PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes 6 :		(11) Número de publicación internacional:	WO 95/14459
A61K 9/127, 31/71	A1	(43) Fecha de publicación internacional:	1 de Junio de 1995 (01.06.95)

(21) Solicitud internacional: PCT/ES94/00127

(22) Fecha de la presentación internacional: 25 de Noviembre de 1994 (25.11.94)

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9302481 25 de Noviembre de 1993 (25.11.93) ES

(81) Estado designado: JP.

Publicada
Con informe de búsqueda internacional.

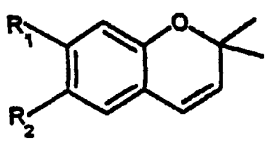
(71) Solicitante: LIPOTEC, S.A. [ES/ES]; Santa Eulalia, 236-240, E-08902 L'Hospitalet de Llobregat (ES).

(72) Inventores: PONS LAMBIEZ, Fernando; Pintor Fortuny, 28-30, E-08750 Molins (ES). DELGADO GONZALEZ, Raquel; Pedret, 5, E-08031 Barcelona (ES). PARENTE DUEÑA, Antonio; Passeig Can Sagrera, 17-21, E-08960 San Just Desvern (ES).

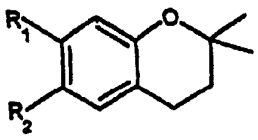
(74) Mandatario: GOMEZ-ACEBO Y POMBO, José, Miguel; Clarke, Modet & Co., Avenida de los Encuartes, 21, E-28760 Tres Cantos (ES).

(54) Title: LIPOSOMES FOR THE ENCAPSULATION OF DOXORUBICINE

(54) Título: LIPOSOMAS ENCAPSULANDO DOXORUBICINA



(A)



(B)

(57) Abstract

The liposomes for the encapsulation of doxorubicine contain, incorporated in said liposomes, a protector compound having the general formula A or B, in order to reduce the toxicity of the drug when it is intravenously administered; in said formulas R_1 and R_2, which are similar or different, represent independently HO-, CH_3O- or CH_3CH_2O-.

(57) Resumen

Liposomas encapsulando doxorubicina, que contienen, incorporado en los mismos, un compuesto protector de fórmula general A o B, para reducir la toxicidad del fármaco cuando se administra de forma intravenosa, y en cuyas fórmulas: R_1 y R_2, iguales o diferentes representan independientemente HO-, CH_3O- o CF_3CH_2O-.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	**GB**	Reino Unido	**MR**	Mauritania
AU	Australia	**GE**	Georgia	**MW**	Malawi
BB	Barbados	**GN**	Guinea	**NE**	Níger
BE	Bélgica	**GR**	Grecia	**NL**	Paises Bajos
BF	Burkina Faso	**HU**	Hungria	**NO**	Noruega
BG	Bulgaria	**IE**	Irlanda	**NZ**	Nueva Zelandia
BJ	Benin	**IT**	Italia	**PL**	Polonia
BR	Brasil	**JP**	Japón	**PT**	Portugal
BY	Belarús	**KE**	Kenya	**RO**	Rumania
CA	Canadá	**KG**	Kirguistán	**RU**	Federación Rusa
CF	República Centroafricana	**KP**	República Popular Democrática de Corea	**SD**	Sudán
CG	Congo			**SE**	Suecia
CH	Suiza	**KR**	República de Corea	**SI**	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kazajstán	**SK**	Eslovaquia
CM	Camerún	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Senegal
CN	China	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Chad
CS	Checoslovaquia	**LU**	Luxemburgo	**TG**	Togo
CZ	República Checa	**LV**	Letonia	**TJ**	Tayikistán
DE	Alemania	**MC**	Mónaco	**TT**	Trinidad y Tabago
DK	Dinamarca	**MD**	República de Moldova	**UA**	Ucrania
ES	España	**MG**	Madagascar	**US**	Estados Unidos de América
FI	Finlandia	**ML**	Mali	**UZ**	Uzbekistán
FR	Francia	**MN**	Mongolia	**VN**	Viet Nam
GA	Gabón				

LIPOSOMAS ENCAPSULANDO DOXORUBICINA.

La presente invención se relaciona con agentes antineoplásicos y en particular con la encapsulación de los mismos en liposomas que contienen un agente antirradicales libres para reducir la toxicidad del fármaco.

ANTECEDENTES.

El antibiótico doxorubicina (DXR) y sus derivados, así como otras antraciclinas catiónicas presentan actualmente un gran interés clínico para el tratamiento de tumores, tanto leucemias como tumores sólidos.

Por otra parte, se han centrado grandes esperanzas en torno a los liposomas como sistemas de transporte de agentes bioactivos. En estos sistemas la droga se incorpora en los espacios acuosos liposomales cuando es hidrofílica o se distribuye entre éstos y las bicapas lipídicas cuando presenta un mayor carácter lipofílico. Una vez encapsulada la droga, puede ser administrada al paciente a tratar.

Ha quedado establecido por diversos investigadores que el empleo de liposomas para la administración de antineoplásicos mejora en muchos casos los métodos tradicionales de administración, ver por ejemplo: Gabizon et al.: Cancer Res. (1982) 42, 4734-4739 y Van Hossel et al.: Cancer Res. (1984) 44, 3698-3705.

Se ha observado mediante la utilización de diversos modelos animales que la encapsulación de doxorubicina en liposomas reduce significativamente los efectos secundarios de toxicidad, tanto crónicos como agudos. Ver, a título de ejemplo, Rahman et al.: Cancer Res. (1980) 40, 1532-1537, Forssen et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78, 1873-1877, Olson et al.: Eur. J. Cancer Clin. Oncol. (1982) 18, 167-176, Rahman et al.: Cancer Res. (1985) 45, 796-803 y Gabizon et al.: J. Natl. Cancer Inst. (1986) 77, 459-467. Adicionalmente, otros indicadores de toxicidad, tales como la alopecia, pérdida de peso, náuseas, vómitos, y así como la necrosis dermal producida por extravasación pueden ser reducidos de una forma

significativa por la administración de doxorubicina en liposomas. Forssen et al.: Cancer Treat. Rep. (1983) 67, 481-484, ver además las referencias citadas anteriormente en este párrafo.

Asimismo, ha quedado establecido en diversos modelos tumorales que esta significativa reducción de la toxicidad no se produce a expensas de una disminución de la eficacia antitumoral. Además de las referencias reseñadas anteriormente, ver Rahman et al.: Chemoter. Pharmacol. (1986) 16, 22-27, Gabizon et al.: Cancer Res. (1983) 43, 4730-4735 y Br. J. Cancer (1985) 51, 681-689, Maythew et al.: J. Natl. Cancer Inst. (1987) 78, 707-713, Forssen et al.: Cancer Res. (1983) 43, 546-550, y Storm et al.: Cancer Res. (1987) 47, 3366-3372.

La cardiomiopatía observada en tratamientos con doxorubicina es similar a las lesiones vistas en el músculo cardíaco en animales de experimentación bajo condiciones de deficiencia de alfa-tocoferol, Tomasz: Chem-Biol Interct. (1976) 13, 89. Estos resultados sugieren que las lesiones producidas por el fármaco están causadas por un aumento de reacciones radicalarias en las que se ven involucrados lípidos de membrana. Por tanto, la incorporación de DXR en las bicapas lipídicas de los liposomas puede facilitar el desencadenamiento de tales reacciones.

Se ha observado que la incorporación de alfa-tocoferol en liposomas que contienen DXR reduce la toxicidad en animales y produce menos cardiomiopatía que cuando se administran combinaciones de alfa-tocoferol/DXR o liposomas/DXR de forma separada, Olson et al.: Eur. J. Clin. Oncol. (1982) 18(2), 167. La reducción de toxicidad conseguida por medio de la coencapsulación de alfa-tocoferol y DXR en liposomas parece resultar de una combinación de la alteración en la biodistribución del fármaco, debido a la encapsulación del mismo en liposomas, y a una reducción del efecto dañino de los radicales libres, debido a la captación de éstos por el alfa-tocoferol.

Diferentes patentes describen la inclusión de agentes antirradicales libres en liposomas:

WO 85/00968, WO 85/04578, WO 87/02219, WO 87/04592, WO 88/09168 y, EP 274 174.

En la mayoría de las patentes citadas se reivindica en general la presencia de alfa-tocoferol, sus sales y/o ésteres, aunque otros compuestos como N-acetilcisteína, niacina, isocitrato o BHT han sido también reivindicados.

Por lo tanto, la búsqueda de compuestos con actividad mejorada como inhibidores de la peroxidación lípida es un campo activo de investigación. En este sentido, una familia de análogos de la vitamina E con una excelente actividad de eliminación de radicales libres ha sido descrita por Battoni et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. (1991) 174, 1103. En el mismo contexto, en la presente patente se describe la actividad inhibidora de la peroxidación lipídica de compuestos con estructura de 2,2-dimetilcromenos y cromanos, que son potencialmente aplicables para la estabilización de preparaciones en las que se incorporen antraciclinas en liposomas, resultando en una reducción notable de los efectos indeseados del fármaco.

RESUMEN DE LA INVENCION.

A la vista del estado anterior de la técnica, es un objetivo general de esta invención el obtener una formulación para antraciclinas en liposomas, conteniendo en los mismos inhibidores de la peroxidación lipídica de fórmula general A o B (Figura 1).

Un objetivo de la invención es proporcionar una composición de antraciclinas en liposomas que reduzca sustancialmente los efectos de peroxidación tanto de los lípidos como del fármaco.

Un objetivo principal de esta patente es la obtención de una composición de doxorubicina, sus sales y análogos en liposomas, para reducir la toxicidad del fármaco, la cual está relacionada con reacciones de oxidación y radicales libres.

Un objetivo final de la invención es proporcionar un método para tratar neoplasmas humanos, y particularmente, tumores primarios o metastáticos en hígado, desordenes proliferativos hematopoyéticos y leucemias con DXR encapsulada en liposomas con una reducción significativa de los efectos secundarios normales del fármaco.

La invención incluye la formación de liposomas caracterizados por:

a) Una concentración lipídica entre 10 y 100 mg/ml, y preferiblemente alrededor de 50 mg/ml.

b) Los lípidos componentes son fosfolípidos, tanto de origen natural como sintético, y colesterol.

c) La proporción de colesterol, con respecto a la cantidad de lípidos totales, está entre el 0 y el 50%, de preferencia entre el 35 y 50%.

d) Los fosfolípidos presentes son fosfatidilcolina, que no presenta carga neta, y otro fosfolípido cargado negativamente, de preferencia el fosfatidilglicerol.

e) La relación del fosfolípido neutro al cargado negativamente está comprendida entre el 10 : 2 y 10 : 10 y de preferencia entre 10 : 7 y 10 : 10, respectivamente.

f) La relación de agente protector de fórmula general A o B (Fig. 1) a lípidos está comprendida entre el 0.01 y 15%.

g) Los liposomas se forman en una solución acuosa, tamponada o no, fisiológicamente isotónica. Por ejemplo, NaCl 0,9%

Las características de la suspensión liposomal encapsulando doxorubicina, así obtenida, son las que se relacionan a continuación:

a) Cumplen las características citadas.

b) El porcentaje de fármaco encapsulado está entre un 70 y 90% de la cantidad inicial.

c) Es estable, reproducible e industrializable con respecto a su tamaño y a la cantidad de doxorubicina encapsulada.

d) La suspensión liposomal, en estas condiciones, es utilizable en la terapia del cáncer.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS ADJUNTOS.

La figura 1 ilustra las fórmulas de los cromenos (1-4), cromanos (5-9) y compuesto de referencia (BHT, 10) estudiados como inhibidores de la peroxidación lipídica.

La figura 2 es un gráfico del efecto del tiempo de incubación sobre la inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas de hígado de rata incubados con NADPH presentada por los cromenos 5, 6, 8 y 9 a las concentraciones de 15, 1, 6 y 5 μM, respectivamente. Los valores mostrados son la media ± SD de determinaciones realizadas por sextuplicado. La diferencia entre horas consecutivas están marcadas por asteriscos:* $P<0.001$, ** $P<0.005$.

La figura 3 es un gráfico del incremento de la peroxidación lipídica en liposomas de PC de soja en función del tiempo de irradiación con UVC y la presencia de antioxidantes lipofílicos.

La figura 4 representa curvas de supervivencia en ratones BALB/C sanos para la administración i.p. de L(C6), L(C6)-DXR y F-DXR.

La figura 5 representa curvas de supervivencia en ratones BALB/C sanos para la administración i.v. de L(C6), L(C6)-DXR y F-DXR.

La figura 6 representa curvas de supervivencia en ratones B6D2F1 sanos para la administración i.p. de L-C6), L(C6)-DXR y L-DXR.

En los dibujos adjuntos, las abreviaturas tienen los siguientes significados:

DXR : Doxorubicina
PC : Fosfatidilcolina
PL : Fosfolípidos de huevo hidrogenados
DPPC : Dipalmitoilfosfatidilcolina
PG : Fosfatidilglicerol
DPPG : Dipalmitoilfosfatidilglicerol

CHOL : Colesterol

F-DXR : DXR libre

L-DXR : DXR encapsulada en liposomas

L(C6)-DXR: DXR encapsulada en liposomas que contienen cromano 6

L(C6) : Liposomas que contienen cromano 6 (no contienen DXR)

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION.

Preparación de liposomas conteniendo doxorubicina (DXR).

a) Componentes lipídicos.

Los lipídicos formadores de liposomas son ampliamente conocidos. Generalmente se incluyen fosfolípidos, con carga neta neutra y/o negativa, y un esterol, como el colesterol. La elección de los lípidos se realiza en base a las necesidades respecto al tamaño liposomal final, a la droga a encapsular y a la estabilidad que se desee para la preparación. Usualmente, el mayor componente lipídico de los liposomas es la fosfatidilcolina (PC). Las PCs difieren entre si en la longitud y grado de saturación de sus cadenas acílicas y pueden ser aisladas de fuentes naturales o sintetizadas. La inclusión de un fosfolípido cargado negativamente favorece a la estabilidad de la solución liposomal previniendo la agregación espontánea de los liposomas. Los fosfolípidos con carga negativa mas utilizados son el fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilinositol (PI), entre otros. La proporción utilizada, de fosfolípido neutro a fosfolípido con carga negativa va desde un 10: 2 a 10:10 respectivamente. La inclusión de colesterol generalmente favorece la estabilidad de los liposomas haciendo disminuir la permeabilidad de la membrana a iones y pequeñas moléculas polares, y asimismo, reduce la capacidad de penetración de una serie de proteínas entre las bicapas que podrían determinar un mayor desorden en las mismas. Típicamente, la proporción de colesterol utilizada va del 0 al 50% del

total de lípidos.

b) Inhibidores de la peroxidación lipídica.

Los compuestos descritos en la presente invención como inhibidores de las reacciones de peroxidación lipídica son una serie de 2,2-dimetilcromenos y cromanos de fórmulas generales A y B (Fig.1), respectivamente y que de preferencia obedecen a las fórmulas químicas (1-9) presentadas en la Fig.1. De entre éstos, los compuestos fluorados y en especial los compuestos 3, 4, 8 y 9 no han estado descritos previamente en la literatura.

En vistas a los resultados obtenidos en el EJEMPLO 1 de la presente invención, queda suficientemente demostrado el potente efecto inhibidor de la peroxidación lipídica que presentan los compuestos citados. Adicionalmente, una apropiada combinación entre la protección contra el metabolismo oxidativo mediante la introducción de sustituyentes fluorados en posiciones seleccionadas y la existencia de un grupo hidroxilo libre en C6 (ya presente o potencialmente generado a través de desalquilación metabólica) conduce a inhibidores de la peroxidación lipídica presentando mas actividad persistente intrínseca, compuestos 6 y 9, o a una eficiencia antioxidante mas metabólico-dependiente, compuestos 5 y 8.

La utilización de este tipo de compuestos en liposomas para reducir la toxicidad de la DXR queda claramente demostrada en los EJEMPLOS 4 y 5. La inclusión del cromano 6 en liposomas que contienen DXR determinan una reducción significativa de la toxicidad con respecto al fármaco libre, Fig. 4 y 5. Asimismo, se reduce la toxicidad de la DXR encapsulada con respecto a liposomas que no contienen el cromano 6, Fig.6.

c) Preparación de los liposomas.

Un método preferido es el que presentaron Bangham et al.: J.Mol.Biol.(1964) 8, 660-668 en el que se obtienen liposomas multilamelares (MLVs) de tamaño heterogéneo. En este método los lípidos formadores se disuelven en un

disolvente orgánico adecuado que posteriormente es eliminado por rotaevaporación bajo vacío. La película lipídica formada se somete a hidratación con un medio acuoso adecuado conteniendo el fármaco, mediante agitación manual o mecánica. La suspensión heterogénea de MLVs se somete a cualquiera de las técnicas conocidas de reducción y homogeneización de tamaños. Por ejemplo, dos procedimientos preferidos son la sonicación con sonda de filtros de policarbonato de la solución de MLVs para obtener liposomas VETs.

A título ilustrativo pero no limitativo del procedimiento de obtención detallado en la presente invención, se describen a continuación ejemplos prácticos.

EJEMPLO 1

a) Evaluación de la peroxidación lipídica en microsomas de hígado de rata.

Incubaciones. Suspensiones de microsomas de hígado de rata macho Sprage-Dawley en tampón fosfatos Krebs-Ringer (KRP), fueron preparados de acuerdo con el método de Fraga et al.: Free Radical Biol. Med. (1988) 4, 155-161. Para las experiencias de peroxidación lipídica inducidas enzimáticamente, proteína microsomal (2 mg) en 1 ml de tampón KRP fue incubada durante 1h. a 37°C en presencia de 0.1 mM NADPH Y 2 µl de DMSO conteniendo el compuesto a evaluar a la concentración apropiada. En las experiencias donde se prolongaron las incubaciones hasta 3 horas, se adicionaron cada hora 0.1 ml de NADPH 2 mM al medio de incubación. Para las experiencias de peroxidación lipídica inducidas químicamente, 2 mg de proteína microsomal en 1 ml de tampón KRP fueron incubados durante 30 min a 37°C en presencia de $FeSO_4$ 50 µM, ácido ascórbico 0.5 mM y 2 µl de DMSO conteniendo el compuesto a evaluar a la concentración apropiada. En todos los casos, las incubaciones se detuvieron por adición de 0.2 ml de BHT al 4%.

Test de TBARS. Cuando las incubaciones estuvieron completadas, se evaluó la peroxidación lipídica mediante la

producción de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) según describió Fraga et al.: Free Radical Biol. Med. (1988) 4, 155-161. Brevemente, 0.5 ml de dodecil sulfato sódico al 3% fue adicionado a alícuotas de 0.5 ml de las incubaciones microsomales. Después de mezclarlas, se adicionaron 2 ml de HCl 0.1 N, 0.3 ml de ácido fosfotúngstico, y 1 ml de ácido 2-tiobarbitúrico. La mezcla se mantuvo 30 min a 100°C, y las TBARS se extrajeron con 3 ml de 1-butanol. Después de centrifugar, se determinó la fluorescencia de la fase de butanol excitando a 515 nm y leyendo a 555 nm. Los valores obtenidos se expresaron como nanomoles de TBARS (equivalentes de malondialdehído). Los patrones de malondialdhído se prepararon a partir de 1,1,3,3- tetrametoxipropano. Las experiencias se realizaron por triplicado. Los valores de IC_{50} se determinaron por representación del porcentaje de inhibición vs log [I], utilizando como mínimo cinco concentraciones diferentes. Los valores de los porcentajes de inhibición fueron referidos a la determinación llevada a cabo en presencia de DMSO (2 µl).

En la tabla I se muestran los resultados de la inhibición de la peroxidación lipídica presentados por varios 2,2-dimetilcromanos y cromanos, fluorados o no, en incubaciones de microsomas de hígado de rata inducidas por NADPH o estimuladas por Fe-ascorbato, expresados como valores de IC_{50} para la inhibición de la producción de TBARS.

Los valores para BHT, compuesto 10, fueron también determinados a efectos comparativos.

TABLA I

	IC_{50} TBARS production (µM)	
compound	NADPH	Fe-ascorbate

1	11.4	(35 %)[a]
2	1.4	3.8
3	55.4	ND[b]
4	3.7	6.0
5	15.0	(17 %)[a]
6	0.3	1.9
7	3.4	19.0
8	6.0	(5 %)[a]
9	3.9	5.3
10	0.8	2.7

[a] Los valores entre paréntesis representan los porcentajes de inhibición calculados a una concetración 0.5 mM. [b] No determinado.

La hipótesis de que la inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas de hígado de rata en las incubaciones con NADPH causada por una familia de 2,2-dimetilcromenos y cromanos es debida a un mecanismo de eliminación de radicales libres análogo al que opera en el modo de acción de la vitamina E queda fundamentado con los resultados que se muestran en la presente invención. Así, respecto a los derivados no fluorados sólo aquéllos con un grupo hidroxilo libre (i.e. 2, 6 y 7) presentaron un potente efecto inhibidor cuando la peroxidación lipídica fue inducida por Fe-ascorbato (tabla I). Estos efectos fueron 6 veces menores que los obtenidos en los ensayos dependientes de NADPH. Una relación similar fue obtenida con BHT (10), compuesto ensayado a título comparativo, indicando que las discrepancias observadas fueron debidas a diferencias intrínsecas entre ambos métodos. Por otra parte, la ausencia de metabolismo desalquilante en las incubaciones con Fe-ascorbato previno la formación de especies fenólicas, en consecuencia, los 6,7-alcoxi derivados (compuestos 1 y 5) fueron inactivos bajo dichas condiciones.

Como sucedió con las incubaciones con NADPH, el

hidroxicromano 6 fue el que presentó mayor poder inhibidor en los ensayos con Fe-ascorbato (IC_{50}= 1.9 μM), y su actividad fue también superior que la del BHT (IC_{50}= 2.7 μM). Adicionalmente, el hecho de que la inhibición causada por el compuesto 6 fue de un orden de magnitud mayor que la del compuesto 7 (como pasó en las pruebas con NADPH), indicó la importancia de un grupo hidróxilo libre en la posición C6 para un fuerte efecto antioxidante. Estos resultados están en concordancia con la hipótesis de un mecanismo de acción similar al de la vitamina E.

Con respecto a los cromenos fluorados, el hidroxi derivado 4 exhibió la mayor actividad inhibidora en las incubaciones con NADPH (tabla I). Por tanto, su detección como metabolito en las incubaciones con NADPH podría justificar la actividad inhibidora mostrada por el 6,7-dialcoxicromeno 3. Con respecto a las incubaciones con Fe-ascorbato, el compuesto 4 presentó una actividad inhibidora similar a la del compuesto no fluorado 2.

En lo referente a los cromanos fluorados, se observó que la actividad inhibidora mostrada por el cromano 8 (IC_{50}= 6.0 μM) fue 9 veces mayor que la correspondiente cromeno 3 (IC_{50}= 55.4 μM). Adicionalmente, la comparación de las actividades inhibidoras del compuesto 8 y de su análogo no fluorado 5 indica que la presencia del sustituyen fluorado en la posición C7 mejora el efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica. Por otra parte, cabe reseñar que el cromano 8 no presenta actividad inhibitoria per se (ver incubaciones con Fe-ascorbato, tabla I). Estudios realizados demostraron la presencia del cromano 9 como un metabolito del anterior. Puesto que el hidroxi derivado 9 presentó, en las incubaciones con NADPH, la mas alta actividad inhibitoria de los cromanos fluorados ensayados (IC_{50}= 3.9 μM), se reafirma la idea de éste como responsable de la potente actividad inhibidora mostrada por el 6,7-dialcoxicromano 8.

Adicionalmente, en las incubaciones en presencia

de Fe-ascorbato se confirmó que el hidroxiderivado fluorado 9 era un inhibidor de la peroxidación lipídica per se (IC_{50}= 5.3 μM). Sin embargo, la actividad inhibidora de este compuesto fue ligeramente inferior que la presentada por hidroxicromano 6.

A partir de los resultados anteriores se puede deducir que los 2,2-dimetilcromanos, fluorados o no, presentaban mas elevadas actividades inhibidoras de la peroxidación lipídica que sus correspondientes 2,2-dimetil-cromenos. Por tanto, cuatro de estos cromanos (i.e. compuestos 5, 6, 8 y 9) fueron escogidos para estudiar la persistencia de la actividad inhibidora. Estos inhibidores fueron incubados independiendientemente durante tres horas en presencia de NADPH empleando concentraciones cercanas a sus respectivos valores de IC_{50} y los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 2. En el caso de los compuestos no fluorados, mientras que el efecto inhibitorio mostrado por el cromano 5 permanece constante, la actividad del hidroxi-cromano 6 decrece significativamente después de la segunda y tercera hora de incubación. Este descenso puede ser el resultado del metabolismo desactivante sufrido por dicho compuesto en el medio de incubación. Por otra parte, el hecho de que la actividad del dialcoxicromano 5 permaneció esencialmente inalterada a lo largo de todo el experimento sugiere la constante producción de especies activas como antioxidantes a partir de dicho compuesto, es decir, el metabolito 6. En consecuencia, el compuesto 5 puede ser utilizado como inhibidor de la peroxidación lipídica con un modo de acción potencialmente sostenido.

En lo concerniente a los derivados fluorados, el efecto inhibidor producido por el cromano 8 fue ligeramente superior durante la segunda hora de incubación, lo que sugiere la producción continuada de una especie activa, es decir, el hidroxiderivado 9. La identificación de este compuesto como metabolito del compuesto 8 sostiene esta hipótesis. El significativo descenso de la actividad

inhibidora durante la tercera hora puede ser debido una deceleración del metabolismo desalquilante que conduce a la formación de especies con actividad antioxidante. Es interesante destacar que el descenso señalado no es significativo cuando se compara con el porcentaje de inhibición determinado para la primera hora de incubación ($P>0.005$). Por tanto, este cromano fluorado se presenta como un potente inhibidor de la peroxidación lipídica con un modo de acción sostenido.

Adicionalmente, como se ha observado con el hidroxicromano 6, la actividad inhibidora del compuesto 9 decrece durante la segunda y la tercera hora de incubación. Sin embargo, este descenso fue menos pronunciado que el obtenido para el compuesto 6, lo que no viene a indicar que la especie activa es mas persistente en el medio de incubación.

b) Evaluación de la peroxidación lipídica en liposomas.

Siguiendo, con menores modificaciones, el modelo propuesto por Pelle et al.: Annals of the New York Academy of Sciences (1989) 570, 491-494, se pesaron 27 mg de lecitina de soja y se adicionaron 1.5 ml de tampón fosfatos pH 7.4 (PBS). Los compuestos estudiados como protectores de la peroxidación lipídica se adicionaron disueltos en etanol en la cantidad necesaria para alcanzar un 1% molar con respecto a la lecitina presente. En todos los casos se obtuvieron liposomas multilamelares por agitación mecánica durante un minuto.

Una vez obtenidos, los liposomas tanto incorporando antioxidantes como los que no los incorporaban, fueron expuestos a radiación UVC (254 nm). Una muestra sin contener antioxidantes y no expuesta a la radiación se preparó como control. Se utilizó la radiación UVC porque produce efectos similares a los de la UVB pero en tiempos mas reducidos. Así por ejemplo, 1 hora de irradiación UVC produciría efectos similares a 7 horas de irradiación UVB.

Durante la exposición, se tomaron alicuotas a diferentes tiempos para determinar la peroxidación lipídica.

Test de TBARS. La peroxidación lipídica se realizó determinando espectrofotométricamente el incremento en la producción de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Brevemente, 0.2 ml de suspensión liposomal, 3 ml de ácido tricloroacético al 20% y 1 ml de ácido tiobarbitúrico al 1% fueron incubados a 100°C durante 25 min, posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min y se determinó la absorción a 532 nm.

Como se muestra en la Fig. 3, los liposomas irradiados exhiben una mayor producción de peróxidos lipídicos que el correspondiente control no sometido a la radiación UVC. Utilizando este modelo se comparó el poder de protección contra la peroxidación lipídica inducida por el cromano 6 con respecto a la vitamina E-acetato y al BHT, reconocidos antioxidantes lipofílicos. Los resultados indicaron que el cromano 6 y el BHT tienen un potencial inhibitorio de la peroxidación lipídica similar y que es notoriamente superior al mostrado por la vitamina E-acetato a la concentración ensayada.

EJEMPLO 2

Preparación de liposomas encapsulando DXR

Se preparó una solución clorofórmica conteniendo los lípidos seleccionados (tabla II) y 7.5 mg del cromano 6 en matraz esférico. Seguidamente se procedió a la eliminación del disolvente orgánico mediante rotaevaporación, adicionalmente las trazas de disolvente se eliminaron por paso de N_2 o por liofilización. La película lipídica así obtenida se hidrató, con 3 ml de solución de NaCl al 0,9% conteniendo DXR, por agitación en un vibromixer a intervalos de 30 seg., seguidos de reposo en un baño mantenido a 60°C durante el mismo tiempo y hasta una agitación efectiva de 10 min.. Así se obtuvo una dispersión liposomal conteniendo preferentemente vesículas multilame-

lares (MLVs). La solución liposomal se sonicó por irradiación ultrasónica mediante una sonda de titanio hasta que se observó un cambio en la turbidez. El protocolo de sonicación se llevó a cabo en tandas de 2 min. de sonicación y un minuto de reposo bajo atmósfera de N_2 en un baño de agua-hielo. Para eliminar las partículas de titanio producidas durante la sonicación se centrifugó 20 min. a 3000 rpm. La suspensión liposomal así obtenida contenía liposomas unilamerales pequeños (SUVs).

Alternativamente, la suspensión de liposomas multilamelares obtenidos según se ha descrito se sometió a extrusión a través de filtros de policarbonato de 0.4 y 0.20 µm de diámetro de poro sucesivamente, obteniendo liposomas denominados VET.

La determinación del porcentaje de encapsulación de DXR se realizó por columnación de una alícuota de la suspensión liposomal, a través de Sephadex G-50M utilizado NaCl 0.9% como eluyente.

En la tabla II se muestran los resultados de encapsulación para los diferentes métodos y composiciones empleados. A través de la observación de los mismos, cabe destacar que es necesaria la inclusión de un fosfolípido con carga negativa para obtener porcentajes de encapsulación elevados. Así, en liposomas MLVs o SUVs neutros, con presencia o no de colesterol, la encapsulación de DXR llegó como máximo a un 15% de la cantidad inicial del fármaco. Por contra, cuando incluyó fosfatidilglicerol en la composición lipídica los valores de encapsulación fueron superiores al 80% en todos los ensayos realizados donde la relación fosfatidilglicerol: DXR se mantuvo igual a 5:1.5. Cuando se incrementó la proporción de DXR en dicha relación a 5:3 resultó en una disminución del fármaco encapsulado, confirmando la necesidad de que en la preparación de liposomas exista una cantidad mínima de fosfolípido con carga negativa con respecto a la DXR a encapsular.

Por otra parte, se observó que tanto fosfolípidos

de origen natural, hidrogenados o no, como sintéticos dieron resultados de encapsulación similares con los métodos empleados.

TABLA II

TIPO	COMPOSICION	RELACION (mg)	% ENCAPSULACION
MLV	PC:DXR	150:15	10
MLV	PC:CHOL:DXR	100:50:15	14
MLV	PC:PG:CHOL:DXR	50:50:50:15	80
SUV	PC:CHOL:DXR	100:50:15	15
SUV	PL:PG:CHOL:DXR	50:50:50:15	88
SUV	PC:PG:CHOL:DXR	50:50:50:15	90
SUV	PC:PG:CHOL:DXR	50:50:50:30	55
SUV	DPPC:DPPG:CHOL:DXR	50:50:50:15	85
VET	PL:PG:CHOL:DXR	50:50:50:15	87
VET	PC:PG:CHOL:DXR	50:50:50:15	89
VET	DPPC:DPPG:CHOL:DXR	50:50:50:15	87

Las experiencias se realizaron en presencia de 7.5 mg del cromano 6.

EJEMPLO 3

Preparación de liposomas encapsulando DXR

Se procedió de forma análoga a lo descrito en el EJEMPLO 2 para la obtención de liposomas VETs utilizando una relación en peso de PL:PG:CHOL:DXR de 50:50:50:15 y variando el agente antioxidante empleado. Los resultados obtenidos muestran (tabla III) que no existen diferencias apreciables en los porcentajes de encapsulación cuando diferentes inhibidores de la peroxidación lipídica son utilizados.

TABLA III

TIPO	COMPUESTO	% ENCAPSULACION
VET	1	89
VET	2	85
VET	3	87
VET	4	84
VET	5	86
VET	6	87
VET	7	88
VET	8	90
VET	9	83

Composición: PL:PG:CHOL:DXR (50:50:50:15)

EJEMPLO 4

Estudios in vivo (I),

Según el Ejemplo 1, se prepararon liposomas VET de composición PL:PG:CHOL:DXR (50:50:50:15) y cromano 6 (7.5 mg).

Inoculación por vía intraperitoneal. Ratones BALB/C sano fueron tratados intraperitonealmente con dicha preparación, y comparadas las curvas de supervivencia (Fig.4) con la administración de fármaco libre a la misma dosis, 18 mg/kg. En el experimento se incorporó como control una preparación de liposomas, sin fármaco, de idénticas características y a la misma concentración lipídica que correspondería a los liposomas con DXR.

Inoculación por vía intravenosa. Ratones BALB/C sanos fueron tratados intravenosamente con la preparación de L-DXR descrita, y comparadas las curvas de supervivencia (Fig.5) con la administración de fármaco libre a la misma dosis, 16 mg/kg. En el experimento se incorporó como control una preparación de liposomas, sin fármaco, de idénticas características y a la misma concentración lipídica que correspondería a los liposomas con DXR.

Los resultados obtenidos de las curvas de

supervivencia, tanto en la inoculación i.p. como i.v., indicaron ausencia de toxicidad de los liposomas per se, es decir, de los que no contenían el fármaco. Asimismo, no se produjo mortandad cuando la DXR fue administrada en liposomas. Por contra, cuando las mismas dosis de DXR fueron inoculadas i.p. o i.v. en forma de fármaco libre, se observó un 100% de mortalidad durante la segunda semana posterior a la administración.

EJEMPLO 5

Estudios in vivo (II)

Según el Ejemplo 1, se prepararon liposomas VET de composición PL:PG:CHOL:DXR (50:50:50:15) y cromano 6 (7,5 mg).

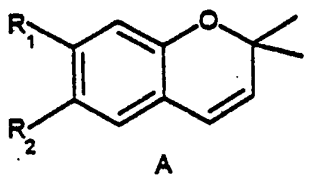
Análogamente, se prepararon liposomas VET de composición PL:PG:CHOL:DXR (50:50:50:15) sin incorporar el antioxidante.

Inoculación por vía intraperitoneal. Ratones B6D2F1 sanos fueron tratado intraperitonealmente con la preparación de L-DXR conteniendo el cromano 6, y comparadas las curvas de supervivencia (Fig. 6) con la administración de fármaco encapsulado, en ausencia del antioxidante, a la misma dosis de 24 mg/kg. En el experimento se incorporó como control una preparación de liposomas, sin fármaco pero con el cromano 6, de idénticas características y a la misma concentración lipídica que correspondería a los liposomas con DXR.

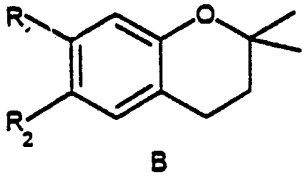
Los resultados obtenidos de las curvas de supervivencia indicaron ausencia de toxicidad de los liposomas per se, es decir, de los que no contenían el fármaco. Asimismo, se observó una clara disminución de la toxicidad de la DXR en la preparación liposomal que contenían el cromano 6, pasando de una supervivencia del 20% en ausencia de éste a una supervivencia del 60% en su presencia.

REIVINDICACIONES

1.- Liposomas encapsulando doxorubicina, caracterizados porque contienen, incorporado en los mismos, un compuesto protector de fórmula general A o B:



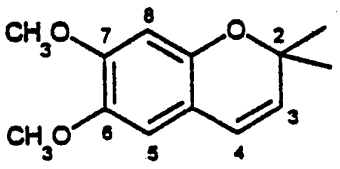
A



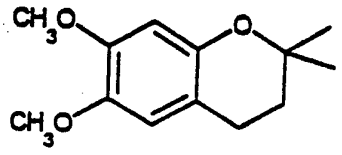
B

para reducir la toxicidad del fármaco cuando se administra de forma intravenosa, y en cuyas fórmulas: R_1 y R_2, iguales o diferentes, representan independientemente HO-, CH_3O- o CF_3CH_2O-.

2.- Liposomas encapsulando doxorubicina según la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto protector responde a la fórmula 1 ó 5:

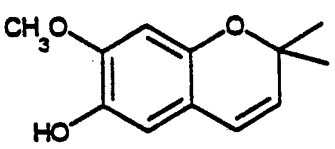


1

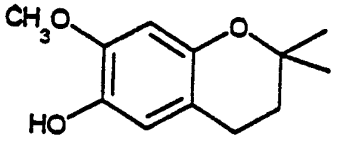


5

3.- Liposomas encapsulando doxorubicina según la reivindicación 1, caracterizados porque el compuesto responde a la fórmula 2 ó 6:

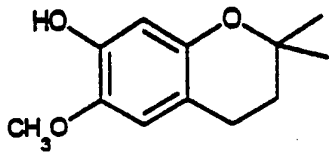


2



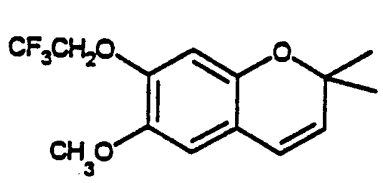
6

4.- Liposomas encapsulando doxorubicina según la reivindicación 1, caracterizados porque el compuesto protector responde a la fórmula 7:

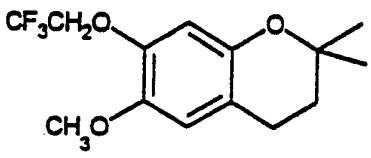


7

5.-Liposomas encapsulando doxorubicina según la reivindicación 1, caracterizados porque el compuesto protector responde a la fórmula 3 u 8:

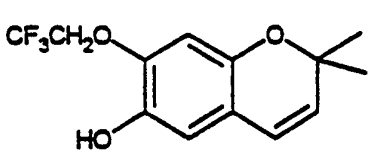


3

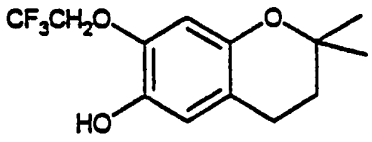


8

6.- Liposomas encapsulando doxorubicina según la reivindicación 1, caracterizados porque el compuesto protector responde a la fórmula 4 ó 9.



4



9

7.- Liposomas encapsulando doxorubicina según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizados porque la relación de lípidos totales formadores de los liposomas a droga está comprendida entre 20:1 y 2:1, y preferiblemente de 10:1.

8.- Liposomas encapsulando doxorubicina según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizados porque los lípidos componentes de los liposomas son fosfolípidos, tanto de origen natural como sintético, y colesterol.

9.- Liposomas encapsulando doxorubicina según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizados porque los fosfolípidos presentes son de preferencia fosfatidilcolina, que no

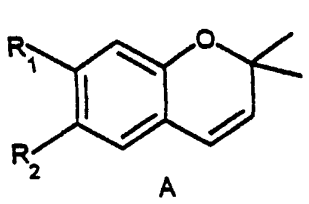
presenta carga neta, y otro fosfolípido cargado negativamente, de preferencia el fosfatidilglicerol.

10.- Liposomas encapsulando doxorubicina según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizados porque la relación del fosfolípido neutro y el cargado negativamente está comprendida entre el 10: 2 y 10:10, de preferencia entre 10:7 y 10:10, respectivamente.

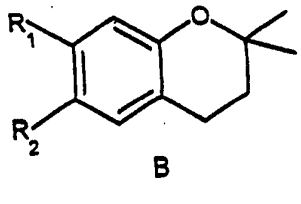
11.- Liposomas encapsulando doxorubicina según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizados porque la proporción de colesterol, con respecto a la cantidad de lípidos totales, está entre el 0 y el 50%, de preferencia entre el 35% y 50%.

12.- Liposomas encapsulando doxorubicina según las reivindicaciones 1 a 11, caracterizados porque el compuesto inhibidor de la peroxidación lipídica está presente en una proporción, con respecto a la cantidad de lípidos totales, que representa entre el 0.01 y el 15% de preferencia entre el 0.1 y el 10%

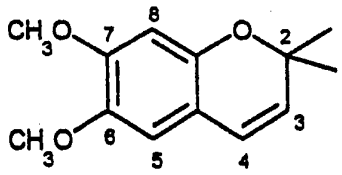
13.- Uso de los liposomas encapsulando doxorubicina según las reivindicaciones 1 a 12 para la administración en humanos u otros mamíferos para el tratamiento de tumores malignos.



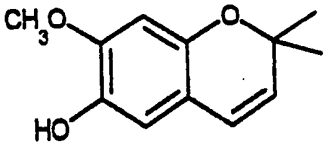
A



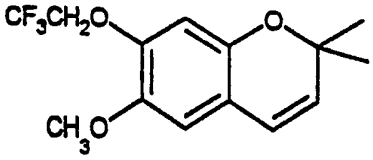
B



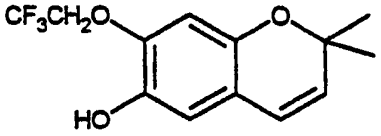
1



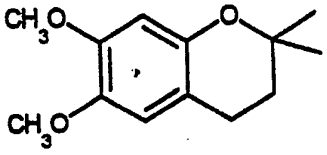
2



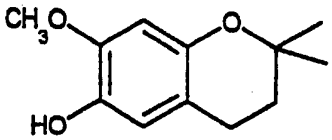
3



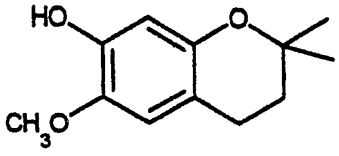
4



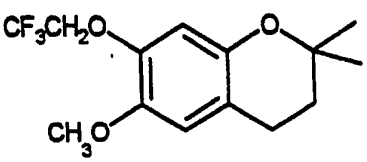
5



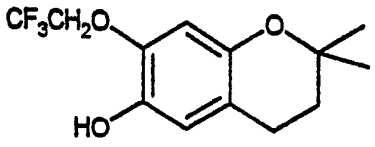
6



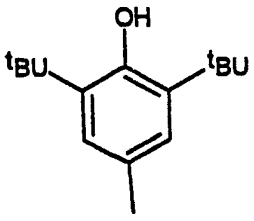
7



8



9



10

FIGURA 1

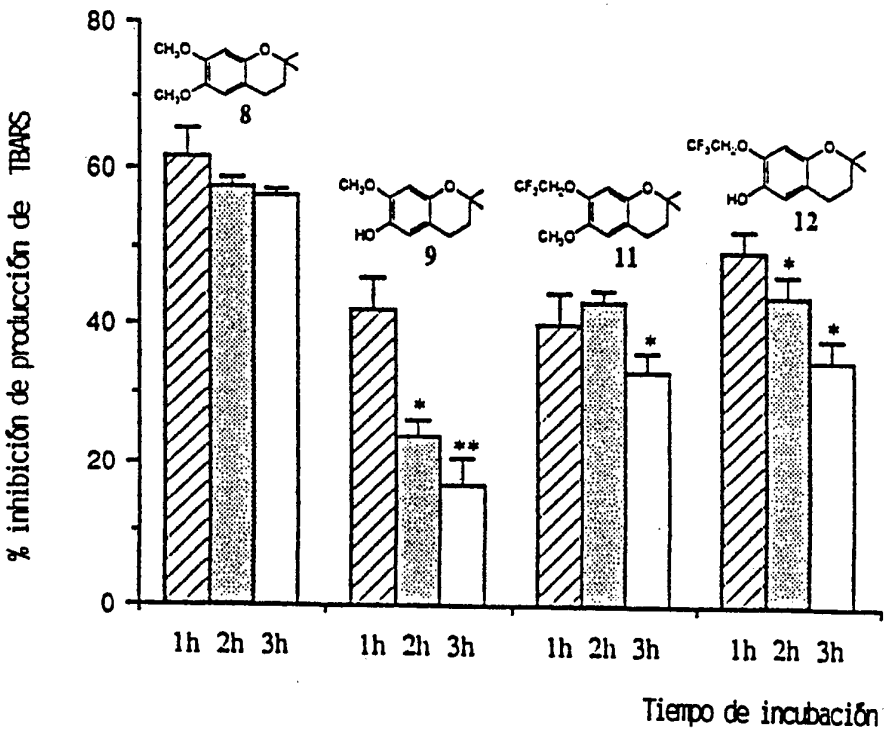

% inhibición de producción de TBARS
80
60
40
20
0
8
9
11
12
1h 2h 3h
1h 2h 3h
1h 2h 3h
1h 2h 3h
Tiempo de incubación

FIGURA 2

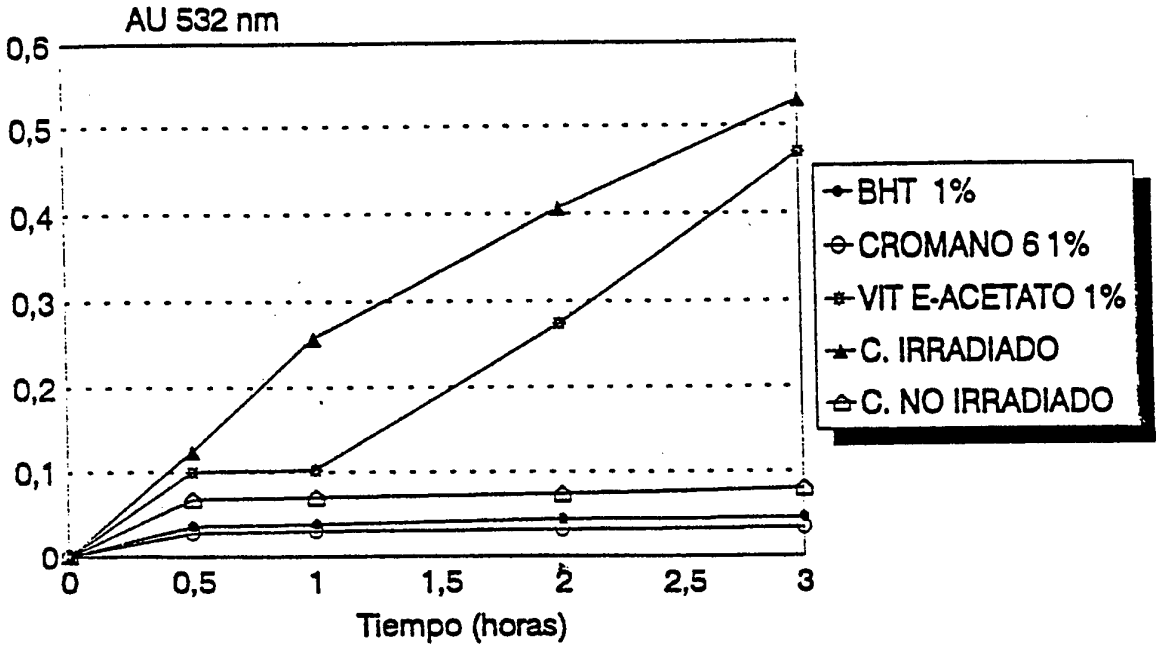

AU 532 nm
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
Tiempo (horas)
BHT 1%
CROMANO 6 1%
VIT E-ACETATO 1%
C. IRRADIADO
C. NO IRRADIADO

FIGURA 3

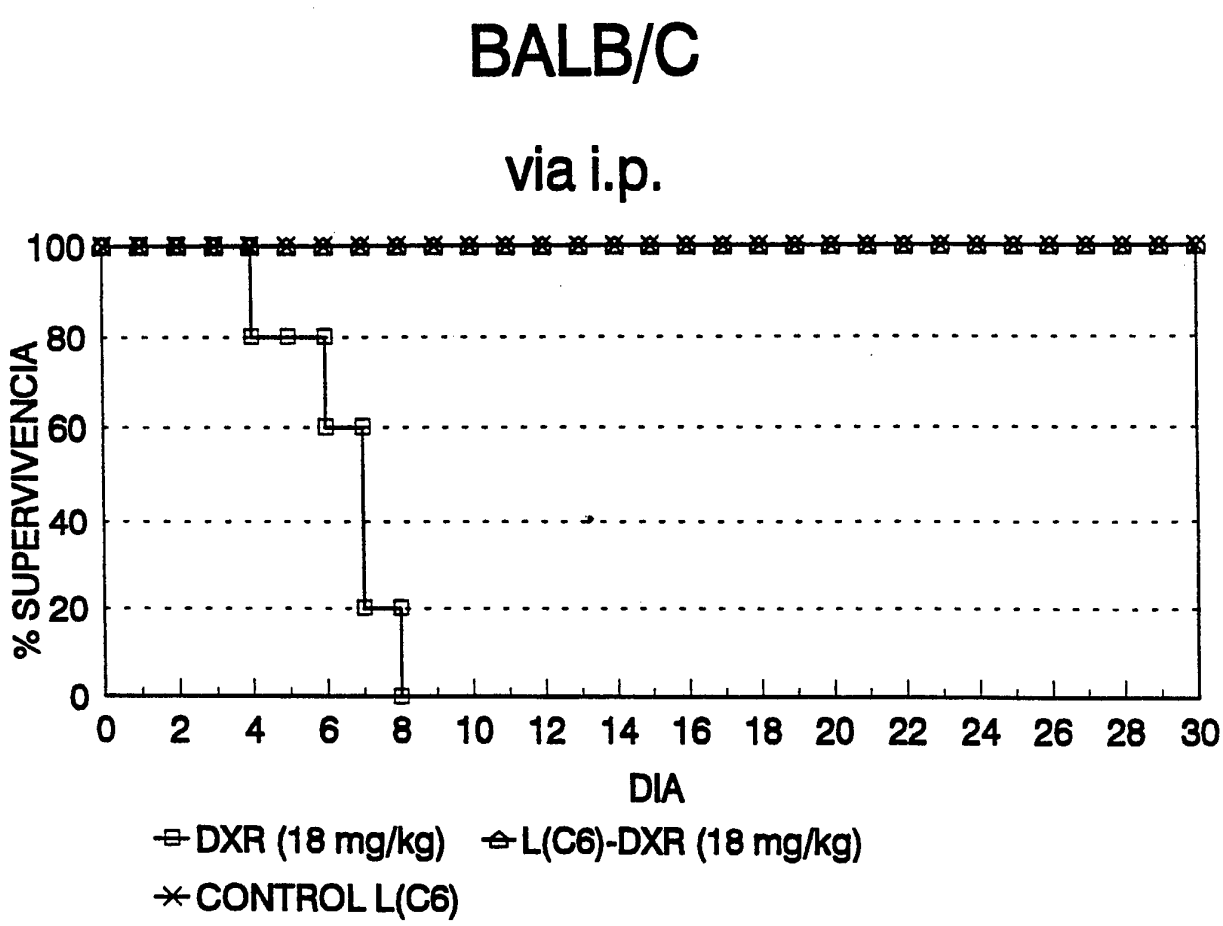

BALB/C
via i.p.
100
80
60
40
20
0
% SUPERVIVENCIA
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
DIA
DXR (18 mg/kg)
L(C6)-DXR (18 mg/kg)
CONTROL L(C6)

FIGURA 4

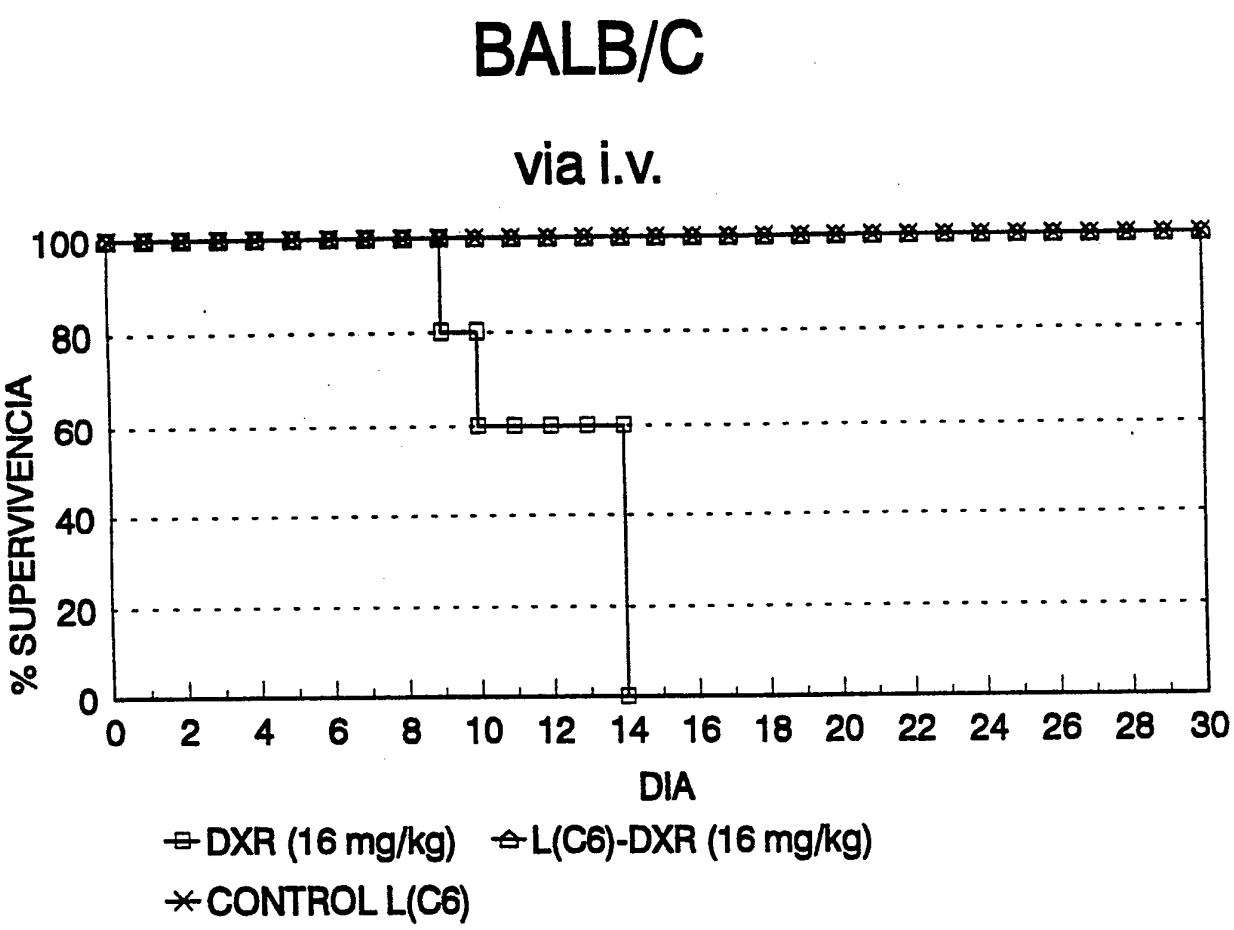

BALB/C
via i.v.
% SUPERVIVENCIA
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
DIA
DXR (16 mg/kg)
L(C6)-DXR (16 mg/kg)
CONTROL L(C6)

FIGURA 5

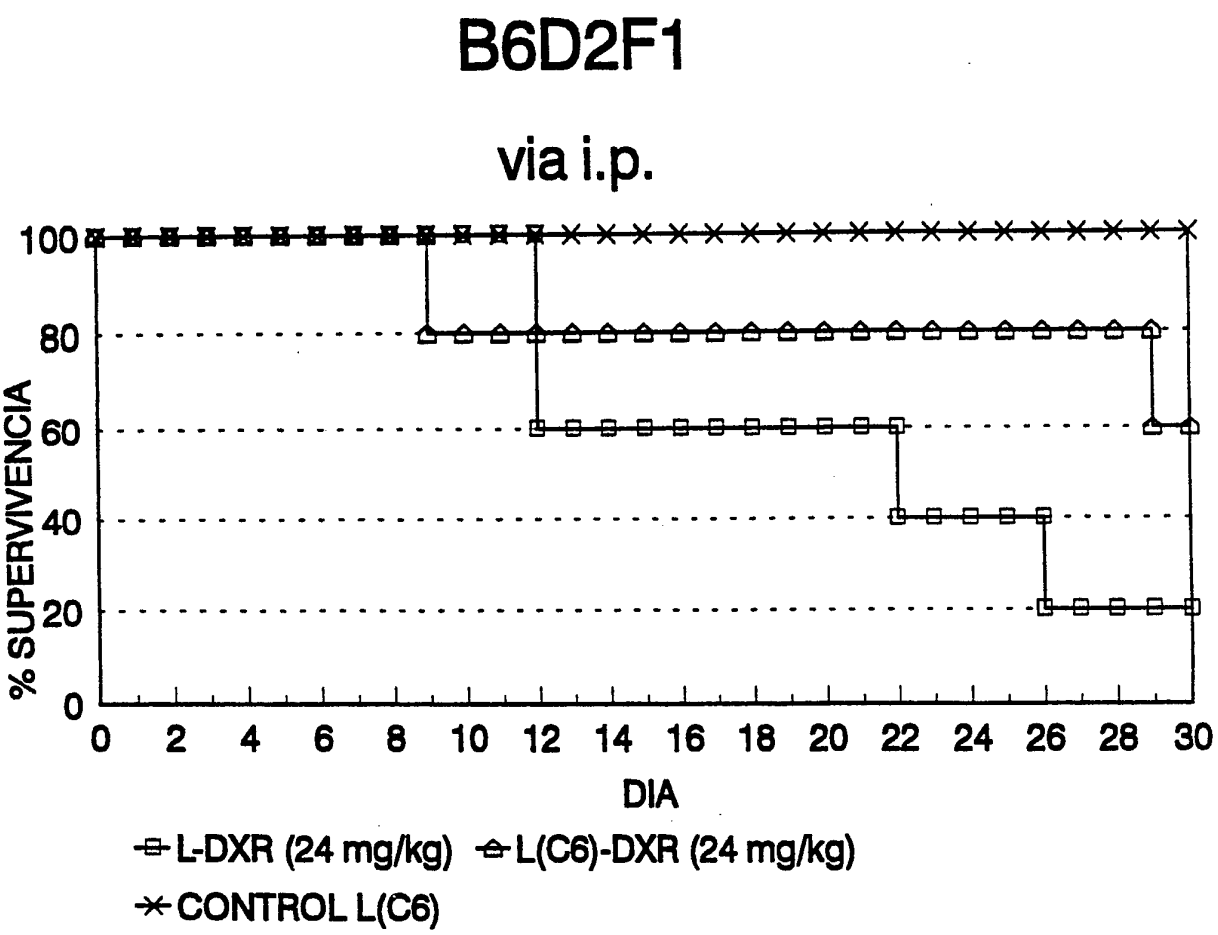

B6D2F1
via i.p.
% SUPERVIVENCIA
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
DIA
L-DXR (24 mg/kg)
L(C6)-DXR (24 mg/kg)
CONTROL L(C6)

FIGURA 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 94/00127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/127 A61K31/71

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 274 174 (YISSUM RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEB. UNIV. OF JERUSALEM) 13 July 1988 cited in the application see page 8; table IV see page 10, line 7 - line 16 ---	1-13
Y	BIOORG. MED. CHEM., vol.1, no.3, 2 October 1993, BARCELONA page 219-225 IRURRE J. ET AL 'INHIBITION OF RAT LIVER MICROSOMAL LIPID PEROXIDATION ELICITED BY 2,2-DIMETHYLCHROMENES AND CHROMANS CONTAINING FLUORINATED MOIETIES RESISTANT TO CYTOCHROME P-450 METABOLISM' see page 219; table 1 --- -/--	1,4-13

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 March 1995	15. 03. 95

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Boulois, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 94/00127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. AGRIC. ORG. CHEM., vol.40, no.4, 1992, BARCELONA pages 585 - 590 CASAS J. ET AL 'INHIBITION OF RAT LIVER MICROSOMAL LIPID PEROXIDATION ELICITED BY SIMPLE 2,2-DIMETHYLCHROMENES AND CHROMANS STRUCTURALLY RELATED TO PRECOCENES' see page 586; table 1 see page 589, column 1	1-4,7-13
A	WO,A,85 00968 (HEALTH RESEARCH INC) 14 March 1985 cited in the application see page 4, line 23 - line 27 see claim 5	1,7-13
A	WO,A,92 02208 (LIPOSOME TECHONOLOGY INC) 20 February 1992 see page 5, line 1 - line 11	1
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9232, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 92-259546 & CA,A,2 055 990 (GENZYME CORP) 23 May 1992 see abstract	1

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ES 94/00127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0274174	13-07-88	AU-B-	590378	02-11-89
		AU-A-	6755987	21-07-88
		JP-A-	63258423	25-10-88
		US-A-	4898735	06-02-90
		US-A-	5043166	27-08-91
		US-A-	4797285	10-01-89
WO-A-8500968	14-03-85	EP-A-	0153955	11-09-85
		US-A-	4873088	10-10-89
WO-A-9202208	20-02-92	AU-A-	8329391	02-03-92
		CA-A-	2088975	09-02-92
		EP-A-	0543871	02-06-93
		JP-T-	6502623	24-03-94

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solic. internacional N°
PCT/ES 94/00127

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION
CIP 6 A61K9/127 A61K31/71

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
CIP 6 A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	EP,A,0 274 174 (YISSUM RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEB. UNIV. OF JERUSALEM) 13 Julio 1988 citado en la solicitud ver página 8; tabla IV ver página 10, línea 7 - línea 16 ---	1-13
Y	BIOORG. MED. CHEM., vol.1, num.3, 2 Octubre 1993, BARCELONA página 219-225 IRURRE J. ET AL 'INHIBITION OF RAT LIVER MICROSOMAL LIPID PEROXIDATION ELICITED BY 2,2-DIMETHYLCHROMENES AND CHROMANS CONTAINING FLUORINATED MOIETIES RESISTANT TO CYTOCHROME P-450 METABOLISM' ver página 219; tabla 1 --- -/--	1,4-13

[X] En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

[X] Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentatión internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reinvindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

1

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional
3 Marzo 1995	15. 03. 95

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Boulois, D

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio de 1992)

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solic. Internacional N°
PCT/ES 94/00127

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría°	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	J. AGRIC. ORG. CHEM., vol.40, num.4, 1992, BARCELONA páginas 585 - 590 CASAS J. ET AL 'INHIBITION OF RAT LIVER MICROSOMAL LIPID PEROXIDATION ELICITED BY SIMPLE 2,2-DIMETHYLCHROMENES AND CHROMANS STRUCTURALLY RELATED TO PRECOCENES' ver página 586; tabla 1 ver página 589, columna 1	1-4,7-13
A	WO,A,85 00968 (HEALTH RESEARCH INC) 14 Marzo 1985 citado en la solicitud ver página 4, línea 23 - línea 27 ver reivindicación 5	1,7-13
A	WO,A,92 02208 (LIPOSOME TECHONOLOGY INC) 20 Febrero 1992 ver página 5, línea 1 - línea 11	1
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9232, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 92-259546 & CA,A,2 055 990 (GENZYME CORP) 23 Mayo 1992 ver resumen	1

1

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Soli Internacional N°
PCT/ES 94/00127

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
EP-A-0274174	13-07-88	AU-B-	590378	02-11-89
		AU-A-	6755987	21-07-88
		JP-A-	63258423	25-10-88
		US-A-	4898735	06-02-90
		US-A-	5043166	27-08-91
		US-A-	4797285	10-01-89
WO-A-8500968	14-03-85	EP-A-	0153955	11-09-85
		US-A-	4873088	10-10-89
WO-A-9202208	20-02-92	AU-A-	8329391	02-03-92
		CA-A-	2088975	09-02-92
		EP-A-	0543871	02-06-93
		JP-T-	6502623	24-03-94