolle. Esta coordinación con el ADN conduce no solo a la inhibición de la replicación y la transcripción del ADN, sino también a un aumento de la apoptosis. Curiosamente, la actividad citotóxica de cisplatino depende de su estereoquímica, como el isómero trans (que se une al ADN de manera diferente) presenta una actividad reducida en comparación con el isómero cis.

Los desarrollos de análogos de cisplatino estructuralmente relacionados (del isómero cis), tales como carboplatino y oxaliplatino, todos los cuales se incorporan en el presente documento, se han centrado en los complejos a base de

platio que pueden actuar a través de mecanismos de acción diferentes a los del cisplatino. Idealmente, estos agentes demostrarían toxicidad reducida y / o actividad mejorada contra los cánceres resistentes al cisplatino.

El carboplatino (cis-diamino-1,1-ciclobutanodicarboxilatoplatino) es uno de los análogos de cisplatino mejor caracterizados. La Food and Drug Administration de Estados Unidos (FDA) lo aprobó en 1989 para el tratamiento de los cánceres de ovarios humanos. Se sabe formar un tipo idéntico de aducto de ADN y exhibir los mismos efectos terapéuticos que el cisplatino.

Sin embargo, carboplatino requiere dosis más bajas para alcanzar estos mismos efectos y muestra significativamente menos toxicidad para el sistema nervioso periférico y los riñones.. Se cree que esto es probablemente debido a la presencia de un ligando bidentado de dicarboxilato en carboplatino que ralentiza su degradación en derivados potencialmente dañinos.

El oxaliplatino (trans 1-diaminociclohexano oxalato platino) es una nueva sal de platino relativamente nueva que pertenece a la familia de DACH (diaminociclohexano) de platino y es el único análogo de cisplatino que ha entrado en el desarrollo clínico y logrado la aprobación para la comercialización. Esto demuestra la buena tolerancia clínica con ausencia de toxicidad renal o auditiva. El mecanismo acción exacto del oxaliplatino no está claro Se sabe formar complejos de platino reactivos que se cree que inhiben la síntesis de ADN mediante la formación de reticulación intracatenaria e intercatenaria de moléculas de ADN; sin embargo, se une en una ubicación diferente en el ADN que el cisplatino o el carboplatino. También es un compuesto más grande y más voluminoso que el cisplatino o el carboplatino, lo que hace más difícil separarlo del ADN Una vez unido. Otra diferencia entre oxaliplatino y los otros compuestos de platino es su espectro de citotoxicidad, o la capacidad para inducir la muerte celular. En particular, se ha mostrado actividad contra seis líneas celulares colorectales que tanto cisplatino como carboplatino tienen una citotoxicidad limitada, lo que demuestra la naturaleza selectiva de estos compuestos a base de platino.

En una realización de la invención, el "agente de platino" se selecciona basándose en su actividad contra un tipo concreto de célula o tumor. En realizaciones preferidas, el agente de platino es cisplatino, carboplatino u oxaliplatino. Lo más preferentemente, el agente de platino es cisplatino.

Los efectos de la combinación de camptotecinas y agentes de platino en liposomas mezclados de la invención actuarán inhibiendo la síntesis de ADN a través de múltiples vías y es probable que induzcan apoptosis. Esto es crítico para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tales como el cáncer, y de forma importante, puede resultar superior para el tratamiento de cánceres resistentes a los fármacos tales como los tumores resistentes al cisplatino.

Agentes terapéuticos para combinaciones con fármacos basados en platino

Habiéndose descubierto que varias combinaciones de agentes terapéuticos y fármacos basados en platino satisfacen los criterios de efectos no antagonistas establecidos anteriormente, se proporcionan en forma de formulaciones de vehículos de liberación de fármacos mezclados de la invención. Un "agente terapéutico" es un compuesto que por sí solo, o en combinación con otros compuestos, tiene un efecto deseable en un sujeto afectado por una afección o enfermedad no deseada.

Ciertos agentes terapéuticos se ven favorecidos para su uso en combinación con fármacos a base de platino cuando la enfermedad o afección objetivo es cáncer. Ejemplos son:

"Inhibidores de la topoisomerasa", tales como las camptotecinas, que interfieren con la actividad topoisomerasa I o II actividad, enzimas necesarias para la replicación y la transcripción del ADN;

"Antimetabolitos", tales como gemcitabina o 5-FU, que se parecen mucho a un metabolito esencial y, por tanto, interfieren con las reacciones fisiológicas que la implican;

"Inhibidores de la transducción de señales" que interfieren o evitan que las señales que hacen que las células cancerígenas crezcan o se dividan.

"Agentes citotóxicos";

"Inhibidores del ciclo celular" o "inhibidores del control del ciclo celular", que interfieren con el progreso de una célula a través de su ciclo celular normal, la duración de la vida de una célula, desde la mitosis que le da origen a los acontecimientos posteriores a la mitosis que la divide en células hijas;

"Inhibidores de del punto de control" que interfieren con la función normal de los puntos de control del ciclo celular, por ejemplo, el punto de control S/G2, el punto de control G2/M y el punto de control ;G1/S;

"Los inhibidores de los receptores tirosina quinasa" que interfieren con la actividad de los receptores del factor de crecimiento que poseen actividad de tirosina quinasa;

"Agentes de inducción de la apoptosis", que promueven la muerte celular programada;

"Inhibidores de la telomerasa", que interfieren con la actividad de una telomerasa, una enzima que extiende la longitud del telómero y extiende la vida útil de la célula y su capacidad de replicación;

"Inhibidores de quinasa dependientes de ciclina" que interfieren con las quinasas dependientes de ciclina que controlan las etapas principales entre las diferentes fases del ciclo celular a través de la fosforilación de proteínas celulares tales como histonas, proteínas del citoesqueleto, factores de transcripción, genes supresores de tumores y similares;

"Agentes perjudiciales para el ADN";

"Inhibidores de la reparación del ADN";

"Agentes antiangiogénicos", que interfieren con la generación de nuevos vasos sanguíneos o el crecimiento de los vasos sanguíneos existentes que se produce durante el crecimiento del tumor; y

"Venenos" mitocondriales que directa o indirectamente interrumpen la función de la cadena respiratoria mitocondrial.

En una realización, las combinaciones para el tratamiento de tumores son cisplatino (o carboplatino) e irinotecán y cisplatino (o carboplatino) y topotecán.

Determinación de las proporciones no antagonistas de fármaco de platino / camptotecina *in vitro*

En un aspecto de la invención, los agentes de platino y los agentes terapéuticos adicionales, tales como camptotecinas, se encapsularán en vehículos de liberación basados en lípidos mezclados en proporciones sinérgicas o aditivas (es decir, no antagonistas). La determinación de relaciones de agentes que muestran efectos sinérgicos o aditivos de la combinación puede llevarse a cabo utilizando varios algoritmos, basados en los tipos de datos experimentales que se describen a continuación. Estos métodos incluyen métodos de isoblograma (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, pp. 1 – 5. New York: Academic Press), el método de simulación de Monte Carlo, CombiTool, ComboStat y el método del efecto de la mediana de Chou–Talalay basado en la ecuación descrita en Chou, / *Theor. Biol.* (1976) 39:253 – 76; y Chou, *Mol. Pharmacol.* (1974 A) 10:235 – 247). Las alternativas incluyen la fracción superviviente (Zoli, et al., *Int. J. Cancer* (1999) 80:413 – 416), la respuesta en porcentaje de la unidad formadora de colonias de granulocitos/macrófagos en comparación con los controles (Pannacciulli, et al., *Anticancer Res.* (1999) 19:409 – 412) y otros (Berenbaum, *Pharmacol. Rev.* (1989) 41:93 – 141; Greco, et al, *Pharmacol Rev.* (1995) 47:331 – 385).

Se prefiere el método del efecto de la mediana de Chou–Talalay. El análisis usa una ecuación en la que la dosis que causa un efecto concreto viene dada 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 dicha dosis, D_m es la dosis para la mediana del efecto que significa la potencia y m es un coeficiente que representa la forma de la curva de dosis-efecto (m es 1 para las reacciones de primer orden).

Esta ecuación se puede manipular adicionalmente para calcular un índice de combinación (IC) sobre la base de la ecuación de múltiples efectos del fármaco como se describe en Chou y Talalay, *Adv. Enzyme Reg.* (1984) 22:27 – 55; y en Chou, et al., en: Synergism and Antagonism in Chemotherapy, Chou and Rideout, eds., Academic Press: New York (1991) 223 – 244. Un programa informático A (CalcuSyn) para este cálculo se encuentra 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 derivado de modelos cinéticos enzimáticos. Una ecuación determina solamente el efecto aditivo en vez del sinergismo y el antagonismo. Sin embargo, de acuerdo con el programa CalcuSyn, la sinergia se define como un efecto aditivo más de lo esperado, y el antagonismo como un efecto aditivo menos de lo esperado. Chou y Talalay en 1983 propusieron la designación de IC = 1 como el efecto aditivo, por lo tanto, a partir de la ecuación efecto de múltiples fármacos se obtiene:

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

para los fármacos que se excluyen mutuamente que tienen los mismos o similares modos de acción, y se propone, además, que

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

para los 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 dicta que el fármaco 1, $(D)_1$, y el fármaco 2 $(D)_2$, (en los numeradores) en combinación inhiben el x % en el experimento real. Por tanto, el x % de inhibición observado experimentalmente no puede ser un número redondo, sino que con mayor frecuencia tiene una fracción decimal. $(D_x)_1$ y $(D_x)_2$ (en los denominadores) de las ecuaciones 1 y 2 son las dosis del fármaco 1 y el fármaco 2 individualmente, respectivamente, que inhiben el % x.

Para simplificar, generalmente se supone exclusividad mutua cuando más de dos fármacos están involucrados en combinaciones (*CalcuSyn Manual and Software*; Cambridge: Biosoft 1987).

Una combinación de dos fármacos puede usarse además como una única unidad farmacéutica para determinar las interacciones sinérgicas o aditivas con un tercer agente. Además, se puede usar una combinación de tres agente como una unidad para determinar las interacciones no antagónicas con un cuarto agente, y así sucesivamente.

5 Los datos experimentales subyacentes se determinan generalmente *in vitro* utilizando células en cultivo o en sistemas libres de células. Preferentemente, el índice de combinación (IC) se representa como una función de la fracción de las células afectadas (f_a) como se muestra en las Figuras 4A-4D, que, como se ha explicado anteriormente, es un parámetro sustituto para la serie de concentración. Las combinaciones preferidas de agentes son aquellas que muestran sinergia o aditividad en un intervalo considerable de valores f_a .

10 Se seleccionan combinaciones de agentes que muestran sinergia sobre al menos el 5% de la serie de concentraciones, en la que más del 1% de las células están afectadas, es decir un intervalo de f_a superior a 0,01. Preferentemente, una mayor porción de concentración global exhibe un IC favorable; por ejemplo, el 5% de un intervalo de f_a de 0,2 – 0,8. Más preferentemente, el 10% de este intervalo exhibe un IC favorable. Incluso más preferentemente, el 20% del intervalo de f_a , preferentemente más del 50% y, lo más preferentemente, preferentemente aproximadamente al menos el 70% del intervalo de f_a de 0,2 a 0,8 se usan en las composiciones. Las combinaciones que muestran sinergia sobre un intervalo sustancial de los valores de f_a pueden reevaluarse a una variedad de proporciones de agentes para definir la proporción óptima para mejorar la fuerza de la interacción no antagonista y aumentar el intervalo de f_a durante el cual se observa sinergia.

20 Como se ha indicado anteriormente, se llevarán a cabo estudios *in vitro* en cultivos de células con células "relevantes". La elección de las células dependerá del uso terapéutico pretendido del agente. Los estudios *in vitro* en biopsias de pacientes individuales o tumores enteros se llevarán a cabo con "homogeneizados de células tumorales", generados a partir de la rotura mecánica o química de la o las muestras en células individuales enteras.

25 En una realización preferida, el efecto dado se refiere a la muerte celular o estasis celular después de la aplicación de un agente citotóxico a un cultivo celular "relevante" (véase el Ejemplo 2). La muerte celular o la viabilidad pueden medirse utilizando un número de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, el ensayo "MTT" (Mosmann, *J. Immunol. Methods* (1983) 65(1–2):55 – 63)

30 Administración de las composiciones de la invención *in vivo*

35 Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones del vehículo de liberación mezclado de la presente invención se pueden administrar a animales de sangre caliente, incluyendo seres humanos, así como a especies de aves domésticas. Para el tratamiento de dolencias humanas, un médico cualificado determinará cómo las composiciones de la presente invención deben usarse con respecto a la dosis, el calendario y la vía de administración utilizando los protocolos establecidos. Estas aplicaciones también pueden utilizar la escalada de dosis si los agentes encapsulados en composiciones de vehículos de liberación de la presente invención presentan una toxicidad reducida a los tejidos sanos del sujeto.

40 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por vía parenteral, es decir, por vía intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. Más preferentemente, las composiciones farmacéuticas se administran vía intravenosa o intraperitoneal mediante una inyección en bolo. Por ejemplo, véase Rahman, et al, Patente de EE.UU. N° 3.993.754; Sears, Patente de EE.UU. N° 4.145.410; Papahadjopoulos, et al., Patente de EE.UU. N° 4.235.871; Schneider, Patente de EE.UU. N° 4.224.179; Lenk, et al., Patente de EE.UU. N° 4.522.803; y Fountain, et al., Patente de EE.UU. N° 4.588.578, incorporados por referencia.

50 En otros métodos, las preparaciones farmacéuticas o cosméticas de la presente invención pueden ponerse en contacto con el tejido objetivo mediante aplicación directa de la preparación al tejido. La aplicación puede realizarse mediante tópicos, "abiertos" o "cerrados". Por "tópico", se entiende la aplicación directa de la preparación de múltiples fármacos a un tejido expuesto al medio ambiente, tales como la piel, la orofaringe, el canal auditivo externo, y similares. Los procedimientos "abiertos" son los procedimientos que incluyen la incisión de la piel de un paciente y visualizar directamente el tejido subyacente al que se aplican las preparaciones farmacéuticas. Esto se logra generalmente mediante un procedimiento quirúrgico, tal como una toracotomía, para acceder a los pulmones, laparotomía abdominal para acceder a las vísceras abdominales, u otro abordaje quirúrgico directo al tejido diana. Los procedimientos "cerrados" son procedimientos invasivos en los que los tejidos diana internos no se visualizan directamente, pero acceden mediante la inserción de instrumentos a través de pequeñas heridas en la piel. Por ejemplo, las preparaciones pueden administrarse en el peritoneo mediante lavado con aguja. Como alternativa, las preparaciones pueden administrarse a través de dispositivos endoscópicos.

60 Las composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de liberación mezclados de la invención se preparan de acuerdo con técnicas estándar y pueden comprender agua, agua tamponada, solución salina al 0,9%, 0,3% de glicina, 5% de dextrosa y similares, incluyendo glicoproteínas para una estabilidad mejorada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las soluciones acuosas resultantes se pueden empaquetar para su uso o filtrar en condiciones asépticas y liofilizar, estando la preparación liofilizada combinada con una solución acuosa estéril antes

65

de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiere para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste de pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico. Adicionalmente, la suspensión del vehículo de liberación puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen los lípidos contra daños peroxidativos producidos por radicales libres y por lípidos durante el almacenamiento. Los inactivadores de los radicales libres lipófilos, tales como alfa-tocoferol y los quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como ferrioxamina, son adecuados.

La concentración de vehículos de liberación mezclados en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, por ejemplo, desde menos de aproximadamente 0,05%, generalmente a o al menos aproximadamente 2 – 5% a tanto como 10 a 30% en peso y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, y similares, de acuerdo con el modo de administración concreto seleccionado. Por ejemplo, se puede aumentar la concentración para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Como alternativa, los vehículos de liberación mezclados compuestos por lípidos irritantes pueden diluirse hasta bajas concentraciones para disminuir la inflamación en el sitio de administración. Para el diagnóstico, la cantidad de vehículos de liberación administrados dependerá del uso indicado concreto, el estado de enfermedad que se esté diagnosticando y el juicio del médico.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por vía intravenosa. Las dosis para las formulaciones de vehículo de liberación mezcladas dependerán de la relación entre el fármaco y el lípido y la opinión del médico que lo administra en función de la edad, el peso y el estado del paciente.

Además de las composiciones farmacéuticas, las formulaciones adecuadas para uso veterinario se pueden preparar y administrar de una forma adecuada para el sujeto. Los sujetos veterinarios preferidos incluyen especies de mamíferos, por ejemplo, primates no humanos, perros, gatos, ganado vacuno, 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 en las composiciones invención que contienen 2 o más agentes activos se pueden formular por separado en composiciones individuales en las que cada agente terapéutico se asocia de forma estable con los vehículos de liberación adecuados, siempre que al menos un agente esté encapsulado en liposomas mezclados de la invención. Estas composiciones se pueden administrar por separado a los sujetos, siempre y cuando la farmacocinética de los vehículos de liberación se coordinan de manera que se mantiene la relación de agentes terapéuticos administrados durante al menos una hora en la sangre después de la administración *in vivo*. Por lo tanto, es útil construir kits que incluyan, en recipientes separados, una primera composición que comprende vehículos de liberación asociados de forma estable con al menos un fármaco a base de platino y, en un segundo recipiente, una segunda composición que comprende vehículos de liberación asociados de forma estable con al menos un segundo agente terapéutico, tal como un camptotecina. Los vehículos de liberación en al menos una composición deben ser liposomas mezclados. Los recipientes pueden después envasarse en el kit.

El kit también incluirá instrucciones sobre el modo de administración de las composiciones a un sujeto, por lo menos, incluyendo una descripción de la relación de cantidades de cada composición a administrar. Alternativamente, o además, el kit se construye de manera que las cantidades de las composiciones en cada recipiente se mide previamente de manera que el contenido de un recipiente en combinación con el contenido de la otra representan la proporción correcta. Alternativamente, o además, los recipientes pueden estar marcados con una escala de medida que permite la dispensación de cantidades apropiadas de acuerdo con las escalas visibles. Los propios contenedores pueden ser utilizables en la administración; por ejemplo, el kit podría contener las cantidades apropiadas de cada composición en jeringas separadas. Las formulaciones que comprenden la proporción correcta pre-formulada de agentes terapéuticos también pueden envasarse de esta manera de modo que la formulación se administra directamente desde una jeringa previamente envasada en el kit.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplos

Métodos para la preparación de liposomas mezclados

A menos que se especifique lo contrario, los lípidos se disolvieron en solución de cloroformo, se mezclaron a las cantidades indicadas, posteriormente se secaron bajo una corriente de gas nitrógeno y se colocaron en una bomba de vacío para eliminar el disolvente. Se pueden añadir niveles trazas de lípidos radiactivos ¹⁴C-CHE para cuantificar los lípidos en los experimentos apropiados. La película lipídica resultante se colocó en alto vacío durante un mínimo de 2 horas. La película de lípido se hidrató en la solución indicada para formar vesículas multilaminares (VML). La preparación resultante se extruyó 10 veces a través de filtros de policarbonato apilados con un aparato de extrusión (Northern Lípidos Inc., Vancouver, BC, Canadá) para lograr un tamaño medio de liposomas entre 80 y 150 nm. Todos los lípidos constituyentes de liposomas se presentan en % en moles. La distribución del diámetro medio y del

tamaño de cada formulación de liposomas se analizó mediante el distribuidor de tamaños de partículas en submicrómetros modelo 380 con dispersión de luz cuasi-elástica NICOMP (Pacific Scientific, Santa Barbara, CA, EE.UU.) y típicamente era de 100 ± 20 nm.

5 Métodos para la cuantificación de la carga de fármaco

En varios puntos de tiempo después del inicio de la carga de fármaco, se extrajeron alícuotas y se pasaron a través de una columna de centrifugación Sephadex G-50 para separar el fármaco libre del encapsulado. Para un volumen especificado de eluyente que contiene fármaco encapsulado, se añadió Triton® X-100 o N-octil beta-D-glucopiranosido (OGP) para solubilizar los liposomas. Después de la adición de detergente, la mezcla se calentó hasta el punto de nube del detergente y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de la medición de la absorbancia o la fluorescencia. Las concentraciones de fármaco se calcularon por comparación con una curva estándar. Los niveles de lípidos se midieron mediante recuento de centelleo líquido.

15 Ejemplo 1 (no dentro del ámbito de la presente invención)

La liberación del cisplatino intermedio a partir de liposomas mezclados maximiza el índice terapéutico

Para determinar el papel de la composición de liposomas sobre la actividad del cisplatino *in vivo*, la semivida del fármaco (tiempo necesario para que la concentración plasmática de un fármaco alcance la mitad de su concentración original) y se estudió la eficacia *in vivo* de los liposomas con diferente contenido de DSPC y / o DPPC que contienen cisplatino encapsulado.

25 Las películas lipídicas se prepararon disolviendo diferentes combinaciones de DSPC, DPPC, DSPG, DPPG y colesterol (Col) para generar los siguientes liposomas: DSPC/DSPG/Col (relación molar 70/20/10), DSPC/DPPC/DSPG/Col (relaciones molares 60/10/20/10, 50/20/20/10 y 35/35/20/10), DSPC/DPPC/DPPG/Col (relación molar 35/35/20/10) y DPPC/DPPG/Col (relación molar 70/20/10).

30 El cisplatino se cargó en los liposomas anteriores que contienen NaCl 150 mM incubando el fármaco con los liposomas durante 60 minutos a 60 °C en presencia de etanol al 7,5% a una concentración de cisplatino de 8 mg / ml. La reacción se enfrió para precipitar el cisplatino no encapsulado o diluir con solución salina caliente. Los liposomas de intercambiaron después con tampón en solución salina para eliminar el cisplatino no encapsulado y posteriormente se intercambiaron en sacarosa tamponada con fosfato (pH 7). Análisis de la encapsulación del fármaco de cisplatino en porcentaje se determinó por espectrometría de absorción atómica.

35 La semivida del cisplatino para cada formulación de liposoma se determinó mediante la farmacocinética (FC) en ratones BDF-1 no portadores de tumores. A los ratones se les administró por vía intravenosa 3 mg / kg de cisplatino encapsulado (375 mg / kg de lípidos) en la vena lateral de la cola. En los puntos de tiempo indicados (3 ratones por punto de tiempo) se recogió sangre por punción cardiaca y se colocó en recipientes micro revestidos con EDTA. Las muestras se centrifugaron y el plasma se transfirió cuidadosamente a otro tubo. Los niveles de cisplatino en plasma se determinaron mediante espectrometría de absorción atómica y los niveles de lípidos se determinaron mediante recuento de centelleo líquido. Para la cuantificación mediante espectrometría de absorción atómica, las muestras se diluyeron en ácido nítrico al 0,1% para que entren dentro del intervalo lineal de una curva estándar.

45 La actividad *in vivo* de cada formulación de liposomas de cisplatino, comunicada como el porcentaje (%) del incremento de la duración de la vida (ILS) se midió en ratones hembra BDF-1 a las que se había inyectado por vía intraperitoneal (i.p.) con células de leucemia humana P388.

50 Brevemente, con el fin de realizar estudios de tumores en ratones, se inocula a los animales células tumorales que después se dejan crecer hasta un tamaño suficiente. Usando una aguja de 28 g, se inocula a los ratones por vía i.p. con $1 - 2 \times 10^6$ células tumorales el día 0 (un inóculo / ratón) en un volumen de 50 μ l. Se organizó a los ratones en grupos de tratamiento apropiados y consisten en grupos de control y de tratamiento, como por ejemplo, solución salina de control, control de liposomas, control positivo y varias diluciones de artículos de prueba.

55 Se inyectó a los ratones por vía intravenosa el volumen requerido de la muestra para administrar la dosis prescrita (10 μ l / g tal como se indica) a los animales en base a los pesos de cada ratón individual. Todos los animales se observan al menos una vez al día, más si se considera necesario, durante los períodos de pre-tratamiento y tratamiento para determinar la mortalidad y la morbilidad. En particular, los signos de mala salud se basan en la pérdida de peso corporal, cambios en el apetito, pelo duro, la falta de acicalado, cambios de comportamiento, tales como la marcha alterada, letargo y manifestaciones graves de estrés. Si aparecen signos de toxicidad grave o de enfermedad relacionada con el tumor, se sacrifica a los animales (asfixia con CO₂) y se realiza una necropsia para evaluar otros signos de toxicidad. Los animales moribundos deben ser sacrificados por razones humanitarias y la decisión de ser a criterio del técnico de la atención animal y del Director / Manager del Estudio. Todos y cada uno de estos resultados se registrarán como datos sin procesar y el momento de la muerte se registrará como al día siguiente.

65

La Figura 1 muestra la semivida (horas) de la liberación de cisplatino frente a la eficacia (notificado como por ciento de ILS). Como se ve en la curva en forma de campana para la eficacia, existe una formulación pico para la eficacia que corresponde a una semivida intermedia para la liberación de cisplatino. Como se ve en el presente documento, si el cisplatino se libera demasiado rápido o demasiado despacio se reduce la eficacia *in vivo*. Por ejemplo, la formulación DSPC / DSPG / Col (70/20/10) demostró la semivida más larga que dio lugar aún más a un % ILS negativo. También cabría esperar obtener resultados similares para los liposomas con altas relaciones DSPC:DPPC o que contienen cantidades muy pequeñas de DPPC tales como DSPC/DPPC/DSPG/Col (65/5/20/10 con una relación 13:1 DSPCDPPC) Dado que se añadió DPPC en cantidades crecientes (disminuyendo así la relación DSPCDPPC), la semivida disminuyó con un aumento concomitante del tiempo de vida hasta alcanzar una relación DSPC:DPPC de 1: 1. En este punto, más DPPC continuó disminuyendo la semivida, aunque condujo a una ligera disminución de la eficacia. La tabla de la figura 2 muestra que la dosis máxima tolerada (DMT) de liposomas mezclados DSPC / DPPC es más alta que la observada para cualquiera de las formulaciones de liposomas no mezclados y que la formulación más tolerada comprende los liposomas DSPC / DPPC / DSPG / Colesterol (35 / 35/20/10) con una relación 1:1 de DSPC / DPPC. Los resultados mostrados en el presente documento indican que una formulación con liposomas de DSPC / DPPC / DSPG / Colesterol (35/35/20/10) puede proporcionar el equilibrio óptimo de liberación de cisplatino y la eficacia *in vivo*.

Ejemplo 2 (no dentro del ámbito de la presente invención)

El cisplatino liposomal en los liposomas mezclados demuestra el aumento de la eficacia en comparación con cisplatino libre

La actividad *in vivo* del cisplatino liposomal liberado en los liposomas DSPC/DPPC/DSPG/Colesterol (35: 35: 20: 10% mol) se comparó directamente con la actividad de una dosis igual de cisplatino libre. El cisplatino liposomal se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La actividad *in vivo* de cada formulación de cisplatino, notificada como la disminución de la carga tumoral, se midió usando un modelo de xenoinjerto de colon humano HCT 116 en ratones hembra FoxN-1. Se trató a los animales (6 ratones por grupo) con tres inyecciones, administrándose las inyecciones cada cuatro días (pauta c7d; los días 12, 16 y 20). El crecimiento del tumor se determinó mediante mediciones directas con compás. Se trató a los ratones con solución salina, cisplatino libre o un cisplatino liposomal. Para los tratamientos tanto con cisplatino libre como liposomal, las dosis fueron 3,0 mg / kg de cisplatino.

Los resultados presentados en la Figura 3 (los puntos representan el tamaño medio del tumor +/- error estándar de la media (SEM) determinado el día especificado) muestran que la administración de cisplatino encapsulado en liposomas mezclados de DSPC / DPPC / DSPG liposomas / colesterol dio lugar a una reducción significativa de la carga tumoral en comparación con la de cisplatino libre y controles de solución salina.

Ejemplo 3 (no dentro del ámbito de la presente invención)

Las combinaciones de cisplatino y otros agentes terapéuticos demuestran efectos antagonistas y no antagonistas dependientes de la relación del fármaco

Muchas combinaciones de dos o más fármacos tienen la capacidad de exhibir efectos sinérgicos. De un modo similar, las combinaciones de los mismos dos o más fármacos puede mostrar interacciones aditivas o antagonistas, dependiendo de la relación, y, a menudo de la concentración, de los fármacos utilizados. Con el fin de identificar las proporciones de los fármacos a base de platino y otros agentes terapéuticos que son sinérgicos, se probaron las combinaciones de cisplatino o carboplatino con diversos agentes terapéuticos adicionales para determinar sus efectos citotóxicos *in vitro*. Más específicamente, se identificaron combinaciones que demuestran sinergia en un amplio intervalo de concentraciones de fármaco.

La medición de los efectos aditivos, sinérgicos o antagonistas se realizó utilizando cada combinación de fármacos en un número de relaciones molares en líneas celulares de cáncer humano. Se usó el protocolo del ensayo de citotoxicidad MTT colorimétrico basado en tetrazolio estándar (Mosmann, et al, J. Immunol Methods (1983) 65(1 – 2):55 – 63) para determinar la lectura para la fracción de células afectadas. En resumen, las células viables reducen la sal de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dietiltiazolil-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a un formazán azul que se puede leer espectrofotométricamente. Las células, tales como la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humana H usada en el presente documento, se cultivan en matraces de 25 cm² y se pasaron (número de pases <20), se resuspendieron en medio de cultivo celular fresco y añadieron a placas de cultivo celular de 96 pocillos una concentración de 1000 células por pocillo en 100 µl por pocillo. Después, las células se dejaron incubar durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Las preparaciones de una sola célula tales como estas también pueden prepararse a partir de tumores o biopsias de pacientes homogeneizando el tejido con técnicas conocidas. Al día siguiente, se preparan diluciones en serie de los fármacos en placas de cultivo celular de 12 pocillos. Los agentes, preparados previamente en varias soluciones, se diluyen en medio de cultivo celular fresco. Los agentes se administran a los pocillos apropiados o especificados para los agentes individuales (20 µl) y en combinaciones específicas de relación fija de agente doble (incrementos de 20 µl) con un diseño cuadrado latino o método de dilución en "tablero de

ajedrez". Los volúmenes totales de los pocillos se forman hasta 200 µl con medio fresco. La exposición al fármaco es para una duración de 72 horas.

Después de la exposición al fármaco, el reactivo MTT (1 mg / ml en RPMI) se añade a cada pocillo a un volumen de 50 µl por pocillo y se incuban durante 3-4 horas. Después, el contenido de los pocillos se aspira y a continuación se añaden 150 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pocillo para romper las células y solubilizar el precipitado de formazán en las células. Las placas de 96 pocillos se agitan en un agitador de placas, y se leen en un espectrofotómetro de microplacas ajustado a una longitud de onda de 570 nm. Las lecturas de la densidad óptica (DO) se registran y los valores de DO de los pocillos en blanco (que contienen medio solo) se restan de todos los pocillos que contienen células. La supervivencia de las células tras la exposición a agentes se basa como un porcentaje de los pocillos de control (células no expuestas a fármaco). Todos los pocillos se realizan por triplicado y se calculan los valores medios.

Se determinó un índice de combinación para cada dosis de fármaco de platino / agente terapéutico dosis usando Calculusyn que se basa en la teoría de Chou y Talalay de análisis de la dosis-efecto, en el que una "ecuación del efecto mediano" se ha utilizado para calcular un número de ecuaciones bioquímicas que se utilizan extensamente en la técnica. Las derivaciones de esta ecuación han dado lugar a las ecuaciones de orden superior tales como los utilizados para el cálculo de Índice de Combinación (IC). El IC se puede utilizar para determinar si las combinaciones de más de un fármaco y varias relaciones de cada combinación son antagónicas ($IC > 1,1$), aditivo ($0,9 \leq IC \leq 1,1$) o sinérgico ($IC < 0,9$). Los gráficos del IC normalmente se ilustran de modo que el IC representa el eje y frente a la proporción de las células afectadas, o fracción afectada (f_a) en el eje x. Los datos de las Figuras 4A-4D, representados como IC frente a la fracción de las células H460 afectadas, ilustran claramente que las particulares relaciones de fármacos son antagónicas mientras que otras son sinérgicas o aditivas-

Figura 4A muestra que el cisplatino y el irinotecán en relaciones molares de 8: 1, 16 : 1, 32: 1 y 64: 1 eran no antagonista sobre la gran mayoría de la gama de valores de f_a mientras que una proporción de 4: 1 era sinérgica a una gama de valores de f_a fuertemente antagónica por encima de un valor de f_a de 0,4. En contraste, las relaciones 1: 1 y 2: 1 fueron antagónicas sobre un rango sustancial de valores de f_a .

La Figura 4B muestra que el cisplatino y la edelfosina en proporciones molares de 10: 1 y 1: 1 también se mostraba que exhibían efectos de combinación distintos en células H460 que se resumen por el gráfico de CI frente a f_a . La combinación en una relación molar de 10:1 fue no antagonista para aproximadamente el 50% de la gama serie afectada a concentraciones bajas y antagónica a concentraciones más altas, mientras que una proporción de 1: 1 mol demostró sinergia en todo el intervalo de concentración.

La Figura 4C demuestra que se observaba sinergia para una combinación de cisplatino y daunorrubicina a una relación molar de 10: 1 sobre todo el intervalo de f_a , mientras que las relaciones molares de 1:1 mostraban antagonismo sobre la completa serie de f_a .

Los datos de combinación de cisplatino/topotecán se presentan en la Figura 4D. Una relación molar de 10: 1 mol de esta combinación tiene una interacción no antagonista en un amplio rango de dosis que afectan 5% a 99% de las células ($f_a = 0,05$ a $f_a = 0,99$). En contraste, cisplatino / topotecán en una relación molar 1: 1 era fuertemente antagónica sobre el mismo intervalo de f_a .

Ejemplo 4

Mantenimiento de combinaciones sinérgicas utilizando liposomas mezclados

Para determinar si una relación sinérgica de un fármaco a base de platino y un segundo agente terapéutico podría mantenerse utilizando liposomas mezclados de la invención en los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en cisplatino liposomal e irinotecán liposomal formulados en mezclas separadas de liposomas DSPC / DPPC / DSPG / colesterol.

El cisplatino se cargó en los liposomas DSPC/DPPC/DSPG/Colesterol (35/35/20/10) que contienen NaCl 150 mM incubando el fármaco con los liposomas durante 60 minutos a 60 °C en presencia de etanol al 7,5% a una concentración de cisplatino de 5 mg / ml. La reacción se enfrió para precipitar el cisplatino no encapsulado o diluir con solución salina caliente. Los liposomas se intercambiaron después con tampón en solución salina para eliminar el cisplatino no encapsulado y posteriormente en sacarosa tamponada con fosfato (pH 7).

El irinotecán se cargó en liposomas de DSPC / DPPC / DSPG / Colesterol (35/35/20/10) liposomas que contienen TEA 300 mM / gluconato de sodio 10 mM (pH 7) mediante primero el intercambio de del tampón liposomal primera liposomal externo por sacarosa tamponada con fosfato (pH 7), y después se incubó el irinotecán con los liposomas en 41 a 43 °C durante 1 hora para lograr una proporción de lípido e irinotecán de 0,17. Los liposomas que contienen irinotecán resultantes se intercambiaron con tampón en sacarosa tamponada con fosfato (pH 7). El análisis del porcentaje de encapsulación de fármaco de cisplatino e irinotecán se determinó mediante espectrometría de absorción atómica y análisis HPLC, respectivamente.

El cisplatino liposomal y el irinotecán liposomal se administraron de forma conjunta a ratones CD-1 hembras atómicas hembra en la relación molar no antagonista de 5:1 con dosis de 1 mg / kg de cisplatino, 10 mg / kg de irinotecán y 130 mg / kg de lípidos. En los puntos de tiempo indicados (3 ratones por punto de tiempo) se recogió sangre por punción cardíaca y se colocó en recipientes micro revestidos con EDTA. Las muestras se centrifugaron y el plasma se transfirió cuidadosamente a otro tubo. Los niveles plasmáticos de irinotecán y cisplatino se determinaron por HPLC y mediante espectrometría de absorción atómica, respectivamente.

Los resultados en la Figura 5 (los puntos de datos representan las concentraciones medias de fármaco en el plasma determinadas en plasma +/- SD en los puntos de tiempo especificados) muestran que después de la inyección intravenosa de las formulaciones que contienen cisplatino y irinotecán, cargados por separado en liposomas DSPC / DPPC / DPPG / colesterol mezclados, las tasas de eliminación del fármaco en plasma eran comparables y las relaciones del fármaco no antagonista se pudieron mantener en el transcurso de tiempo de 24 horas después de la administración, como lo demuestran las concentraciones plasmáticas de irinotecán (nmoles / ml) de ser aproximadamente cinco veces mayor que la del cisplatino (nmoles / ml) en diversos puntos temporales (véase el recuadro de la Figura 5).

Ejemplo 5

Las combinaciones de liposomas mezclados-fármaco encapsulado demuestra la eficacia potenciada en comparación con los cócteles de fármacos libres

Muchas terapias actuales, en particular las quimioterapias de combinación, se basan en la administración de cócteles de medicamentos gratuitos. Los investigadores querían en el presente documento establecer si se observa una eficacia mejorada en combinaciones de fármacos algo encapsulados de liposomas mezclados en comparación con cócteles de medicamentos libres de las mismas combinaciones. Se llevaron a cabo estudios de eficacia usando una combinación de cisplatino libre e irinotecán, así como liposomas de cisplatino y liposomas de irinotecán coadministrados formulados por separado en liposomas mezclados.

El cisplatino se cargó en liposomas de DSPC / DPPC / DPPG / colesterol (35: 35: 20: 10% en moles) y el irinotecán se cargó en liposomas de DSPC / DPPC / DPPG / colesterol (35: 35: 20: 10% en mol) como se ha descrito anteriormente.

Se realizaron estudios de tumores en ratones como se describe en el ejemplo 1 a excepción de que a los ratones se inoculó por vía subcutánea células de cáncer pancreático humano Capan-1 o células de cáncer no microcítico humano H460 en lugar de células de leucemia P388. Las combinaciones de cisplatino e irinotecán liposomales o cócteles de fármaco libre de los dos fármacos se administraron a ratones hembra atómicos Foxnl portadores de tumores de xenoinjerto. Los ratones fueron tratados con un régimen de dosificación múltiple (las flechas indican los días de tratamiento) de solución salina, cóctel de fármaco libre en una relación molar de irinotecán: cisplatino de 5: 1 o una formulación liposomal mezclada de irinotecán: cisplatino co-administrado a una relación molar de 5: 1 ("CPX-551").

La figura 6A muestra los resultados, donde cada punto representa el tamaño medio del tumor +/- SEM determinado el día especificado. El control de solución salina (círculos sólidos) no inhibió el crecimiento del tumor; del mismo modo, el cóctel libre (cuadrados rellenos) mostró solo un ligero efecto sobre el crecimiento del tumor. En comparación, la formulación liposomal mezclada co-administrada, CPX-551 (triángulos sólidos), mostró inhibición del crecimiento tumoral significativa.

Con el fin de comparar totalmente el cóctel de fármaco libre no encapsulado con la co-formulación liposomal, los inventores han analizado una variedad de horarios de los fármacos para máximo efecto terapéutico en el modelo de tumor de NSCLC H460. Los calendarios del fármaco libre se compararon con la co-formulación liposomal a una proporción de 7: 1 usando las pautas de dosificación Q7dx3, C4Dx3 y C4Dx3X2. En un experimento separado los medicamentos no encapsulados se analizaron usando un calendario dosificación que imitaba al calendario clínico humano estándar (Chu y DeVita, 2006) en el que ambos fármacos se administran el día 1 y luego se alterna con irinotecán independientemente para las dos dosis siguientes por ciclo. Para lograr este tipo de calendario, las dosis relativas se modificaron para tener en cuenta las diferencias en la potencia entre los ratones y los seres humanos. En un experimento final, se utilizó el programa óptimo de los dos primeros experimentos para comparar directamente con una formulación liposomal mezclada de irinotecán: cisplatino co-administrados a una relación molar de 7:1 ("CPX-571"). En esta comparación, el régimen de clínica humana era inferior a las dosis simultáneas de ambos fármacos libres. Utilizando los programas de dosificación optimizados, la formulación conjunta liposomal CPX-571 fue superior a los fármacos no encapsulados (Figura 6B). Los valores del logaritmo de la destrucción celular (LCK) para los tratamientos fueron 2,29 y 2,20 para las terapias más eficaces de fármaco libre utilizando los programas de administración conjunta o de administración, alterna respectivamente, y se obtuvo un valor de LCK aumentado de 3,34 para CPX-571, un valor también considerado altamente activo para los agentes antitumorales (Coberth, et al., 2002).

Ejemplo 6

Las combinaciones de fármacos encapsulados en liposomas mezclados demuestran una eficacia mejorada sobre los agentes individuales administrados en los mismos liposomas mezclados

5 Los investigadores querían en el presente documento establecer si se observa una eficacia mejorada en combinaciones de fármacos algo encapsulados de liposomas mezclados en comparación con cada fármaco encapsulado en liposoma administrado de forma individual. El efecto terapéutico del cisplatino y el irinotecán encapsulados en liposomas administrados cada uno por separado se comparó con ambos fármacos encapsulados administrados juntos en dos proporciones no antagonistas diferentes.

10 El cisplatino se cargó en liposomas de DSPC / DPPC / DPPG / colesterol (35: 35: 20: 10% en moles) y el irinotecán se cargó en liposomas de DSPC / DPPC / DPPG / colesterol (35: 35: 20: 10% en mol) como se ha descrito anteriormente.

15 Se trató a ratones Foxn1 portadores de tumores con un programa de dosis múltiple (las flechas indican los días de tratamiento) de solución salina, cisplatino en liposomas e irinotecán en liposomas administrados individualmente y en conjunto con el fin de comparar la eficacia de los liposomas mezclados cargados con un solo fármaco ("cisplatino liposomal" e "irinotecán liposomal") con cisplatino liposomal e irinotecán liposomal mezclados coadministrados en una proporción cisplatino:irinotecán de 5:1 o 7:1 ("CPX-551" o "CPX-571," respectivamente). Los puntos de datos representan el tamaño medio del tumor media +/- error estándar de la media (SEM).

20 Los resultados presentados en la Figura 7A muestran que la administración de irinotecán y cisplatino encapsulados en liposomas DSPC/DPPC/DPPG/Colesterol mezclados (35:35:20: 10 mol %) y coadministrados a una proporción molar de irinotecán:cisplatino 5:1 ("CPX-551"; triángulos sólidos) proporcionaron una actividad terapéutica significativamente mejor en ratones portadores de tumores H460 en comparación con los animales inyectados, ya sea con cisplatino liposomal (círculos abiertos), irinotecán liposomal (cuadrados abiertos) solo o solución salina (círculos sólidos).

25 La figura 7B muestra de manera similar que la coadministración de cisplatino liposomal e irinotecán liposomal en liposomas mezclados en una proporción molar de 7: 1 de irinotecán: cisplatino (triángulos sólidos) ofrece una actividad terapéutica mejorada en ratones portadores de tumores H69 en comparación con el tratamiento con la misma dosis de cisplatino liposomal (círculos abiertos) o irinotecán liposomal (cuadrados abiertos) solo.

30 Para cuantificar la contribución de cada uno de los agentes de liposomas con respecto a la coformulación liposomal, los valores del logaritmo de la destrucción celular (LCK) se generaron a partir de los datos de la proporción 7: 1 presentados en la Figura 7B (véase la Figura 7C). La dosis de cisplatino liposomal de 8,3 μ moles/kg (2,5 mg/kg) tuvo como resultado una modesta demora del crecimiento tumoral de 14 días, con un valor LCK de 0,72, mientras que el irinotecán liposomal a una dosis de 57,6 μ moles/kg (39 mg / kg) dio lugar a retraso en el crecimiento de 38 días y un valor LCK de 1,95. Sin embargo, la coformulación liposomal que contiene irinotecán y cisplatino de dosis equivalentes (57,6 μ moles/kg y 8,3 μ moles/kg) dio lugar a un retraso del crecimiento tumoral de 78 días y un valor de LCK de 4,0, mucho más que el retraso del crecimiento tumoral (52 días LCK) o los valores LCK (2,67) predichos en base a la actividad aditiva de los dos componentes. Es de destacar que el valor LCK de 4,0 para CX-571 es muy superior al valor 2,8 LCK considerado "muy activo" para un agente antitumoral contra un modelo de tumor sólido (Cobergt, et al, 2002).

35 Ejemplo 7

Liberación en el tumor de combinaciones de fármaco sinérgico frente a antagonista en liposomas mezclados

40 Con el fin de evaluar el efecto biológico de antagonismo, se evaluaron las diferencias entre las proporciones sinérgicas y antagónicas de los fármacos liposomales coformulados *in vivo*. Usando la región de sinergia alta del cisplatino en la que la toxicidad predomina por el componente de cisplatino, los inventores han sido capaces de cambiar las proporciones entre un una relación molar antagonista y sinérgica mediante la variación de la dosis de irinotecán sin cambiar la dosis de cisplatino o la toxicidad relativa.

45 El cisplatino se cargó en liposomas de DSPC / DPPC / DPPG / colesterol (35: 35: 20: 10% en moles) y el irinotecán se cargó en liposomas de DSPC / DPPC / DPPG / colesterol (35: 35: 20: 10% en mol) como se ha descrito anteriormente.

50 Usando el modelo de xenoinjerto de tumor humano CPNMC H1299 en ratones atímicos Foxn1, el retraso del crecimiento tumoral se evaluó mediante la administración de cisplatino liposomal a 11 μ moles/kg (3,3 mg / kg) junto con irinotecán liposomal a 2,2 μ moles/kg (1,5 mg / kg) de irinotecán liposomal para generar una relación 1: 5 de irinotecán: cisplatino. Esta proporción de 1:5 dio como resultado un logaritmo de destrucción celular de 1,06 a pesar de la cantidad relativamente pequeña de irinotecán administrada. Sin embargo, cuando la dosis de irinotecán se incrementó 10 veces (22 μ moles/kg; 15 mg / kg), mientras se mantiene la misma dosis de cisplatino (11 μ moles/kg; 3 mg / kg) y, por tanto, se genera una relación molar de 2: 1 , una disminución en el valor del logaritmo de la

destrucción celular a 0,65, un resultado consistente con el antagonismo *in vivo* con relación a la formulación de la relación fármaco de 1:5. Cabe señalar que el mantenimiento de las relaciones de fármaco *in vivo* era constante para cada una de las relaciones de irinotecán:cisplatino n formuladas (datos no mostrados).

- 5 Como se ve en la Figura 8 y se ha indicado anteriormente, irinotecán y cisplatino encapsulados en liposomas DSPC / DPPC / DPPG / Colesterol mezclados (35: 35: 20: 10% molar) y coadministrados a una relación molar cisplatino: irinotecán de 1:5 proporcionaron una actividad terapéutica significativamente mejor cuando se compara con los animales a los que se han inyectado los mismos liposomas coadministrados en una proporción de 2:1 que se ha predicho que es antagonista *in vitro*.

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa en un sujeto, en la que la composición comprende:
- 5 liposomas que consisten en fosfatidilglicerol (DPPG) o diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG); colesterol (Col) y cantidades equimolares de diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) que encapsulan un fármaco a base de platino.
- 10 en combinación con una camptotecina hidrosoluble encapsulada en liposomas, en los que los liposomas que encapsulan el fármaco a base de platino consisten en DSPC:DPPC:DSPG:Col o DSPC:DPPC:DPPG:Col en una proporción molar 35:35:20:10.
2. La composición de la reivindicación 1 en la que dicho fármaco a base de platino y dicha camptotecina están presentes en la composición en una relación molar que tiene un efecto citotóxico o citostático no antagonista para las células relevantes o los homogeneizados de células tumorales.
- 15 3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el fármaco a base de platino es cisplatino, carboplatino u oxaliplatino.
- 20 4. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en la que la camptotecina es irinotecán (CPT-11), topotecán, 9-aminocamptotecina o lurtotecán, o una sal hidrófila de los mismos.
5. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que el fármaco a base de platino y la camptotecina están encapsulados en los mismos liposomas.
- 25 6. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los liposomas consisten en DSPC:DPPC:DSPG:Col a una relación molar de 35:35:20:10 y contienen irinotecán:cisplatino a una relación de 5:1 o 7:1.
- 30 7. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el irinotecán y cisplatino están encapsuladas en los mismos liposomas.

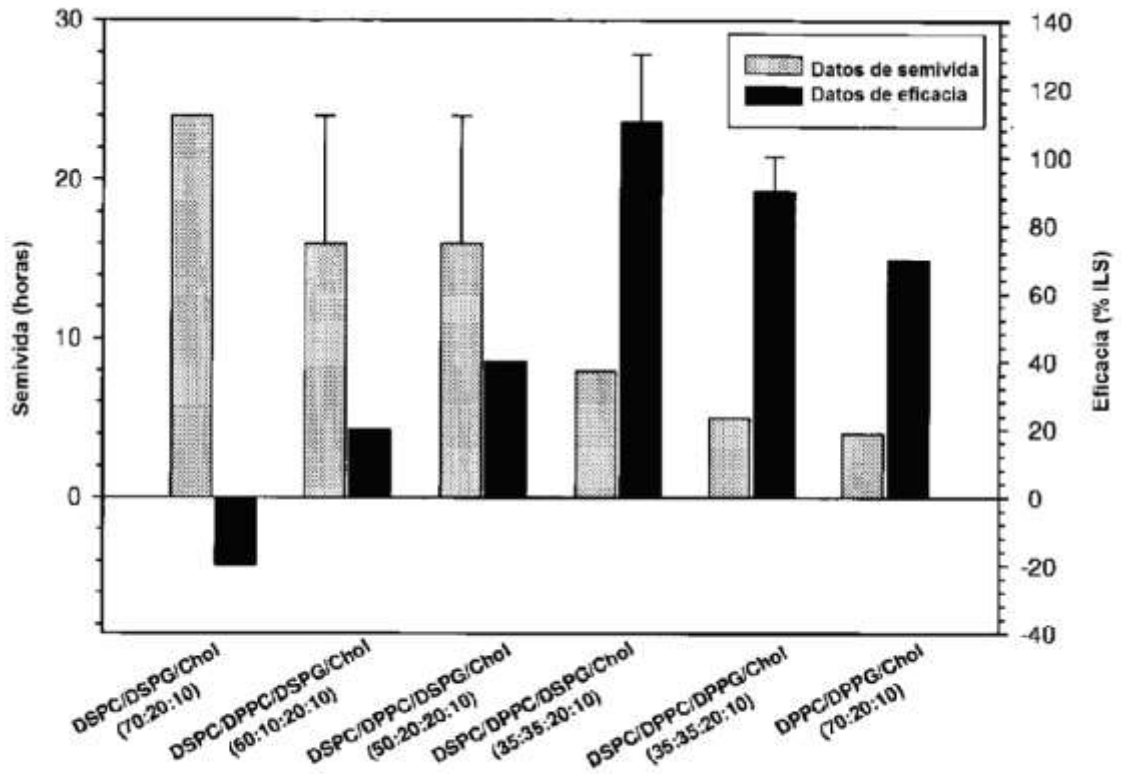


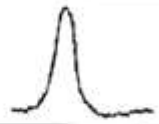

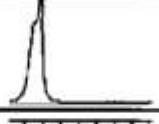


Figura 1

Formulación	Tf (°C)	Termograma	Semivida cisplatino-lípido	DMT
DSPC/DSPG/Chol (70:20:10)	54,9		24 horas	1 mg/kg
DSPC/DPPC/DSPG/Chol (35:35:20:10)	48,8		6,5 horas	ND
DSPC/DPPC/DPPG/Chol (35:35:20:10)	45,5		5 horas	>4 mg/kg
DSPC/DPPC/DPPG/Chol (17.5:52.5:20:10)	43,9		4 horas	ND
DPPC/DPPG/Chol (70:20:10)	42,2		4 horas	4 mg/kg

40 45 50 55

Figura 2

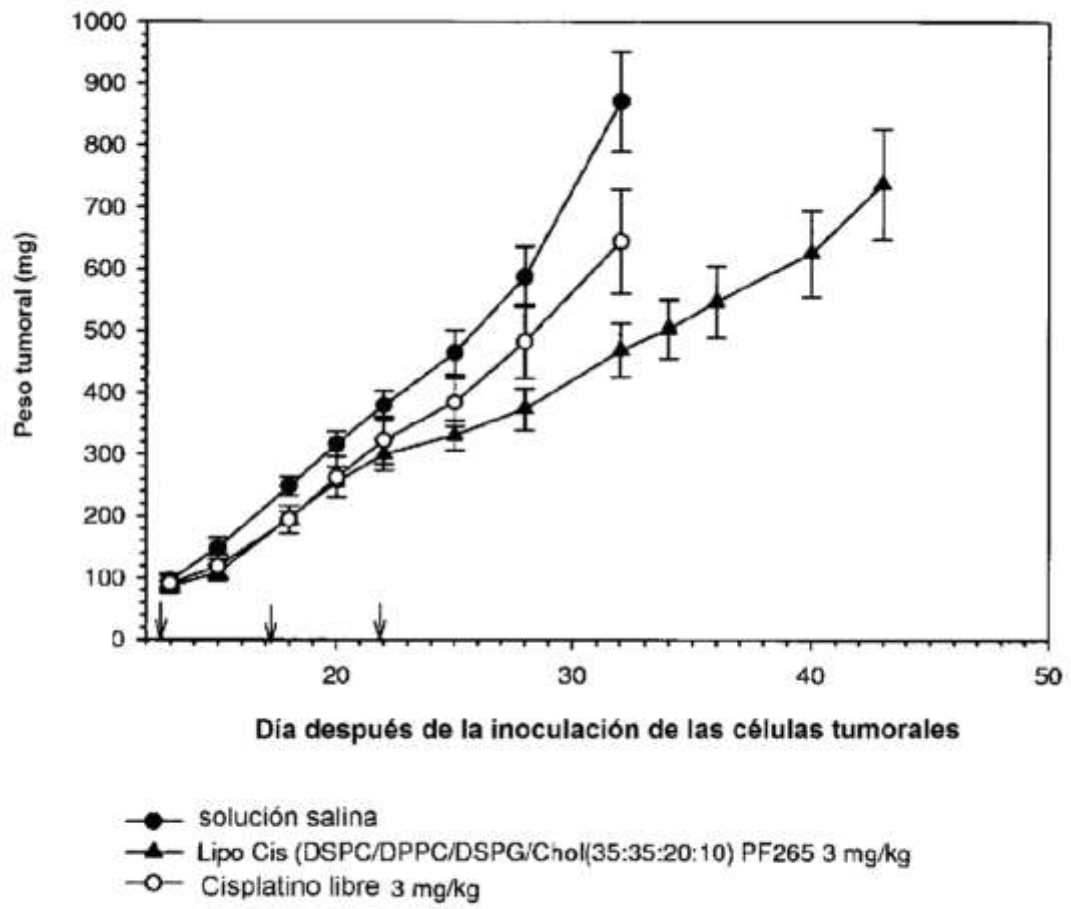
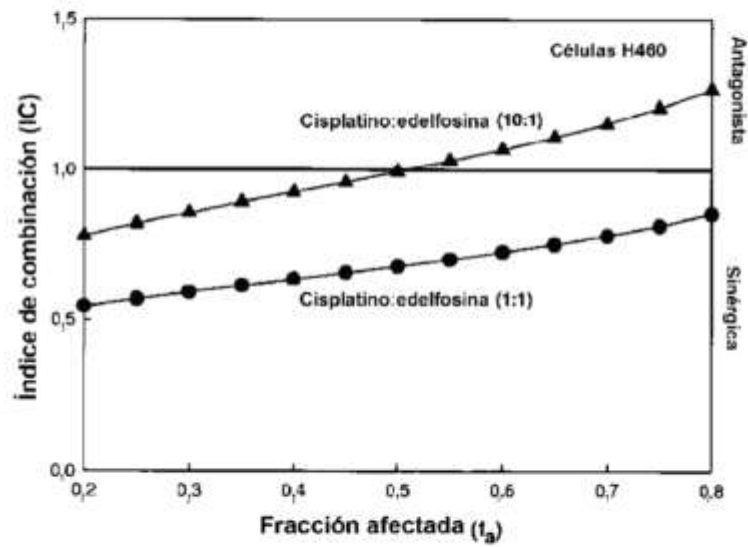
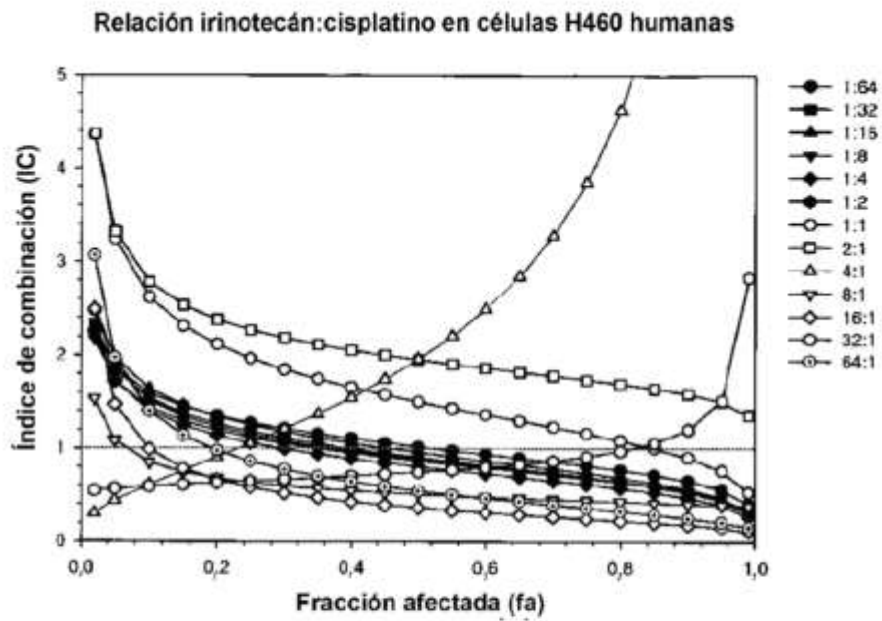


Figura 3



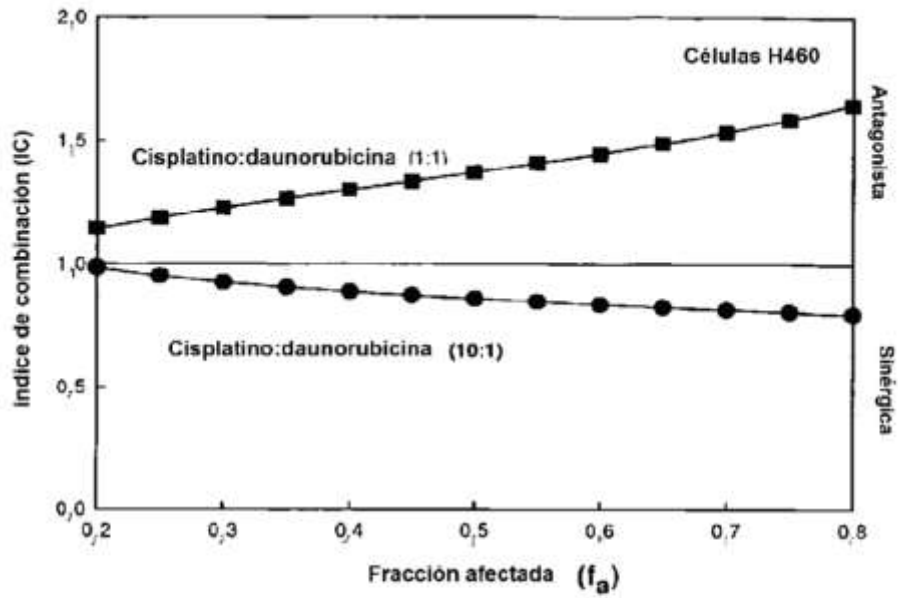


Figura 4C

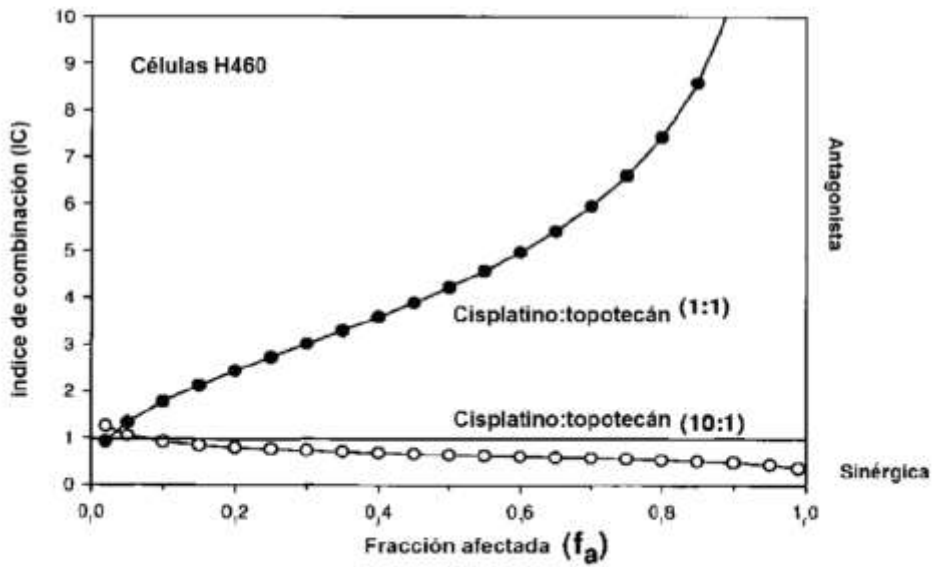


Figura 4D

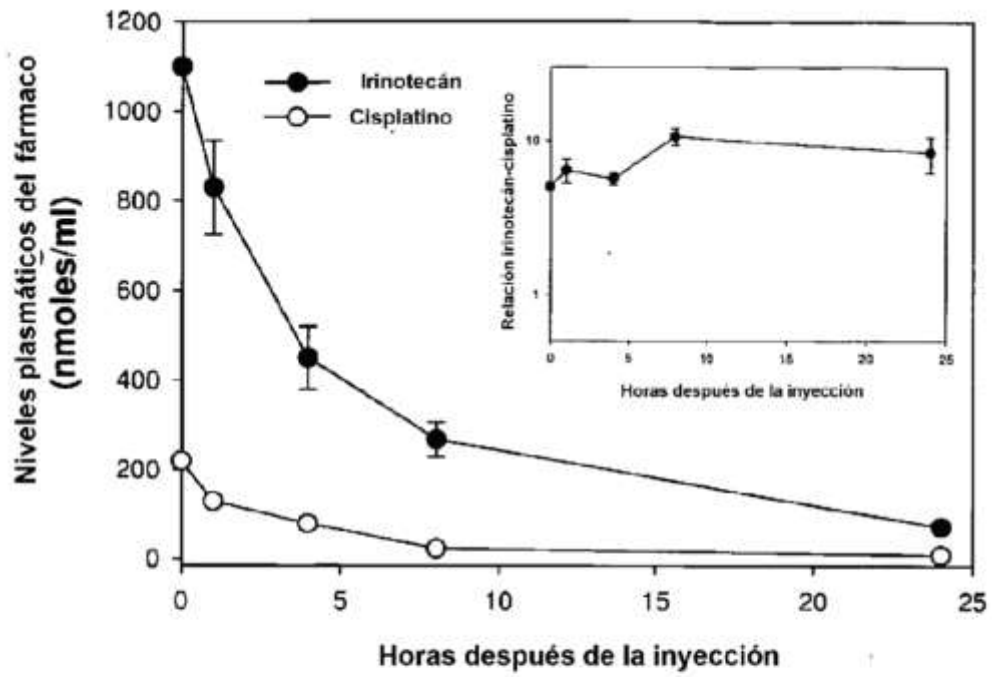


Figura 5

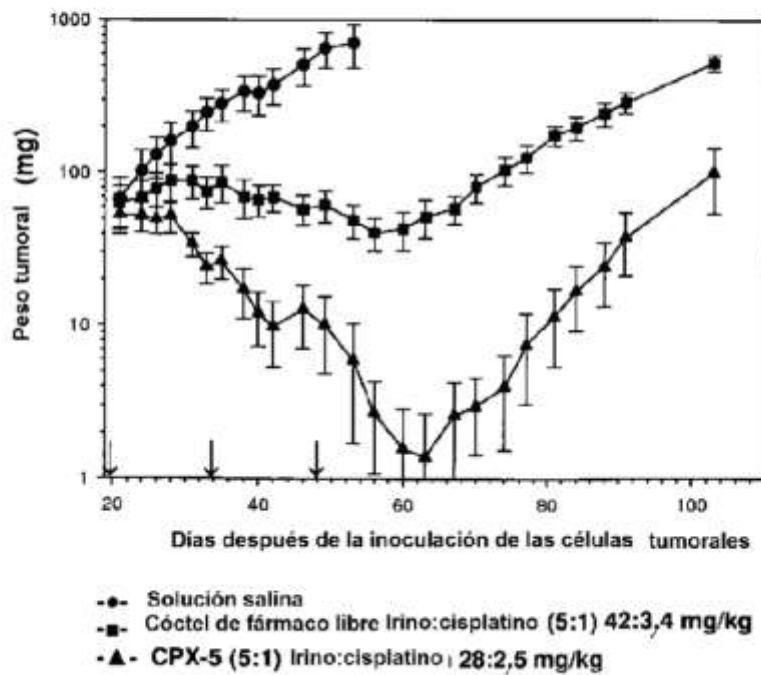


Figura 6A

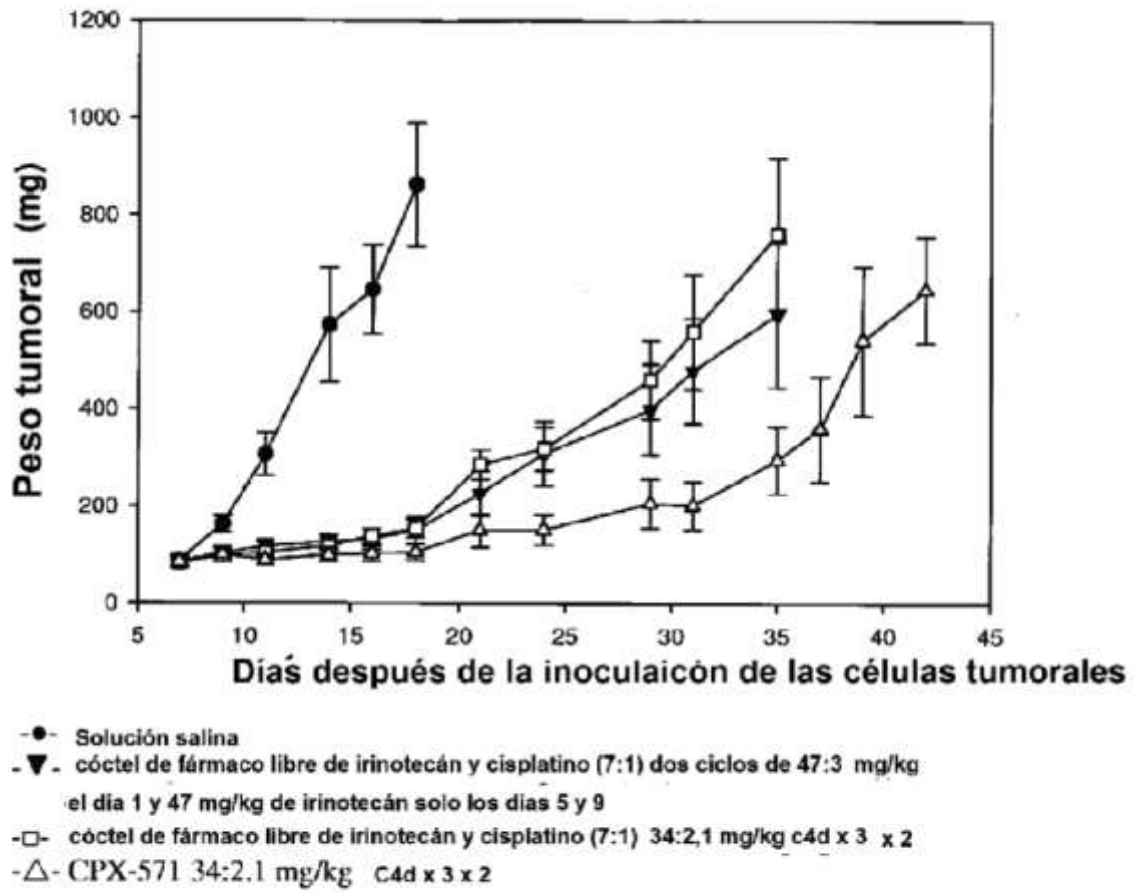


Figura 6B

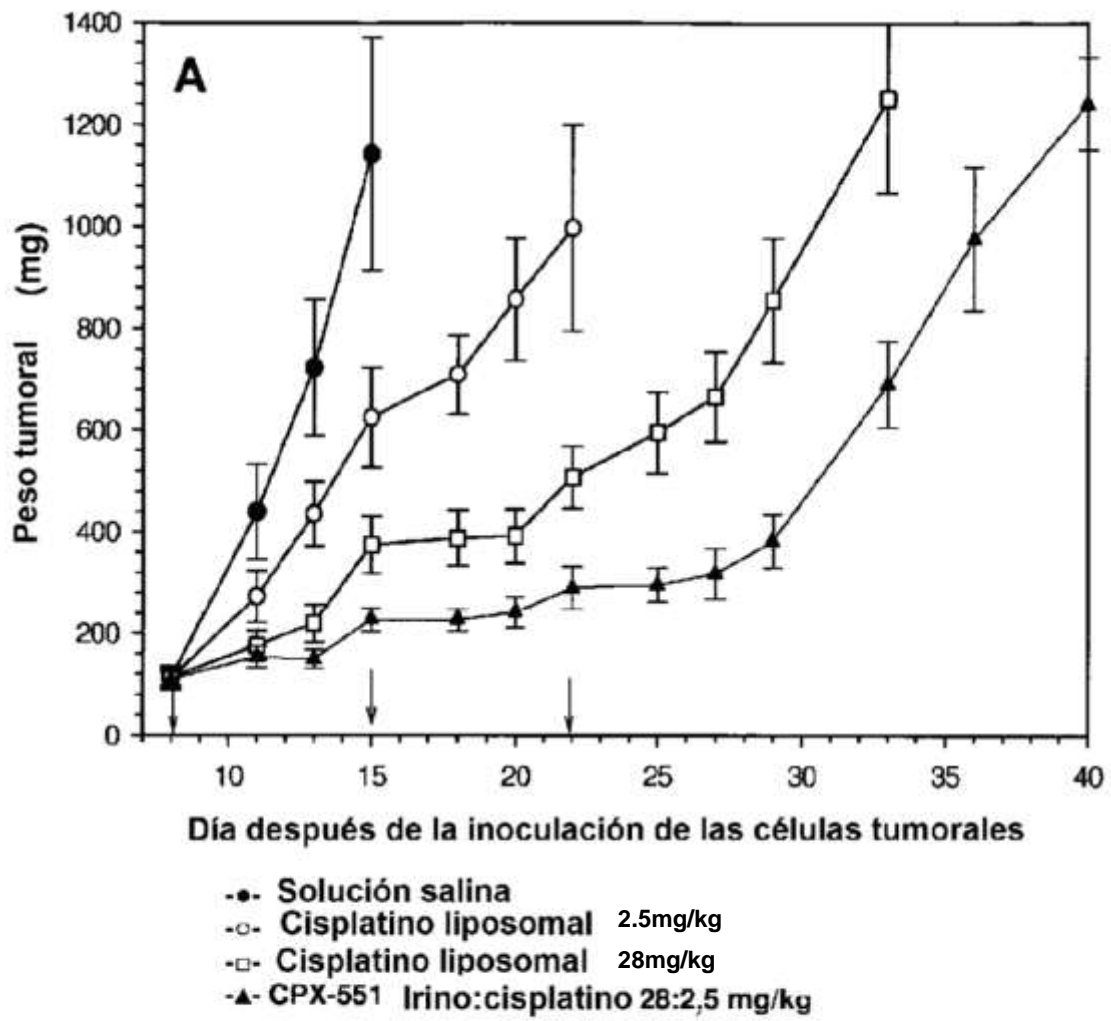


Figura 7A

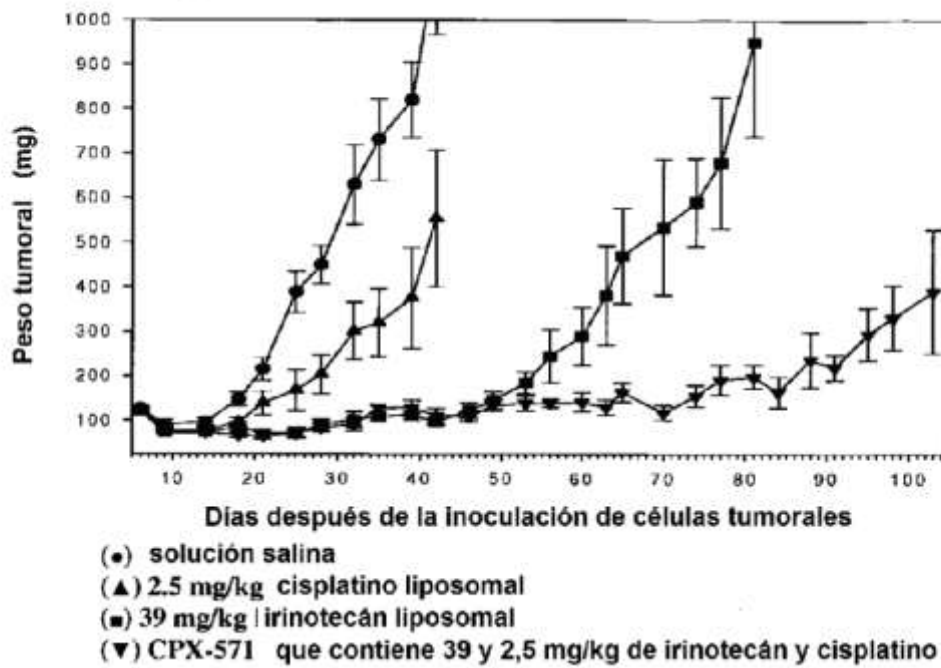


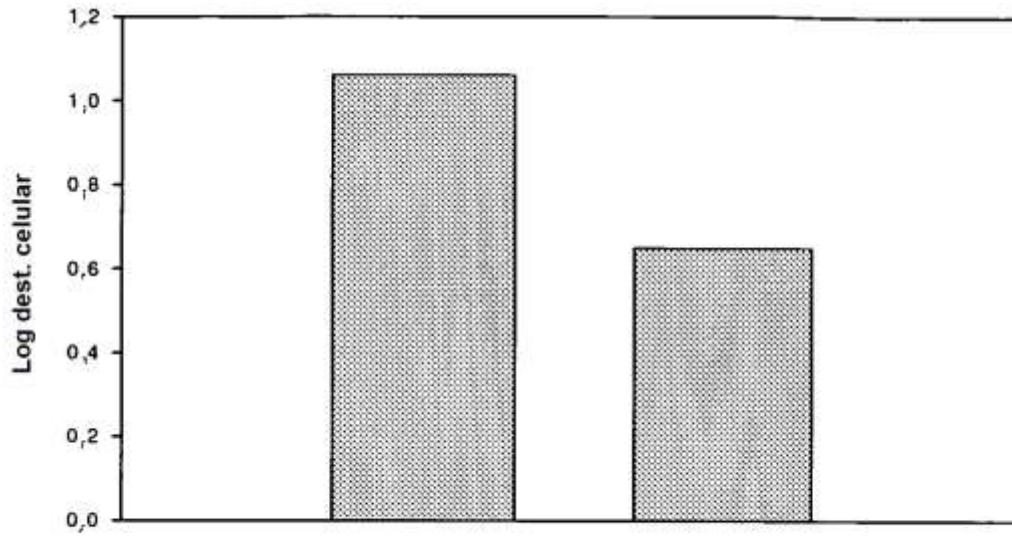
Figura 7B

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Retraso del crecimiento (Días)	% Retraso del crecimiento $\% (T-C)/C^A$	Log_{10} dest. celular B (LCK)
Lipo-Irinotecán	39	38	149%	1,95
Lipo-Cisplatino	2.5	14	55%	0,72
CPX-571	39:2,5	78	304%	4,0

^A basado en tumores para alcanzar 400 mg

^B Fórmula $(T-C)/(3.32)(T_d)$ T_d - Tiempo duplicación del tumor

Figura 7C



Relación	1:5	2:1
Irino (mg/kg)	1,5	15
Cis (mq/kg)	3,3	3,3

Figura 8