

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 550**

51 Int. Cl.:

A61K 47/61 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2021** **PCT/IB2021/052870**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2021** **WO21205350**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2021** **E 21717556 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024** **EP 4132587**

54 Título: **Conjugado de HA-paclitaxel para el tratamiento del mesotelioma**

30 Prioridad:

10.04.2020 IT 20200007747

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2024

73 Titular/es:

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT

72 Inventor/es:

PIZZOCARO, CARLO y
ROSATO, ANTONIO

74 Agente/Representante:

MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela

ES 2 987 550 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

Conjugado de HA-paclitaxel para el tratamiento del mesotelioma

5 **Objeto de la invención**

La presente invención describe un conjugado de ácido hialurónico con paclitaxel y una composición que comprende o consiste en dicho conjugado asociado con diluyentes/excipientes farmacológicamente aceptables, para su uso en el tratamiento locorregional del mesotelioma, particularmente pleural maligno.

10

Campo de la invención

El término membrana o túnica serosa significa un tejido particular formado por un epitelio pavimentoso simple conocido como **mesotelio** sostenido por un tejido conectivo subyacente, vascularizado e innervado. La función de la serosa es recubrir los órganos del tórax y del abdomen, por ello se distingue en visceral, la capa o lámina que recubre el órgano, y parietal, la capa o lámina exterior que recubre y que está orientada hacia la pared; entre las dos capas se identifica una cavidad virtual conocida como cavidad serosa que contiene cantidades moderadas de líquido seroso producido por el mesotelio, mientras que el tejido conectivo subyacente proporciona un suministro de sangre y nervios estando el mesotelio completamente libre de vasos sanguíneos y nervios.

20

En función de la pared o el órgano recubierto, una serosa se distingue en:

- recubrir el corazón y el mediastino, conocido como pericardio;
- recubrir los pulmones y la pared torácica, conocida como pleura;
- recubrir la pared abdominal y los órganos contenidos en la misma, conocido como peritoneo;
- recubrir el testículo, conocido como túnica vaginal;
- recubrir por último el útero, conocido como perimetrio.

25

La pleura es, por lo tanto, una membrana serosa de doble pared que recubre y se adhiere a la pared interna del tórax con su lámina parietal y a la pared distal de cada pulmón con su lámina visceral.

30

La neoplasia que surge de las células del mesotelio se llama **mesotelioma** y, por lo tanto, puede originarse en el tórax, el abdomen y, de manera muy inusual, en la cavidad que rodea el corazón y en la membrana que recubre los testículos.

35

El mesotelioma es un tumor raro que representa menos del 1% de todas las enfermedades oncológicas, aunque su incidencia aumenta constantemente con 2,2 casos por millón de personas; es una neoplasia muy agresiva y la forma más común es la que afecta la pleura: en este caso se define como mesotelioma pleural maligno (MPM) que representa alrededor del 80% de todos los mesoteliomas, siendo más raros los mesoteliomas peritoneales, pericárdicos y testiculares; más frecuente en hombres, la incidencia del mesotelioma aumenta con la edad con un 75% de los pacientes mayores de 65 años.

40

El factor de riesgo más importante para el mesotelioma pleural (pero en general para todos los tipos de mesotelioma) está representado por la exposición al asbesto: de hecho, la mayoría de estos tumores afectan a personas que entraron en contacto con esta sustancia principalmente en el lugar de trabajo o conviviendo con personas que lo trabajan. El asbesto es un mineral natural de estructura fibrosa que pertenece a la clase química de los silicatos y, debido a su peculiar resistencia al calor, ha sido ampliamente utilizado en el pasado para sellado y aislamiento de tejados (en un material conocido como Eternit), barcos y trenes, en la construcción (tejas, suelos, pinturas...), en trajes de bombero, en automóviles (componentes mecánicos y pinturas) y en otros sectores.

50

Cuando este mineral se fragmenta, por ejemplo durante la extracción y procesamiento del mineral o por el desgaste del material que lo contiene, se produce un polvo muy fino que permanece suspendido en el aire incluso durante mucho tiempo y es fácilmente inhalado. Este polvo puede dañar las células mesoteliales causando (en algunos casos) cáncer incluso décadas después de la exposición. Otros factores de riesgo para el mesotelioma son:

55

- el virus simio SV40, utilizado en las vacunas contra la polio entre 1955 y 1963;
- dióxido de torio utilizado entre los años 1920 y 1950;
- radiaciones al tórax y al abdomen.

60

(Sekido Y. et al., Carcinogenesis, 2013, 34(7):1413-9; Remon J. Et al., Cancer Treat Rev, 2013, 39(6):584-91).

El tratamiento del mesotelioma depende en general del sitio del tumor, el estadio de la enfermedad, la edad del paciente y el estado de salud general. Las opciones de tratamiento estándar incluyen cirugía, radioterapia y

65

quimioterapia.

En general, en el MPM en estadio I, el tumor se limita a la pleura parietal y no está presente en los ganglios linfáticos; en el estadio II también afecta la pleura visceral, el pulmón o el diafragma; en el estadio III, el tumor ha invadido la primera capa de la pared torácica, parte del mediastino o un punto de la pared torácica; también puede afectar la superficie exterior del pericardio y los ganglios linfáticos de uno de los dos lados del tórax; en el estadio IV, el tumor ha alcanzado otros órganos (metástasis) como el hígado, el cerebro, los huesos o los ganglios linfáticos de ambos lados del tórax.

De acuerdo con estudios clínicos recientes, la quimioterapia puede considerarse como el único tratamiento capaz de prolongar (al menos en parte) la vida del paciente, mejorando aunque de forma limitada, su calidad. Los medicamentos aprobados para tal uso, comúnmente usados solos (o más a menudo en combinación), son pemetrexed (Alimta®), cisplatino y raltitrexed (Tomudex®); en cambio, la mitomicina, la vinorelbina y la gemcitabina todavía se encuentran en la etapa experimental; sin embargo, el mesotelioma pleural maligno MPM (al igual que todas las demás formas de mesotelioma) generalmente es refractario a tales tratamientos y los resultados obtenidos son modestos (Stahel RA et al, Ann Oncol., 2015, 26(8):1649-60). Los agentes quimioterapéuticos también tienen efectos secundarios muy debilitantes y, por lo tanto, existen muchas incertidumbres e incluso contraindicaciones sobre la oportunidad de iniciar la quimioterapia en el momento del diagnóstico o durante la aparición de los primeros síntomas de MPM.

En Sasai Masao et al., ANTICANCER RESEARCH, vol. 36, no. 3, páginas 907-912, se usa un conjugado de ácido hialurónico y un compuesto de boro en el tratamiento del mesotelioma.

Hasta la fecha no existe ninguna terapia capaz de tratar o ralentizar significativamente el mesotelioma pleural maligno, sólo es posible reducir su masa tumoral y, en consecuencia, prolongar la sobrevida del paciente por unos meses. Los procedimientos más exitosos involucran las etapas más tempranas de la enfermedad y combinan quimioterapia preoperatoria con procedimiento quirúrgico y radioterapia posoperatoria posterior. Sin embargo, este enfoque sólo puede proponerse a pacientes muy jóvenes sin enfermedades concomitantes. En cualquier caso, todavía no se dispone de estudios adecuados que demuestren un beneficio efectivo en términos de prolongación de la vida. Desafortunadamente, el tiempo medio de sobrevida después del diagnóstico sigue siendo de 6 a 9 meses sin quimioterapia y de 12 meses con dicha terapia.

Por las razones anteriores, se están probando nuevos enfoques farmacéuticos como, por ejemplo, la inmunoterapia o tratamientos directamente dirigidos al tratamiento de la neoplasia mediante el uso de sistemas de *administración de medicamentos*. De hecho, tales sistemas pueden transportar medicamentos directamente al sitio del tumor, permitiendo el tratamiento de la neoplasia con dosis más bajas de agente quimioterapéutico que un tratamiento sistémico, por lo tanto con una toxicidad menor y dando como resultado una mejor calidad de vida del paciente, pero especialmente, tales sistemas, cuando son realmente eficaces, son capaces de aumentar significativamente la esperanza de vida de un paciente con cáncer.

El ácido hialurónico es uno de los polímeros (y polisacáridos) utilizados en la formación de tales sistemas de administración de medicamentos, tanto como polímero asociado como polímero químicamente unido a numerosas categorías de fármacos antineoplásicos (Liao YH et al., Drug Deliv., 2005, 12(6):327-42). El HA es un heteropolisacárido compuesto por residuos alternantes de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, es un polímero de cadena lineal con un peso molecular comprendido entre 50.000 y 13×10^6 Da, dependiendo de la fuente de la que se obtiene y de los procedimientos de preparación utilizados. Está presente de forma natural en los geles pericelulares, en la sustancia esencial del tejido conectivo de los organismos vertebrados, en el líquido sinovial de las articulaciones, en el humor vítreo y en el cordón umbilical. El HA juega un papel importante en el organismo biológico, por ejemplo como soporte mecánico de las células de muchos tejidos como la piel, tendones, músculos y cartílagos, siendo el componente principal de la matriz extracelular, pero también desempeñando otras funciones tales como la hidratación de los tejidos, lubricación, migración y diferenciación celular (Weigel P. et al., J Theoretical Biol, 1986:219-234). Entre los sistemas de *administración de medicamentos* que utilizan el HA, el conjugado de paclitaxel con ácido hialurónico (HA) derivatizado con moléculas de hidrazida unidas al grupo carboxilo del HA a través de un enlace amida (Luo Y. et al., Biomacromolecules, 2000, 1(2) :208-218) es conocido; sin embargo, hasta la fecha no existen ensayos preclínicos o clínicos que hayan demostrado la efectividad de dicho derivado.

También se conoce el sistema constituido por el HA conjugado con paclitaxel mediante un espaciador (EP2045270): dicho conjugado ha sido probado *in vitro* (y particularmente en células de cáncer de vejiga, de cáncer de mama y de cáncer de ovario) demostrando ser al menos tan eficaz como activo como medicamento de referencia, y protocolos clínicos *in vivo* (actualmente en curso) sobre el tratamiento del cáncer de vejiga no invasivo (IT 102018000009731).

La conjugación con HA hace que el paclitaxel sea soluble y, por lo tanto, la administración de paclitaxel puede realizarse sin los múltiples fenómenos de hipersensibilidad que usualmente ocurren durante el uso del

medicamento debido a la presencia de Cremophor EL, el disolvente de solubilización actualmente utilizado en los protocolos clínicos estándar, cuya presencia es necesaria precisamente porque el principio activo es liposoluble (Taxol®). Paclitaxel es un agente anticancerígeno (Huizing MT et al., Cancer Inv., 1995, 13: 381-404) que realiza su acción antiproliferativa actuando sobre la organización de los microtúbulos del sistema citoesquelético celular impidiéndole la reorganización normal durante el proceso de división mitótica (Manfredi JJ et al., J Cell Biol, 1982, 94:688-696); sus principales indicaciones terapéuticas son el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de próstata y endometrio, y no comprende el tratamiento del mesotelioma.

En el conjugado de HA-paclitaxel, el enlace entre paclitaxel y HA permite que el fármaco alcance directamente la superficie de la membrana de la célula tumoral caracterizada por una sobreexpresión del receptor de HA, CD44 (Isacke CM et al., Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34:718-21). En consecuencia, el paclitaxel conjugado con HA es capaz de unirse específicamente al CD44 de la célula tumoral, siendo así capaz de entrar en el citoplasma celular donde, mediante la hidrólisis del enlace fármaco/HA, se activa. Este mecanismo de transporte selectivo del fármaco se define como "dirigido" hacia la célula diana.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es el conjugado de HA-paclitaxel para su uso en el tratamiento locorregional de mesotelioma, por lo tanto mesotelioma pleural maligno, mesotelioma pericárdico y mesotelioma peritoneal, en particular para su uso en el tratamiento de MPM, en el que dicho conjugado de HA-paclitaxel tiene un enlace éster entre el carboxilo del ácido hialurónico (HA) y un espaciador, unido a su vez mediante un enlace éster a través de su carboxilo al grupo hidroxilo al carbono C2' de paclitaxel, en el que el espaciador introducido es el ácido 4-bromobutírico, y en el que el grado de derivatización de paclitaxel en el conjugado de HA-paclitaxel está dentro del intervalo que varía del 15% al 21% peso/peso (p/p), y preferentemente del 16% al 20% p/p.

En lo sucesivo en la presente descripción, el grado de derivatización (o esterificación) del conjugado mencionado anteriormente significa el porcentaje en peso de paclitaxel con respecto al peso del conjugado de HA-paclitaxel.

Por lo tanto, 100 mg de conjugado con un grado de derivatización comprendido entre 15% y 21% p/p, contendrán 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg o 20 mg, o 21 mg de paclitaxel quimioterapéutico dependiendo del grado de derivatización indicado (para ejemplificar aún más esto, el grado de derivatización al 20% p/p contiene 20 mg de paclitaxel por 100 mg de conjugado); sin embargo, es obvio para el experto en la técnica que, al final de dichos procesos de síntesis industrial, puede producirse una pequeña variación en las relaciones en peso entre las moléculas, por lo que en lo sucesivo el Solicitante, que describe y reivindica el intervalo de derivatización del conjugado antes mencionado, comprende entre 15% y 21% p/p, pretende reivindicar todos los valores porcentuales reportados que comprenden $\pm 1\%$: a modo de ejemplo, el grado del 20% p/p debe entenderse por consiguiente como $20\% \pm 1\%$.

El conjugado de HA-paclitaxel para el uso anteriormente reivindicado fue preparado de acuerdo con un proceso de síntesis conocido en el estado de la técnica como se describe en EP2045270 y, para el grado de derivatización del 20%, mejorado en IT 10201800009731.

En términos generales, en dicho proceso de síntesis del conjugado mencionado anteriormente, el espaciador/enlazador ácido 4-bromobutírico es introducido entre el ácido hialurónico y el paclitaxel mediante la formación del enlace éster entre el carboxilo del ácido hialurónico y el espaciador, siendo dicho espaciador unido a su vez (siempre mediante enlace éster) a través de su carboxilo al grupo hidroxilo del carbono C2' de paclitaxel, más precisamente al grupo carboxilo del ácido 4-bromobutírico, mediante activación con un agente activador y en presencia de un catalizador, formar un enlace éster con la función hidroxilo al carbono C2' de paclitaxel; posteriormente el intermedio obtenido de este modo reacciona con una sal de HA, en condiciones adecuadas, dando lugar a la sustitución nucleófila de COO⁻ de HA al carbono unido al bromo del espaciador-enlazador. De esta manera, se forma el enlace éster entre el HA y el espaciador-enlazador previamente unido a paclitaxel.

El HA utilizado para la síntesis de dicho conjugado de HA-paclitaxel puede derivar de cualquier fuente, por ejemplo, mediante extracción de crestas de gallo (EP0138572, WO2018020458), por vía fermentativa (EP0716688), o por vía biotecnológica (EP2614088, EP2614087) y que tiene una peso molecular (MW) promedio en peso que oscila de 400 a 3×10^6 Da, particularmente de 400 a 1×10^6 Da, incluso más particularmente de 140.000 a 250.000 Da (peso molecular promedio en peso significa el calculado con el procedimiento de "viscosidad intrínseca" (Terbojevich et al., Carbohydr Res, 1986, 363-377).

Preferentemente, el HA usado para la síntesis del conjugado de HA-paclitaxel para su uso de acuerdo con la presente invención es un HA fermentativo con un MW promedio en peso comprendido entre 140.000 y 250.000 Da.

Preferentemente, el conjugado de HA-paclitaxel para su uso de acuerdo con la presente invención tiene un grado de derivatización promedio del 20% p/p.

Un objeto adicional de la presente invención es también una composición farmacéutica que consiste esencialmente en el conjugado de HA-paclitaxel descrito anteriormente, asociado con diluyentes/excipientes farmacológicamente aceptables, preferentemente una composición farmacéutica formulada en agua isotónica estéril, que contiene 5% p/v de glucosa para su uso en el tratamiento locorregional del mesotelioma, por lo tanto del mesotelioma pleural maligno, mesotelioma pericárdico y mesotelioma peritoneal, preferentemente para su uso en el tratamiento del mesotelioma pleural maligno.

De este modo, dicha composición farmacéutica se formula como una solución acuosa estéril e isotónica, que consiste esencialmente en el propio conjugado.

El Solicitante describe y reivindica el conjugado para el uso anterior en el tratamiento locorregional de todas las formas de mesotelioma conocidas y citadas anteriormente y preferentemente el uso en el tratamiento locorregional de MPM, ya que el efecto *sinérgico* de HA y paclitaxel unidos químicamente en el conjugado objeto de la invención, tanto en ensayos realizados *in vitro* como *in vivo* frente al paclitaxel no conjugado, se demuestra a continuación.

Los resultados obtenidos, tanto en términos de IC₅₀ para estudios *in vitro*, como expresados como valores de bioluminiscencia como índice del tamaño de la masa tumoral en los animales tratados, demuestran sorprendentemente la potencia farmacológica del conjugado de HA-paclitaxel y el efecto *sinérgico* del conjugado de ácido hialurónico con agente quimioterapéutico frente a paclitaxel no conjugado en el tratamiento del mesotelioma, en particular del mesotelioma pleural.

Tal resultado es aún más importante considerando el tratamiento locorregional que se pretende reivindicar para dicho conjugado: esta vía de administración, es decir, intrapleural o intraperitoneal e intrapericárdica, permite de hecho la administración del conjugado directamente a la masa tumoral a dosis más bajas/análogas o incluso superiores al agente quimioterapéutico de referencia, con el fin de obtener una eficacia terapéutica superior al *fármaco de referencia* manteniendo un alto perfil de seguridad.

De hecho, el conjugado de HA-paclitaxel permanece como *depósito* en la cavidad de administración directamente en contacto con la masa tumoral durante tiempos prolongados, permitiendo así su concentración principalmente en el sitio de acción (y no a nivel sistémico), maximizando de esta manera la interacción con el tumor sin dañar el tejido circundante, reduciendo los efectos secundarios. También se utiliza el mecanismo de transporte selectivo del fármaco a la célula tumoral para la alta expresión de CD44 en la superficie de dichas células, mediante la acción "dirigida" del ácido hialurónico.

Los ensayos con animales descritos a continuación demuestran especialmente la eficacia *in vivo* de dicho conjugado de HA-paclitaxel, en los que dicha eficacia dará como resultado en humanos no sólo un aumento de la sobrevida de las personas enfermas, sino también una mejor calidad de vida para una categoría de pacientes que, como se informó anteriormente, tienen una esperanza de vida extremadamente limitada incluso después del tratamiento de quimioterapia.

Ejemplo 1

Citotoxicidad del conjugado de HA-paclitaxel en células de mesotelioma frente a paclitaxel

Procedimiento experimental: la actividad citotóxica del conjugado de HA-paclitaxel objeto de la invención ha sido evaluada *in vitro* realizando el ensayo MTT en líneas celulares de mesotelioma humano disponibles comercialmente H2052, H28 y H2452, en el que todas de dichas líneas celulares expresan el receptor CD44 para ácido hialurónico. El conjugado utilizado para tal ensayo se preparó de conformidad con IT 102018000009731, por lo tanto con un grado de derivatización promedio del 20% p/p a partir de un HA fermentativo con un peso molecular promedio comprendido entre 140.000 y 250.000 Da.

Las células se sembraron en placas (Día 0) en *placas multipocillos* de 96 pocillos de fondo plano (3000 células por pocillo) en medio de cultivo EMEM (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EE. UU.) y posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37 °C en la presencia de 5% de CO₂. Al día siguiente (Día 1), el medio se cambió proporcionando a las células un medio EMEM fresco que contenía alternativamente paclitaxel, como control, o el conjugado de HA-paclitaxel en diluciones adecuadas. Después de dos días de incubación (Día 3), cada pocillo que contenía las células fue tratado con 100 µl de reactivo de bromuro de 3-2,5-difeniltetrazolio (5 mg/ml en DMEM) durante 90 minutos. Posteriormente, al retirar el reactivo de cada pocillo y la correspondiente adición de 100 µl de DMSO, se midió la absorbancia de la sal de formazán (azul, producida por la reacción de rotura del anillo de tetrazolio MTT, realizada por la enzima mitocondrial "succinato deshidrogenasa" presente sólo en las células viables) a la longitud de onda de 570 nm mediante un lector multiplacas. Dicho ensayo de MTT,

ampliamente conocido por el experto en la técnica, permite evaluar la viabilidad de las células tratadas con el conjugado frente a las tratadas con paclitaxel solo y, por lo tanto, determinar la susceptibilidad de las células mencionadas anteriormente a las muestras analizadas. Luego se normalizaron los datos para el control y se calculó el valor de IC₅₀ en µg/ml de conjugado (expresado en términos de equivalentes de paclitaxel) en comparación con paclitaxel no conjugado.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente en la que es claramente evidente que el conjugado de HA-paclitaxel muestra una actividad (por lo tanto una eficacia antitumoral) hasta 65-70 veces mayor que la del paclitaxel no conjugado.

IC₅₀ normalizada, µg/ml

	HA-paclitaxel	paclitaxel
H2452	0,0122	0,8
H28	0,033	0,787
H2052	0,0342	0,225

Ejemplo 2

Ensayo *in vivo* en ratones NSG inmunodeficientes

Las líneas celulares de mesotelioma humano H2052 fueron transducidas con un vector lentiviral (procedimiento mediante el cual los genes pueden insertarse en las células utilizando el lentivirus) que contiene un promotor bidireccional que permite la expresión alta y coordinada de dos genes indicadores para la síntesis de luciferasa y eGFP (*Proteína Fluorescente Verde mejorada*), como se describe en Amendola et al., Nat Biotechnol 2005, 23:108-16: la luciferasa es una enzima que cataliza la oxidación de la luciferina, cuya oxidación emite energía (electrones) en forma de radiación luminosa y dicha reacción tiene una sensibilidad ultra alta; la eGFP se deriva de la medusa *Aequorea victoria* y es capaz de emitir luz verde brillante cuando se expone a determinadas longitudes de onda; ambas proteínas se utilizan a continuación como "sistema marcador" para células de mesotelioma humano H2052 transducidas como anteriormente, con el fin de identificar la masa tumoral que se forma en animales inyectados con dichas células y determinar sus dimensiones y el crecimiento en el tiempo a través de un sensor de bioluminiscencia adecuado.

Las células se incubaron durante 6 horas en una mezcla de medio completo (RPMI + 10% FBS, 1% HEPES, L-glutamina y penicilina/estreptomicina) que contenía el vector mencionado anteriormente y sulfato de protamina. Al final de las 6 horas de incubación, los sobrenadantes se reintegraron con el medio completo. Después de 5 días, se evaluó el efecto de la transducción mediante citometría de flujo.

Luego, las células se expandieron y subdividieron con el fin de aislar la población con la expresión más alta de genes informadores. Luego, dichas células transducidas y seleccionadas se inyectaron en el peritoneo de ratones NSG (es decir, inmunodeficientes que, por lo tanto, permiten el injerto de una amplia gama de células cancerosas humanas), 10 ratones/muestra, que luego se sometieron al siguiente tratamiento:

- 1ª muestra tratada con HA-paclitaxel 40 mg/Kg, mediante administración locorregional intraperitoneal (**ip**);
- 2ª muestra tratada con paclitaxel 10 mg/Kg, mediante administración intravenosa (**iv**) durante 3 tratamientos, pasando luego a administración **ip** debido a la muy mala tolerabilidad del tratamiento **iv** con paclitaxel de ratones NSG;
- 3ª muestra tratada con paclitaxel 10 mg/Kg, mediante administración locorregional intraperitoneal (**ip**);
- 4ª muestra no tratada;

mediante administración semanal durante 10 semanas.

Todos los animales tratados fueron monitorizados mediante la detección de bioluminiscencia emitida por su zona tumoral tratada con conjugado de HA-paclitaxel, con el fin de evaluar en el tiempo, la dimensión (y, por lo tanto, el crecimiento) del tumor con referencia a animales no tratados con ningún agente quimioterapéutico y para aquellos tratados con paclitaxel no conjugado.

Los resultados han sido graficados en la Figura 1, en la que es claramente evidente que la luminiscencia (expresada en fotones/seg, Ph/seg) de los animales no tratados alcanza valores medios en el orden de magnitud de 1×10^{12} en el día 100 de supervivencia, indicando por lo tanto la dimensión/crecimiento alcanzado por el tumor no tratado; la 2ª y 3ª muestras, ambas tratadas con paclitaxel no conjugado con diferentes formas de administración, se comparan con la muestra controlada: esta comparación indica un resultado importante para ambas, ya que los valores promedio de luminiscencia alcanzados resultan ser del orden de magnitud de 1×10^{11} , por lo tanto menor

que no tratado, lo que indica una masa tumoral reducida en comparación con el control.

Sin embargo, el resultado del conjugado de HA-paclitaxel es totalmente sorprendente ya que desde el día 14 al 125 de sobrevida, la luminiscencia cae dramáticamente y permanece insignificante a lo largo del tiempo. Estos datos completamente inesperados muestran la reducción significativa del tumor tanto frente al control no tratado como frente a los animales tratados con un agente quimioterapéutico no conjugado administrado por vía intravenosa e intraperitoneal, lo que demuestra la eficacia total del propio conjugado. En la Figura 1, los datos de luminiscencia relacionados con el conjugado de HA-paclitaxel se representan en la tercera de las cuatro columnas correspondientes a los días de sobrevida informados en las abscisas.

En la Figura 2, en cambio, se informan los datos obtenidos después de 139 días de observación, donde es claramente evidente que la detección de bioluminiscencia en Ph/seg emitida por su zona tumoral tratada y, por lo tanto, representativa de la masa tumoral, permanece alrededor de $1-2 \times 10^{11}$ en ratones tratados con paclitaxel no conjugado, mientras que en ratones tratados con el conjugado dicho valor es extremadamente inferior y cercano a 0, lo que indica por lo tanto una reducción casi completa de la masa tumoral.

A través de los resultados comentados anteriormente, el Solicitante demostró la potencia farmacológica y, por lo tanto, la eficacia del conjugado de HA-paclitaxel en el tratamiento locorregional del mesotelioma, particularmente del MPM, mesotelioma peritoneal y pericárdico, ya que es capaz de determinar la reducción significativa de masa tumoral, aumentando en consecuencia la sobrevida del paciente y su calidad de vida.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de HA-paclitaxel para su uso en el tratamiento locorregional de mesotelioma, en el que dicho conjugado de ácido hialurónico-paclitaxel tiene un enlace éster entre el carboxilo del ácido hialurónico (HA) y un espaciador, a su vez unido por un enlace éster a través de su carboxilo al grupo hidroxilo al carbono C2' de paclitaxel, en el que el espaciador introducido es ácido 4-bromobutírico, en el que el grado de derivatización de paclitaxel en el conjugado de HA-paclitaxel está dentro del intervalo que varía del 15% al 21% peso/peso (p/p), y en el que el HA usado para la síntesis del conjugado de HA-paclitaxel es un HA fermentativo con un MW promedio en peso que oscila entre 140.000 y 250.000 Da.
2. El conjugado de HA-paclitaxel para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el mesotelioma es mesotelioma pleural maligno, mesotelioma pericárdico y mesotelioma peritoneal.
3. El conjugado de HA-paclitaxel para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el mesotelioma es mesotelioma pleural maligno.
4. El conjugado de HA-paclitaxel para su uso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la vía de administración es intrapleural, o intraperitoneal e intrapericárdica.
5. El conjugado de HA-paclitaxel para su uso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el grado de derivatización de paclitaxel en el conjugado de HA-paclitaxel oscila del 16% al 20% p/p.
6. El conjugado de HA-paclitaxel para su uso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el grado de derivatización de paclitaxel en el conjugado de HA-paclitaxel es igual al 20% p/p.
7. Una composición farmacéutica, que consiste esencialmente en un conjugado de HA-paclitaxel para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, asociado con diluyentes/excipientes farmacológicamente aceptables.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha composición farmacéutica se formula en agua isotónica estéril, que contiene 5% p/v de glucosa.

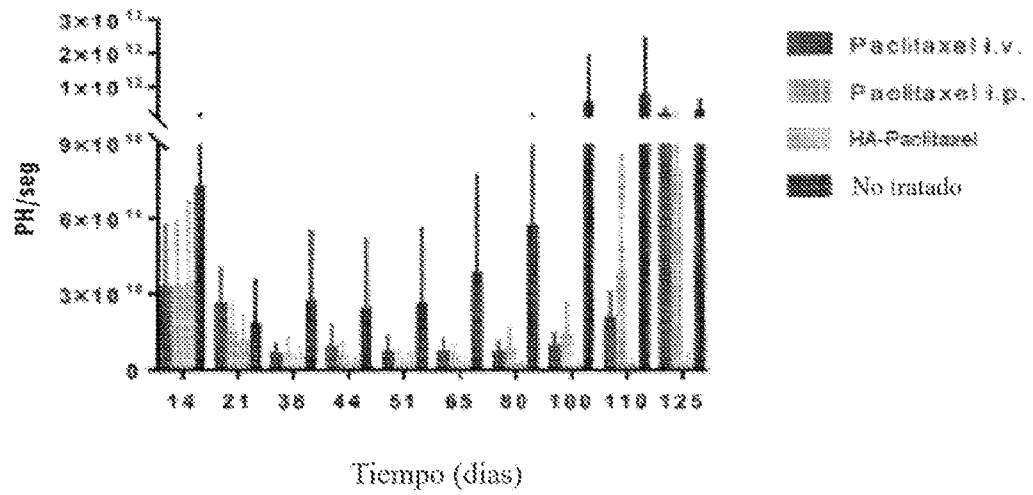


Figura 1

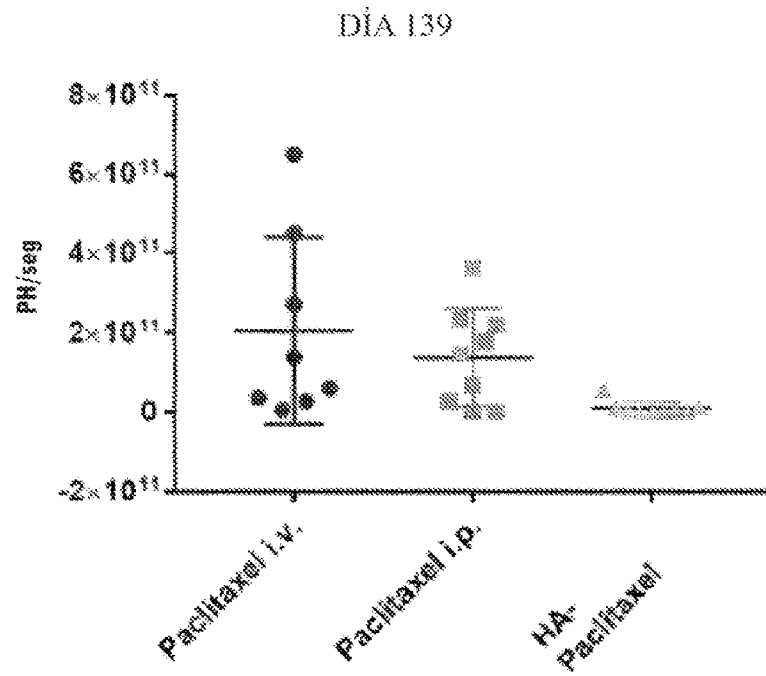


Figura 2