

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 106**

51 Int. Cl.:

A61P 35/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2013 PCT/EP2013/074794**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14083019**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2013 E 13811139 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 2928487**

54 Título: **Agente para uso en el tratamiento y/o la prevención de cáncer metastásico**

30 Prioridad:

27.11.2012 EP 12382468
29.01.2013 GB 201301571

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2021

73 Titular/es:

SERGAS (25.0%)
Edificio Administrativo San Lazaro
15707 Santiago de Compostela (A Coruña), ES;
UNIVERSITY OF SANTIAGO DE COMPOSTELA
(25.0%);
FUNDACIÓN RAMÓN DOMÍNGUEZ (25.0%) y
FUNDACIÓN PEDRO BARRIÉ DE LA MAZA,
CONDE DE FENOSA (25.0%)

72 Inventor/es:

DE LA FUENTE GONZALEZ, ALEXANDRE;
LOPEZ, RAFAEL y
POSADA, MIGUEL ABAL

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes

ES 2 821 106 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

Agente para uso en el tratamiento y/o la prevención de cáncer metastásico

5 La presente invención se refiere a un agente que comprende una estructura porosa 3D que comprende una matriz de policarbonato poliuretano no reabsorbible con entrecruzamientos de urea; y colágeno en o sobre la matriz, para uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer metastásico.

10 El proceso de metástasis está asociado con más del 90% de las muertes relacionadas con cáncer y representa el principal desafío en oncología. Mientras que la enfermedad primaria es razonablemente accesible a cirugía y/o radioterapia y presenta una respuesta aceptable a quimioterapia que produce un buen pronóstico; la diseminación metastásica está asociada con una contraindicación a cirugía y radioterapia y en especial a resistencia a quimioterapia, y ofrece un pronóstico mucho peor.

15 En los últimos años, el proceso de metástasis se ha caracterizado como un proceso por etapas donde células tumorales agresivas adquieren las capacidades para invadir el estroma y tejidos circundantes, para intravasarse y sobrevivir en el flujo sanguíneo, y para extravasarse y generar una micrometástasis en órganos distantes. En general, hay dos maneras principales de diseminación de células tumorales de la lesión primaria: diseminación sistémica de células tumorales metastásicas a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, y diseminación loco-regional por liberación o migración/invasión de células tumorales metastásicas en los alrededores. Las células tumorales que se diseminan del tumor primario al torrente sanguíneo, se conocen como células tumorales circulantes (CTC), y son la causa principal de la metástasis. Para la diseminación a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, el consenso es que las células tumorales deben adquirir un fenotipo agresivo que permita la migración e invasión del estroma circundante (transición epitelial a mesenquimatoso); activar neoangiogénesis atrayendo células endoteliales y creando nuevos vasos sanguíneos que proporcionan al tumor no solo nutrientes, sino que también generan rutas para la diseminación; después las células tumorales invaden y se incorporan a los nuevos vasos sanguíneos (intravasación) y se diseminan a esos sitios en el organismo donde se unirán y saldrán de los vasos sanguíneos (extravasación); por último, estas células tumorales metastásicas serán capaces de establecer un nicho y generar una micrometástasis que se desarrollará a una lesión metastásica. El proceso entero es extremadamente ineficaz, pero drásticamente letal.

20

25

30 Alternativamente, la diseminación se puede producir mediante migración e invasión celular del estroma y órganos circundantes, o como en el cáncer ovárico donde las células tumorales están expuestas y se liberan a la cavidad peritoneal, por incorporación de células metastásicas en el líquido ascítico e implantación en el peritoneo y órganos accesibles en la cavidad.

35 Las bases molecular y celular que determinan el proceso de metástasis sugieren un intenso diálogo del tumor primario con el entorno (Sleeman, JP et al., Semin Cancer Biol. Jun 2012;22(3):174-86). Las metástasis específicas de tejido (Nguyen et al., Nat Rev Cancer. 2009;9(4):274-84) y los nichos premetastásicos (Psaila & Lyden, Nat Rev Cancer. 2009;9(4):285-93) son conceptos que están empezando a ilustrar un papel activo de carcinomas en la determinación de los sitios más adecuados para colonizar; las señales emitidas desde el tumor y desde el entorno pueden regir la remodelación de los tejidos objetivo para una recepción favorecida de células tumorales diseminadas de las lesiones primarias.

40

45 Un objeto de la presente invención es interferir con la comunicación entre las células tumorales, y en particular células tumorales metastásicas, y el huésped, para permitir que se module el patrón de diseminación metastásica. La invención puede operar atrapando físicamente tales células y/o proporcionando un sitio preferente para la migración dirigida de tales células.

50 Según un primer aspecto, la divulgación proporciona un agente para modular la diseminación de células tumorales para uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer.

La divulgación también proporciona el uso de un agente para modular la diseminación de células tumorales en el tratamiento y/o la prevención del cáncer.

55 La divulgación proporciona además el uso de un agente para modular la diseminación de células tumorales en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del cáncer.

Preferiblemente, el agente para modular la diseminación de células tumorales es para modular la diseminación de células tumorales metastásicas. Preferiblemente, el agente es para uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer metastásico.

60

El agente para modular la diseminación de células tumorales puede actuar para interferir con el proceso natural de diseminación de células tumorales, preferiblemente para modular los comportamientos de tales células de modo que no estén atraídas hacia o capturadas en un sitio particular, preferiblemente en la localización del agente para modular la diseminación de células tumorales.

65

El agente para modular la diseminación de células tumorales pueden ser un agente de captura y/o un quimioatrayente para células tumorales, en particular para células tumorales metastásicas. Las células tumorales metastásicas pueden ser células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario.

5 El agente para modular la diseminación de células tumorales puede ser un agente de captura que se pretende que capture o atrape células tumorales, y en particular células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario. El agente de captura puede mediar directamente la captura de las células tumorales, por ejemplo, por adhesión a las células tumorales, o puede tener un efecto indirecto que mejora la adhesión de las células tumorales en sitios específicos en el huésped.

10 Un agente de captura para uso según la presente divulgación puede ser un material que sea capaz de capturar físicamente células tumorales y atraparlas, el agente de captura puede ser un material adhesivo al que se adhieren células tumorales.

15 El agente de captura puede capturar/atrapar las células proporcionando un sustrato favorecido para que las células metastásicas se unan y anclen al mismo. Este sustrato puede ser una superficie de polímero 2D o 3D sólida, o una superficie químicamente modificada, o una superficie estampada, o un gel, o un hidrogel, etc., donde la célula puede crear estructuras adhesivas tal como adhesiones focales, uniones estrechas, uniones de anclaje, uniones comunicantes, etc.

20 El agente de captura puede ser una estructura porosa 2D o 3D. El agente de captura puede ser un material de tipo andamiaje de tejido poroso 3D. El agente de captura puede ser una estructura de malla porosa 3D.

25 El agente de captura puede estar hecho de uno o más de muchos materiales diferentes, incluyendo materiales naturales y sintéticos; y materiales biodegradables o permanentes. Muchos de tales materiales son bien conocidos, y de hecho muchos se han usado en el campo médico. Los ejemplos de polímeros sintéticos adecuados para su uso como el agente de captura incluyen: poli (alfa-hidroxiácidos) en especial ácidos polilácticos (PLA) o ácido poliglicólicos (PGA), copolímeros poli-lactida poli-glicolida, copolímeros poli-lactida polietilenglicol (PEG); otros poliésteres incluyendo policaprolactonas, tal como poli (épsilon-caprolactona), poli (3-hidroxibutirato), poli (ácido s-caproico), poli (p-dioxanona) y poli (fumarato de propileno); poli (ortoésteres) incluyendo polímeros de adición polioliol/acetales de diceteno; polianhídridos incluyendo poli (anhidrido sebácico) (PSA), poli (carboxibiscarboxifenoxifenoxihexano) (PCPP), poli [bis (p-carboxifenoxi)metano] (PCPM) y copolímeros de SA, CPP y CPM; poli (aminoácidos); poli (pseud aminoácidos); polifosfacenos incluyendo derivados de poli [(dicloro) fosfaceno]; polímeros poli [(órgano) fosfacenos]; poliestirenos; poliuretanos; policarbonatos; polifosfatos; copolímeros en bloque de polietilenglicol y polipropileno; poloxámeros tal como Pluronic™. Tales polímeros se pueden usar para producir soportes porosos 3D. Alternativamente, o además, también se pueden usar polímeros naturales, tal como seda, elastina, quitina, quitosano, fibrina, fibrinógeno, gomas naturales (tal como xantana), polisacáridos (incluyendo pectinas), alginatos, colágeno, poli (aminoácidos), péptidos, polipéptidos o proteínas. De nuevo, tales polímeros se pueden usar para producir soportes porosos 3D. Los copolímeros preparados a partir de los monómeros de cualquiera de los polímeros anteriores también se pueden usar, como se pueden mezclas aleatorias de los polímeros o mezclas o combinaciones de los mismos.

El agente de captura puede estar en forma de un hidrogel.

45 El agente de captura puede comprender poliestireno y/o policaprolactona. El poliestireno y/o la policaprolactona se puede usar para producir una estructura porosa 3D, tal como una malla porosa. Por ejemplo, la invención puede usar un andamiaje de cultivo tisular Insert™-PS Nanomesh™ 3D proporcionado por 3D Biotek™, Nueva Jersey, EE UU. Alternativamente, el agente de captura comprende una esponja de alginato, tal como el sistema de cultivo en 3D AlgiMatrix™ de Gibco™. Alternativamente, el agente de captura puede ser un policarbonato poliuretano con entrecruzamientos de urea, tal como los andamiajes 3D Biomerix™ de Sigma Aldrich, EE UU.

50 Cuando el agente de captura comprende una superficie sólida, la superficie puede estar hecha de, decorada con o tener embebidas en la misma, moléculas de adhesión para mejorar la unión de células tumorales, y células tumorales metastásicas en particular, a la superficie. Las moléculas de adhesión pueden ser proteínas u otras moléculas que median la adhesión célula-célula o la adhesión célula-sustrato, como CAM, cadherinas, integrinas, selectinas, tetraspaninas, proteínas de matriz extracelular, péptidos RGD o péptidos modificados que pueden mejorar la adhesión celular, o una proteína o molécula que fomenta la adhesión celular. Además, el agente de captura puede capturar/atrapar las células metastásicas al remodelar el sitio de implantación, por medio de remodelación de la arquitectura celular del sitio de implantación, o al remodelar la matriz extracelular, al remodelar el sitio mediante una reacción con cuerpo exógeno (Anderson et al., Semin Immunol 2008) o una reacción inflamatoria.

60 Alternativamente, las moléculas de adhesión pueden ser el agente de captura, preferiblemente sin una superficie sólida.

65 El agente para modular la diseminación de células tumorales puede ser alternativa o adicionalmente un quimioatrayente para células tumorales, y en particular para células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario.

El agente para modular la diseminación de células tumorales puede actuar tanto como un agente de captura como un quimioatrayente para células tumorales.

5 Los quimioatrayentes útiles pueden ser cualquier agente capaz de atraer células tumorales, y en particular, células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario. Las células tumorales pueden ser atraídas directa o indirectamente mediante la atracción de una célula intermedia (es decir, una célula inmunitaria o célula madre). Por ejemplo, la implantación de un agente puede generar una reacción inflamatoria que proporciona un efecto quimiotáctico adicional para células cancerosas metastásicas.

15 El agente para modular la diseminación de células tumorales, tal como el agente de captura y/o quimioatrayente, puede comprender vesículas derivadas de células, incluyendo exosomas. Los exosomas son microvesículas derivadas de células que están presentes en muchos y tal vez todos los fluidos biológicos, incluyendo sangre, orina y líquido ascítico. Típicamente tienen un diámetro de entre 30 y 100 nm. Son liberados por muchos tipos de células durante procesos fisiológicos normales; sin embargo, los tumores parecen secretar anómalamente grandes cantidades de exosomas. Los exosomas se pueden obtener de un líquido corporal tal como sangre u orina, u obtener de muchos tipos celulares diferentes en un organismo. El líquido corporal a partir del que se purifican los exosomas puede ser de un donante sano. Los exosomas pueden ser secretados por células cancerosas, tal como células cancerosas ováricas; o alternativamente, o además, los exosomas pueden ser secretados por células no cancerosas, tal como células madre mesenquimatosas. Puede ser preferible usar exosomas de células no cancerosas.

25 Alternativa, o adicionalmente, el agente para modular la diseminación de células tumorales puede ser líquido ascítico de un sujeto con cáncer ovárico. El líquido ascítico puede comprender exosomas. El agente de captura o quimioatrayente puede ser exosomas obtenidos del líquido ascítico de un sujeto con cáncer ovárico.

30 Alternativa, o adicionalmente, el agente para modular la diseminación de células tumorales pueden ser células madre mesenquimatosas mismas, o de hecho otra forma de células madre, pero preferiblemente no células madre embrionarias humanas. Se pueden usar células madre mesenquimatosas de origen adiposo, cordón umbilical o médula ósea, se pueden usar como un quimioatrayente.

35 Alternativa, o adicionalmente, el agente para modular la diseminación de células tumorales puede ser una molécula de adhesión celular, tal como una selectina, un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig), una integrina o una cadherina. La molécula de adhesión celular se puede encontrar asociada con exosomas tal como CD9 y/o CD81.

40 Alternativa, o adicionalmente, el agente para modular la diseminación de células tumorales puede comprender una o más quimioquinas y/o uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, uno o más de SDF1, 90K, osteopontina, EGF, TGFb1, FGF, e IGF. El quimioatrayente puede comprender una combinación de EGF, TGFb1 y FGF.

45 Alternativa, o adicionalmente, el agente para modular la diseminación de células tumorales puede comprender una o más proteínas de la matriz extracelular, por ejemplo, fibronectina o colágeno.

El agente para modular la diseminación de células tumorales puede estar contenido en y/o unido a un soporte.

50 El agente para modular la diseminación de células tumorales puede estar física o químicamente contenido dentro de o unido a un soporte. El agente para modular la diseminación de células tumorales puede estar permanentemente contenido en el andamiaje o se puede liberar de una manera controlada o no controlada del soporte.

55 Si se usa con un soporte, el quimioatrayente y/o agente de captura puede permanecer unido a o dentro del soporte, o se puede liberar o lixiviar del soporte para crear una gradiente de quimioatrayente y/o agente de captura alrededor del soporte.

60 El soporte puede ser cualquier material adecuado que sea capaz de transportar, ya sea al contener o tener unido al mismo, el agente para modular la diseminación de células tumorales. El agente para modular la diseminación de células tumorales puede ser un agente de captura y/o un quimioatrayente.

El soporte puede ser él mismo un agente para modular la diseminación de células tumorales, tal como un agente de captura y/o un quimioatrayente.

65 El soporte es preferiblemente biocompatible, de modo que si se coloca en un ser humano o animal no humano no produce una respuesta inmunitaria inaceptable. En algunas formas de realización el soporte puede estar asociado con una respuesta inmunitaria limitada en el sitio de colocación, por ejemplo, una respuesta inmunitaria inflamatoria o reacción a cuerpo exógeno.

El soporte puede ser poroso. El soporte puede ser una estructura porosa 2D o 3D. El soporte puede ser un material de tipo andamiaje de tejido poroso 3D. El soporte puede ser una estructura de malla porosa 3D.

- El soporte puede estar hecho de uno o más de muchos materiales diferentes, incluyendo materiales naturales y sintéticos; materiales biodegradables y permanentes. Muchos de tales materiales son bien conocidos, y de hecho se han usado en el campo médico. Los ejemplos de polímeros sintéticos adecuados para su uso como el agente de captura incluyen: poli (alfa-hidroxiácidos) en especial ácidos polilácticos (PLA) o ácido poliglicólicos (PGA), copolímeros poli-lactida poli-glicolida, copolímeros poli-lactida polietilenglicol (PEG); otros poliésteres incluyendo policaprolactonas, tal como poli (épsilon-caprolactona), poli (3-hidroxi butirato), poli (ácido s-caproico), poli (p-dioxanona) y poli (fumarato de propileno); poli (ortoésteres) incluyendo polímeros de adición poli(ol/acetales de diceteno); polianhídridos incluyendo poli (anhidrido sebácico) (PSA), poli (carboxibiscarboxifenoxifenoxihexano) (PCPP), poli [bis (p-carboxifenoxi)metano] (PCPM) y copolímeros de SA, CPP y CPM; poli (aminoácidos); poli (pseudoaminoácidos); polifosfacenos incluyendo derivados de poli [(dicloro) fosfaceno]; polímeros poli [(órgano) fosfacenos]; poliestirenos; poliuretanos; policarbonatos; polifosfatos; copolímeros en bloque de polietilenglicol y polipropileno; poloxámeros tal como Pluronic™. Tales polímeros se pueden usar para producir soportes porosos 3D.
- Alternativamente, o además, también se pueden usar polímeros naturales, tal como seda, elastina, quitina, quitosano, fibrina, fibrinógeno, gomas naturales (tal como xantana), polisacáridos (incluyendo pectinas), alginatos, colágeno, poli (aminoácidos), péptidos, polipéptidos o proteínas. De nuevo, tales polímeros se pueden usar para producir soportes porosos 3D.
- Los copolímeros preparados a partir de los monómeros de cualquiera de los polímeros anteriores también se pueden usar, como se pueden mezclas aleatorias de los polímeros o mezclas o combinaciones de los mismos.
- El soporte puede estar en forma de un hidrogel.
- El soporte puede comprender poliestireno y/o policaprolactona. El poliestireno y/o la policaprolactona se puede usar para producir una estructura porosa 3D, tal como una malla porosa. Por ejemplo, se puede usar un andamiaje de cultivo tisular Insert™-PS Nanomesh™ 3D proporcionado por 3D Biotek™, Nueva Jersey, EE UU.
- Alternativamente, el soporte comprende una esponja de alginato, tal como el sistema de cultivo en 3D AlgiMatrix™ de Gibco™.
- El soporte puede ser un policarbonato poliuretano con entrecruzamientos de urea, tal como los andamiajes 3D Biomerix™ de SIGMA ALDRICH, EE UU.
- El soporte puede ser un material soluble o insoluble, o al menos parcialmente soluble o parcialmente insoluble.
- El soporte puede ser un receptor del agente para modular la diseminación de células tumorales cuya función es crear un gradiente del agente, esencialmente liberando el agente a lo largo del tiempo. El agente se puede liberar de una manera controlada o no controlada. La liberación del agente puede ser activa o pasiva, o ambas.
- Preferiblemente el soporte, en uso, retiene al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más del agente durante al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas o más.
- Preferiblemente el soporte, en uso, libera al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más del agente a lo largo de al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas o más.
- Preferiblemente el soporte, en uso, crea un gradiente del agente durante al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas o más.
- Preferiblemente el soporte es capaz de liberar suficiente agente para modular la diseminación de células tumorales para generar un gradiente del agente eficaz para la diseminación loco-regional y/o para la diseminación sistémica en un sujeto durante un periodo suficiente para evitar la diseminación metastásica. Preferiblemente, el agente es un quimioatrayente y el producto de la divulgación es capaz de atraer células tumorales durante un periodo sostenido. Preferiblemente el producto de la divulgación es capaz de atraer células tumorales durante al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos cuatro semanas o más.
- El agente para modular la diseminación de células tumorales puede estar encapsulado en liposomas o nano/micropartículas o vesículas celulares modificadas como vesículas miméticas de exosomas. También se pueden usar comprimidos y/o cápsulas solubles para contener o transportar (mediante unión) el agente para modular la diseminación de células tumorales. Los comprimidos y/o las cápsulas se pueden configurar para liberar selectivamente el agente para modular la diseminación de células tumorales en un sitio deseado. Los ejemplos de polímeros que se pueden usar para formar comprimidos o cápsulas incluyen, pero no están limitados a, acetato ftalato de celulosa,

ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de polivinilacetato, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímero de ácido metacrílico, laca, ftalato de metilcelulosa, acetato trimelitato de celulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato ftalato de celulosa, acetato succinato de celulosa, acetato malato de celulosa, benzoato ftalato de celulosa, propionato ftalato de celulosa, carboximetilcelulosa, ftalato de etilhidroxietilcelulosa, laca, copolímero de estireno-ácido acrílico, copolímero de acrilato de metilo-ácido acrílico, copolímero de acrilato de metilo-ácido metacrílico, copolímero de acrilato de butilo-estireno-ácido acrílico, copolímero de ácido metacrílico-metacrilato de metilo, copolímero de ácido metacrílico-metacrilato de etilo, copolímero de acrilato de metilo-ácido metacrílico-acrilato de octilo, copolímero de acetato de vinilo-anhidrido de ácido maleico, copolímero de estireno-anhidrido de ácido maleico, copolímero de estireno monoéster de ácido maleico, copolímero de vinil metil éter-anhidrido de ácido maleico, copolímero de acrilonitrilo-acrilato de metilo-anhidrido de ácido maleico, copolímero de acrilato de butilo-estireno-anhidrido de ácido maleico, ftalato de alcohol polivinílico, ftalato de acetal polivinílico, butilato ftalato de polivinilo y acetoacetal ftalato de polivinilo, o combinaciones de los mismos. El material que encapsula el agente para modular la diseminación de células tumorales se puede disolver cuando se administra lo que permite la liberación del agente para modular la diseminación de células tumorales. La cápsula puede ser una cápsula de gelatina blanda.

El soporte puede ser un tejido o líquido corporal, por ejemplo, el soporte puede ser grasa corporal.

El agente para modular la diseminación de células tumorales puede estar en forma líquida o en polvo, o en cualquier otra forma adecuada. El quimioatrayente puede estar en una forma liofilizada.

En un aspecto adicional, en el presente documento se proporciona un producto que comprende un soporte y un agente para modular la diseminación metastásica de células tumorales en donde el agente para modular la diseminación metastásica de células tumorales está contenido en y/o unido al soporte.

El producto puede comprender un soporte como se describe en el presente documento, y el agente para modular la diseminación metastásica de células tumorales puede ser como se describe en el presente documento.

El producto puede contener, por ejemplo, desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 98% en peso, preferiblemente aproximadamente el 80%, preferiblemente al menos aproximadamente el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o más en peso del agente para modular la diseminación de células tumorales.

El producto puede contener entre 0,1 nanogramos y 10 mg de un agente para modular la diseminación de células tumorales, tal como un agente de captura y/o un quimioatrayente. Preferiblemente entre 0,1 nanogramos y 1 mg, o 0,1 nanogramos y 100 microgramos del agente para modular la diseminación de células tumorales, tal como un agente de captura y/o un quimioatrayente.

Además del agente para modular la diseminación de células tumorales, el producto de la divulgación puede comprender además un agente quimioterapéutico, tal como un agente citostático. En donde un agente citostático es un compuesto farmacológicamente activo capaz de inhibir o suprimir el crecimiento y la multiplicación celular. Dependiendo del mecanismo de acción y de la dosis del compuesto, también puede representar un agente citotóxico. En particular, el agente citostático puede ser un compuesto que sea capaz de destruir, o inhibir el crecimiento de, células tumorales, preferiblemente células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario.

El agente citostático se puede seleccionar, por ejemplo, de:

- (a) antraciclinas y análogos de las mismas, tal como daunomicina, doxorubicina, idarrubicina, epirubicina, valrubicina, aclacinomicina, y mitoxantrona;
- (b) antimetabolitos, tal como gemcitabina, citosina arabinósido, citarabina, vidarabina, tioguanina, pentostatina, cladribina, metotrexato, floxuridina, fluorouracilo y otras pirimidinas, purinas, o nucleósidos fluorados;
- (c) agentes alquilantes, tal como mostazas de nitrógeno, incluyendo ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo, ifosfamida; nitrosoureas, incluyendo carmustina, lomustina, y estreptozocina; sulfonatos de alquilo, incluyendo busulfán; tiotepa; compuestos de platino, incluyendo cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, satraplatino, y tetranitrato de triplatino; procarbazona; y altretamina;
- (d) alcaloides y terpenoides vegetales, tal como alcaloides de la vinca, incluyendo vincristina, vinblastina, vinorelbina, y vindesina; taxanos, incluyendo taxol, paclitaxel, docetaxel; y podofilotoxina;
- (e) inhibidores de topoisomerasas, tal como amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido y otros derivados de epipodofilotoxinas; irinotecano, topotecano y otras camptotecinas; y
- (f) otros antineoplásicos, tal como dactinomicina, bleomicina, mitomicina, etopósido, bleomicina, y plicamicina.

El agente para modular la diseminación de células tumorales se puede usar solo o en combinación con otros agentes activos, por ejemplo, en combinación con uno o más agentes citostáticos.

El agente para modular la diseminación de células tumorales o un producto de la divulgación se puede pretender para la administración por cualquier método conocido, por ejemplo, administración entérica, tal como oral o rectal, o administración parenteral, por ejemplo, por inyección, o por cirugía.

5 Preferiblemente, el agente para modular la diseminación de células tumorales o un producto de la invención se coloca en un sitio de uso por cirugía. Si el agente para modular la diseminación de células tumorales o un soporte para el agente para modular la diseminación de células tumorales es una malla o andamiaje 3D, entonces se puede administrar por cirugía. Alternativamente, el agente para modular la diseminación de células tumorales o un producto de la divulgación se puede colocar en un sitio de uso por inyección, en este caso, si se usa un soporte, el soporte debe ser inyectable, por ejemplo, un hidrogel o material de alginato.

15 El agente para modular la diseminación de células tumorales o un producto de la divulgación se puede pretender para uso con muchos tipos de cáncer, incluyendo, pero no limitado a, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer urotelial, cáncer esofágico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, mesotelioma, sarcoma de Kaposi, cáncer ovárico, sarcoma de tejidos blandos, glioma, melanoma, cáncer de pulmón microcítico y no microcítico, cáncer endometrial, carcinoma de células basales, carcinoma de células transicionales del aparato urotelial, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, sarcoma uterino, mieloma múltiple, sarcoma de tejidos blandos y huesos, colangiocarcinoma y cánceres diseminados de los mismos.

20 En particular, el agente para modular la diseminación de células tumorales o un producto de la divulgación se puede pretender para uso con cánceres de la cavidad peritoneal, tal como, cáncer de estómago, vesícula biliar, hígado intestino delgado, GIST, esófago, sarcoma abdominal, sarcoma de tejidos blandos, mesotelioma, ovárico, pancreático, de colon, rectal, uterino, cervical, de riñón y cánceres diseminados de los mismos. En una forma de realización preferida el cáncer es cáncer ovárico o un cáncer que se disemina del mismo. Cuando el cáncer es cáncer ovárico o un cáncer que se disemina del mismo, el producto de la invención se puede implantar en la pared abdominal del sujeto. Alternativamente, el cáncer puede ser cáncer de colon. El cáncer puede ser cáncer pancreático.

30 La presente divulgación se puede pretender para uso en la prevención de metástasis de cáncer, en particular para la prevención de metástasis peritoneales.

Según otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de un agente de captura para atrapar células tumorales en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

35 Según otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de un quimioatrayente de células tumorales en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

40 Preferiblemente, el tratamiento o prevención del cáncer comprende la atracción y/o atrapamiento de células tumorales, y en particular de células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario.

45 Preferiblemente las células atraídas se mantienen o atrapan por la acción del agente para modular la diseminación de células tumorales, el agente de captura y/o el quimioatrayente, localizándolas de esta manera a una localización particular y permitiendo que sean tratadas.

50 Preferiblemente, el agente para modular la diseminación de células tumorales se proporciona contenido en, o unido a, un soporte como se describe en el presente documento. El soporte mismo puede ser un agente para modular la diseminación de células tumorales capaz de atraer y/o atrapar células tumorales, y la provisión de un agente de captura y/o quimioatrayente adicional es opcional. En algunas formas de realización, el agente para modular la diseminación de células tumorales es un andamiaje de polímero 3D, hidrogel o un polímero de poloxámero. Se ha encontrado que tales soportes de polímero tienen propiedades adhesivas y son capaces de atrapar células tumorales, por ejemplo, proporcionando un nicho al que tales células se pueden adherir, y/o proporcionando un sitio preferente para la migración dirigida de tales células.

55 El agente para modular la diseminación de células tumorales, agente de captura y/o quimioatrayente puede ser cualquier agente adecuado, en particular, puede ser cualquiera de los agentes de captura y/o quimioatrayentes anteriormente mencionados. El agente para modular la diseminación de células tumorales, el agente de captura y/o el quimioatrayente comprende exosomas. Alternativamente, el agente para modular la diseminación de células tumorales, el agente de captura y/o el quimioatrayente comprende una matriz de policarbonato poliuretano urea entrecruzada (andamiaje 3D-Kube Biomerix) decorada con una molécula de adhesión, tal como colágeno y/o fibronectina.

60 Alternativamente, el agente para modular la diseminación de células tumorales, agente de captura y/o quimioatrayente se puede administrar por sí solo, por ejemplo, en el tejido corporal, donde se retiene lo suficiente para ser eficaz. La divulgación puede proporcionar la administración de más de un agente de captura y/o más de un quimioatrayente. Los

más de un agente de captura y/o los más de un quimioatrayente se pueden administrar de forma simultánea, secuencial o por separado.

Preferiblemente, el agente para modular la diseminación de células tumorales, agente de captura y/o el quimioatrayente, solo o en un producto de la divulgación, se administra a un órgano no vital. Por tanto, las células tumorales serán atraídas a y retenidas en este tejido y después se pueden eliminar por cirugía. Tal localización puede permitir que el quimioatrayente sea accesible desde cualquier parte en el cuerpo; por ejemplo, permitiría que el producto de la divulgación se vascularizara y, por tanto, permitir que el quimioatrayente alcance la circulación sanguínea.

Alternativamente, el agente para modular la diseminación de células tumorales, el agente de captura o el quimioatrayente, solo o en un producto de la divulgación, se puede administrar en la grasa de un sujeto.

El agente para modular la diseminación de células tumorales, el agente de captura y/o el quimioatrayente, solo o en un producto de la invención, se puede administrar en el peritoneo de un sujeto para atraer y/o capturar células metastásicas que se diseminan en la cavidad peritoneal. De forma similar, la pleura puede ser un buen lugar para localizar el agente para modular la diseminación de células tumorales, el agente de captura y/o el quimioatrayente cuando se tratan carcinomas de pulmón y mesoteliomas o células tumorales que se diseminan en la pleura.

El agente para modular la diseminación de células tumorales, el agente de captura y/o el quimioatrayente se puede administrar por inyección directa en la grasa de un ser humano o un animal no humano. Por ejemplo, para la atracción de células tumorales metastásicas peritoneales, el agente para modular la diseminación de células tumorales, el agente de captura y/o el quimioatrayente se puede inyectar en el peritoneo o tejido circundante incluyendo tejido graso, por ejemplo, la grasa gonadal.

Preferiblemente, una vez in situ, el agente para modular la diseminación de células tumorales, el agente de captura y/o el quimioatrayente produce que las células tumorales, y en particular las células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario, sean atraídas a, y se congreguen o sean "atrapadas".

Preferiblemente, las células atraídas son mantenidas o atrapadas por la acción del agente para modular la diseminación de células tumorales, el agente de captura y/o el quimioatrayente hasta que las células son tratadas. Preferiblemente al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más de las células atraídas son capturadas por el producto de la divulgación.

Las células atraídas o atrapadas se pueden tratar después. Las células atraídas o atrapadas se pueden tratar eliminándolas físicamente, por ejemplo, por cirugía, o tratándolas para destruir o inactivar las células, por ejemplo, por quimioterapia o radioterapia. Si el soporte incluye un agente citostático o citotóxico, o el agente para modular la diseminación de células tumorales se administra con un agente citostático o citotóxico, entonces este puede actuar para erradicar o prevenir la replicación de las células atraídas.

Las células tumorales que se van a tratar pueden ser uno o más de cualquiera de los cánceres descritos anteriormente, en particular, las células tumorales pueden derivar de/estar diseminadas de un cáncer peritoneal, tal como un cáncer ovárico.

Según otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método de atraer células tumorales, y en particular células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario, en un sujeto que comprende administrar al sujeto un agente para modular la diseminación de células tumorales, y en particular células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario. El agente para modular la diseminación de células tumorales se puede proporcionar contenido dentro de o unido a un soporte como se describe con referencia a cualquier aspecto de la divulgación.

Preferiblemente, las células atraídas se retienen o atrapan por la acción del agente para modular la diseminación de células tumorales. Una vez atrapadas por el agente para la modulación de la diseminación de células tumorales, las células cancerosas mismas pueden actuar como un agente de captura y/o quimioatrayente para otras células cancerosas.

Según otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método de atraer células tumorales, y en particular células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario, en un sujeto que comprende administrar al sujeto un quimioatrayente de células tumorales, y en particular células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario. El quimioatrayente se puede proporcionar contenido dentro de o unido a un soporte como se describe con referencia a cualquier aspecto de la divulgación.

Preferiblemente, las células atraídas se retienen o atrapan por la acción del quimioatrayente. Una vez que las células atraídas son atrapadas pueden actuar como un agente de captura y/o quimioatrayente para otras células cancerosas.

5 Según otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método de atraer células tumorales, y en particular células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario, en un sujeto que comprende administrar al sujeto un agente de captura para atrapar células tumorales. El agente de captura puede estar en forma de un soporte como se ha descrito en formas de realización o aspectos de la divulgación en el presente documento sin un agente de captura o quimioatrayente adicional contenido en el mismo o unido al mismo. Alternativamente, el soporte puede estar suplementado por la adición de un agente de captura adicional como se describe en cualquiera de las formas de realización o aspectos de la invención proporcionada en el presente documento. Una vez las células son atrapadas por el agente de captura pueden actuar después como un agente de captura y/o quimioatrayente para otras células cancerosas.

15 Según un aspecto aún adicional, en el presente documento se proporciona un método de tratar o prevenir cáncer, en particular un cáncer metastásico, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello, un agente para modular la diseminación de células tumorales, y en particular la diseminación de células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario. El agente para modular la diseminación de células tumorales puede estar contenido dentro de o unido a un soporte. Preferiblemente el sujeto en necesidad de tratamiento ya ha sido diagnosticado con un cáncer primario, tanto metastásico como no metastásico. Preferiblemente las células tumorales se retienen o atrapan por la acción del agente para modular la diseminación de células tumorales. Preferiblemente el método comprende además la etapa de tratar las células atrapadas.

25 Según un aspecto aún adicional, la divulgación proporciona un método de tratar o prevenir cáncer, en particular un cáncer metastásico, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello, un quimioatrayente de células tumorales, y en particular de células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario. El quimioatrayente puede estar contenido dentro de o unido a un soporte. Preferiblemente el sujeto en necesidad de tratamiento ya ha sido diagnosticado con un cáncer primario, tanto metastásico como no metastásico. Preferiblemente las células atraídas se retienen o atrapan por la acción del quimioatrayente. Preferiblemente el método comprende además la etapa de tratar las células atrapadas.

35 Según un aspecto aún adicional, la divulgación proporciona un método de tratar o prevenir cáncer, en particular un cáncer metastásico, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello, un agente de captura para atrapar células tumorales, y en particular células tumorales metastásicas, tal como células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario. El agente de captura puede ser un adhesivo al que las células tumorales se adhieren. El agente de captura puede estar en forma de un soporte como se describe en formas de realización o aspectos de la divulgación en el presente documento sin un agente de captura o quimioatrayente adicional contenido en el mismo o unido al mismo. El soporte se puede suplementar por la adición de un agente de captura adicional como se describe en cualquiera de las formas de realización o aspectos de la divulgación proporcionada en el presente documento. Preferiblemente el método comprende además la etapa de tratar las células atrapadas. Preferiblemente el sujeto en necesidad de tratamiento ya ha sido diagnosticado con un cáncer primario, tanto metastásico como no metastásico.

45 El agente de captura puede comprender un hidrogel de polímero de poloxámero administrado en ausencia de cualquier otro agente de captura contenido en el mismo o unido al mismo. Alternativamente, el agente de captura puede comprender poliestireno y/o policaprolactona; o una esponja de alginato; o un andamiaje de policarbonato poliuretano con entrecruzamientos de urea.

50 Las células atraídas o atrapadas se pueden tratar eliminándolas físicamente, por ejemplo, por cirugía, o tratándolas para destruir o inactivar las células, por ejemplo, por quimioterapia o radioterapia. Si el soporte incluye un agente citostático o citotóxico entonces este puede actuar para erradicar o prevenir la replicación de las células atraídas. El método puede comprender la etapa de eliminar quirúrgicamente las células atraídas, y/o la etapa de administrar quimioterapia y/o radioterapia para tratar las células atraídas o atrapadas.

55 El método de la presente divulgación se puede usar en combinación con escenarios clínicos actuales, incluyendo en combinación con uno o más de cirugía, radioterapia y quimioterapia.

El cáncer puede ser cualquier cáncer, en particular un cáncer peritoneal, tal como cáncer ovárico.

60 Según un aspecto aún adicional la divulgación proporciona un dispositivo médico para uso en prevenir o tratar cáncer, preferiblemente cáncer metastásico, en un sujeto, en donde el dispositivo comprende un agente para modular la diseminación de células tumorales o un producto de la invención.

65 El experto en la materia apreciará que las características preferidas de cualquier forma de realización y/o aspecto y/o reivindicación de la divulgación se pueden aplicar a todas las otras formas de realización y/o aspectos y/o reivindicaciones de la divulgación.

La presente invención se describirá adicionalmente en más detalle, a modo de ejemplo solo, con referencia a las siguientes figuras en las que:

5 **Figura 1** – ilustra un modelo de ratón de metástasis de cáncer ovárico. Se muestran imágenes de luminiscencia *in vivo* de 1×10^6 células de cáncer ovárico SKOV3 transfectadas con el gen indicador luciferasa inyectadas por vía intraperitoneal en ratones. La figura 1A muestra los resultados sin sustrato luciferina como control. La figura 1B muestra el patrón de luminiscencia en el momento de la inyección que muestra la diseminación intraperitoneal de las células SKOV3. Las figuras 1C a E muestran el patrón de luminiscencia una semana después de la inyección de las células, los resultados muestran un patrón reproducible de metástasis en la grasa gonadal y el páncreas. La figura 1E muestra explantes de órganos que muestran señales positivas de luciferasa en el páncreas y la grasa gonadal.

15 **Figura 2** – ilustra un producto según la invención compuesto de un andamiaje polimérico 3D y exosomas. Las figuras 2A a 2C muestran un andamiaje de cultivo tisular 3D InsertTM-PS Nanomesh (3D Biotek, Nueva Jersey, EE UU), como una plataforma para contener los exosomas como quimioatrayentes (amplificaciones en B y C). Las figuras 2D y 2E muestran imágenes de MET (microscopía electrónica de transmisión) de las partículas microvesiculares “exosomas” purificadas por ultracentrifugación del líquido ascítico de una paciente de cáncer ovárico (amplificación en E). La figura 2F muestra exosomas decorados con DID (octadecilindocarbocianina), un marcador fluorescente rojo, sembrado en el andamiaje de cultivo tisular Nanomesh de las figuras 2A a 2C.

20 **Figura 3** – ilustra gráficamente un número de agentes que fomentan la quimiotaxis de células SKOV3 *in vitro*. El nivel de quimiotaxis se expresa como un porcentaje comparado con líquido ascítico, el quimioatrayente más potente ensayado. Básicamente, células SKOV3 que expresan el gen indicador luciferasa se indujeron a migrar a través de la membrana porosa (8 μ m) en una cámara de Boyden, en respuesta a los quimioatrayentes indicados. A destacar, 1 μ g de exosomas purificados del líquido ascítico de una paciente de cáncer ovárico demostró quimiotaxis eficaz tanto en medio sin SBF como embebido en el andamiaje 3D InsertTM-PS. La combinación de las quimioquinas EGF, TGF β 1 y FGF demostró un fomento sinérgico de la quimiotaxis. Por último, células madre mesenquimatosas de origen adiposo fueron capaces de inducir la migración de células SKOV3 de una manera eficaz (se obtuvieron resultados similares con MSC de origen umbilical y de médula ósea).

25 **Figura 4** – demuestra adicionalmente que los exosomas fomentan la quimiotaxis de células SKOV3. El fraccionamiento de líquido ascítico de una paciente de cáncer ovárico por HPLC (panel superior), y los ensayos de migración de células SKOV3 produjeron que las cuatro primeras fracciones retenían la capacidad del líquido ascítico sin fraccionar para fomentar la quimiotaxis (la barra a mano izquierda en cada par de barras en el panel inferior). La eliminación de exosomas por ultracentrifugación se evidenció después del fraccionamiento del líquido ascítico por la ausencia completa de proteínas en la primera fracción (panel medio); la desaparición concomitante de quimiotaxis en la fracción 1 demostró la capacidad de los exosomas purificados del líquido ascítico de pacientes de cáncer ovárico de fomentar quimiotaxis.

30 **Figura 5** – ilustra un patrón modificado de diseminación de células metastásicas SKOV-3 en respuesta a exosomas ascíticos en un soporte. La figura (A y B) proporciona una evaluación *in vivo* de la capacidad de un andamiaje con exosomas ascíticos de modular la diseminación de células tumorales metastásicas. La figura 5A muestra que una semana después de la inyección intraperitoneal, 1×10^6 células SKOV3 que expresan el gen indicador luciferasa generaron metástasis en la grasa gonadal y el páncreas (inserto en la figura 5A). La figura 5B muestra que la implantación del andamiaje con 50 μ g de exosomas ascíticos en la parte contralateral de la pared abdominal previno la diseminación metastásica de células SKOV3, con una desaparición completa de focos metastásicos en la grasa gonadal y el páncreas y la localización de las células SKOV3 dentro de y alrededor del andamiaje/trampa (inserto en la figura 5B). La figura 5C muestra que se vieron los mismos resultados cuando se usaron exosomas purificados de la sangre de individuos sanos.

35 **Figura 6** – ilustra un patrón modificado de diseminación de células metastásicas SKOV-3 con exosomas. La figura proporciona una evaluación *in vivo* de la capacidad de exosomas, resuspendidos en PBS y Matrigel, para modular la diseminación de células tumorales metastásicas en ausencia de un andamiaje. En la figura 6A se inyectaron exosomas en la grasa gonadal y una semana después 1×10^6 células SKOV3 que expresan el gen indicador luciferasa se inyectaron por vía intraperitoneal. La figura 6B ilustra el patrón de células tumorales evaluado por luminiscencia cuando se sacrificaron los ratones siete días después de la inyección de células SKOV3. Las células SKOV3 se localizaban exclusivamente en la grasa gonadal donde se implantaron los exosomas, sin focos metastásicos en el páncreas, comparado con el patrón metastásico control (véase la figura 5A o 7B). La figura 6C muestra que se encontraron resultados similares cuando los exosomas se embebieron en Matrigel como un depósito, y se inyectaron en la grasa gonadal.

40 **Figura 7** – ilustra un patrón modificado de diseminación de células metastásicas SKOV-3 con células madre mesenquimatosas (MSC) como un quimioatrayente y/o agente de captura. La figura proporciona una evaluación *in vivo* de la capacidad de un andamiaje con MSC para atraer y capturar las células tumorales metastásicas. En la figura 7A se sembraron MSC adiposas en el andamiaje 3D y se implantaron quirúrgicamente en la pared abdominal enfrente del páncreas. Una semana después de la inyección intraperitoneal, 1×10^6 células SKOV3 que expresan el gen

indicador luciferasa generaron metástasis en la grasa gonadal y el páncreas como se ilustra en la figura 7B. En la figura 7C se implantó a ratones un andamiaje con 50.000 aMSC en la parte contralateral de la pared abdominal, esto tuvo el efecto de prevenir la diseminación metastásica de las células SKOV3, con una desaparición completa de focos metastásicos en la grasa gonadal y el páncreas y la localización de las células SKOV3 dentro del andamiaje y quimioatrayente, un andamiaje y quimioatrayente también se denomina algunas veces una trampa.

Figura 8 – ilustra un patrón modificado de diseminación de células metastásicas HCT116 e Ishikawa con exosomas como el quimioatrayente y agente de captura. La figura proporciona una evaluación *in vivo* de la capacidad de un andamiaje con exosomas para atraer y capturar las células tumorales metastásicas. La figura 8A muestra que una semana después de la inyección intraperitoneal, 1×10^6 células de cáncer de colon HCT116 que expresan el gen indicador luciferasa generaron metástasis principalmente en el hígado y el páncreas, con algunas células que metastatizaban a la grasa gonadal. La figura 8B muestra que la implantación de un andamiaje con exosomas en la parte contralateral de la pared abdominal prevenía la diseminación metastásica de las células HCT116, con una desaparición completa de los focos metastásicos en el hígado y el páncreas y la localización de las células HCT116 dentro de o alrededor del andamiaje/trampa. Asimismo, las células Ishikawa se diseminaron preferentemente al páncreas en ausencia de un quimioatrayente (Figura 8C), mientras que la mayoría eran atraídas y/o capturadas por y se localizaban dentro de la trampa (andamiaje y área circundante) cuando se inyectaban por vía intraperitoneal en presencia del andamiaje con exosomas (Figura 8D).

Figura 9 – es una ilustración esquemática de la siembra de un andamiaje de cultivo tisular 3D InsertTM-PS Nanomesh (3D Biotek, Nueva Jersey, EE UU) con células madre mesenquimatosas. El andamiaje está hecho de poliestireno y policaprolactona.

Figura 10 – muestra que los exosomas mejoran la capacidad de adhesión de células tumorales a andamiajes 3D-Biotek. La capacidad de adhesión de células SKOV3 se evaluó en ensayos de adhesión a corto y largo plazo. (a) Para el ensayo de adhesión a corto plazo, 50.000 células SKOV3 marcadas con calceína se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos pretratadas y 1 hora después las células se lavaron y esas adheridas a las placas se cuantificaron por fluorescencia. El pretratamiento de los pocillos fue como sigue: el fondo de placas de pocillos se decoró con exosomas por absorción pasiva durante la noche; alternativamente, los exosomas se trataron con anticuerpos contra CD9 y CD81 durante 1 hora, para bloquear el sitio de reconocimiento de tetraspanina; por último, se usó polihema en etanol (20 mg/ml) para cubrir el fondo del pocillo para evitar la adhesión de células tumorales. (b) Para el ensayo de adhesión a largo plazo, se pretrataron andamiajes 3D-Biotek como antes, incluyendo además andamiajes vacíos decorados con 100 ng tanto de CD9 (andamiaje vacío + CD9) como CD81 (andamiaje vacío + CD81). La referencia en el presente documento a “M-Trap” se refiere a un andamiaje 3D-Biotek (consistente en insertos 3D de poliestireno/policaprolactona con nanomalla (<http://www.3dbiotek.com/web/prod/3dnanomesh.aspx>)) – decorados con exosomas. Los andamiajes se colocaron después en una placa de cultivo de 35 mm, se sembraron 200.000 células SKOV3 marcadas con calceína y se sometieron a movimiento orbital con la ayuda de un agitador a 37°C durante la noche. Los andamiajes se recuperaron y la cantidad de SKOV3 capturadas en las diferentes condiciones se cuantificó por fluorescencia. (c) Ensayo de adhesión similar al de (b) realizado con andamiajes preincubados con concentraciones crecientes (10 ng, 50 ng y 100 ng) de ambas proteínas (cd9 y cd81) durante la noche a 4°C, y con diferentes concentraciones de exosomas (10 µg, 50 µg y 100 µg). (d) La adhesión a M-Trap en condiciones dinámicas se evaluó adicionalmente con ayuda de una bomba de perfusión que genera un flujo constante de células SKOV3 marcadas con calceína (750 ul/min; véase figura suplementaria 2). M-Trap, andamiaje vacío y andamiaje vacío pretratado con polihema para evitar la adhesión se sometieron a flujo de células SKOV3 durante 1 hora, y las células SKOV3 capturadas se cuantificaron por fluorescencia.

Figura 11 – muestra que un dispositivo según la invención, denominado en el presente documento M-Trap (y como se ha descrito anteriormente en relación a la figura 10), captura eficazmente células SKOV3 metastásicas en un modelo de ratón *in vivo* de metástasis ovárica peritoneal. (a) Esquema de órganos peritoneales de ratón y localización de M-Trap enfrente del páncreas. (b) Un millón de células SKOV3 que expresan proteína luciferasa se inyectaron por vía intraperitoneal en ratones, y una semana después los ratones se inyectaron con luciferina como sustrato de luciferasa antes del sacrificio. Usando tecnología IVIS (Sistema de Imagenología In Vivo) las células se localizaron en sitios naturales de metástasis (páncreas y almohadilla grasa gonadal). Andamiajes vacíos (c) y dispositivos M-Trap (d) se implantaron quirúrgicamente en la pared interna del peritoneo y 1 semana después células SKOV3 que expresan proteína luciferasa se inyectaron por vía intraperitoneal. Después de 1 semana, el patrón de metástasis de células SKOV3 se analizó como en (b). La escala de color corresponde a la cantidad de células referidas a señal de bioluminiscencia. A destacar, el patrón natural de metástasis peritoneal ovárica se moduló gradualmente por la adhesión al andamiaje vacío y se remodeló por completo mediante tecnología M-Trap.

Figura 12 – muestra la modulación de la adhesión de células SKOV3 a andamiajes 3D-Biotek que consisten en insertos 3D de poliestireno/policaprolactona con nanomalla. (a) Se implantó un andamiaje vacío pretratado con polihema (20 mg/ml en etanol) para evitar la adhesión celular en la pared interna del peritoneo ayudado por pegamento quirúrgico. Después de 1 semana, se inyectaron células SKOV3 que expresan proteína luciferasa por vía intraperitoneal, y 1 semana después los ratones se sacrificaron y se visualizó metástasis de células SKOV3 usando tecnología IVIS (Sistema de Imagenología In Vivo). (b) Se realizó un ensayo similar usando un andamiaje vacío incubado durante la noche a 4°C con proteína CD81.

Figura 13 – muestra la modulación de la metástasis peritoneal en respuesta a cultivos primarios de ascitis de cáncer ovárico. Además del andamiaje de poliestireno/policaprolactona usado en M-trap, se ensayaron varios andamiajes para verificar su capacidad para remodelar el patrón de metástasis peritoneal independientemente del tipo de biomaterial. Los paneles muestran ensayos *in vivo* similares realizados con cultivo primario generado de ascitis de cáncer ovárico marcados con DiD (panel derecho superior), para trasladar a muestras clínicas relevantes la eficacia del andamiaje M-Trap de poliestireno/policaprolactona; y los andamiajes alternativos (andamiaje 3D Biomerix, paneles derechos medios; Sistema de Cultivo 3D AlgiMatrix, paneles derechos inferiores). Todas las muestras ensayadas capturaron eficazmente células tumorales metastásicas independientemente del biomaterial.

Figura 14 – demuestra que fibronectina y colágeno son agentes de captura eficaces en un producto de la invención, y que ambos aumentan la adhesión celular a un andamiaje. En este ejemplo se usó un andamiaje de poliestireno/policaprolactona.

Figura 15 – demuestra que un hidrogel hecho del polímero pluronic por sí mismo es un agente de captura eficaz para células cancerosas metastásicas.

Figura 16 – Las figuras 16A y B demuestran que una trampa de la invención, es decir, una que comprende exosomas y un andamiaje 3D Biomerix (hecho de una matriz de policarbonato poliuretano-urea, entrecruzada), se puede usar para prolongar los tiempos de supervivencia objeto en un modelo de cáncer ovárico en ratón. Las figuras 16C y D muestran que una trampa de la invención se puede eliminar con la erradicación completa de células SKOV3 metastásicas de la cavidad peritoneal en un modelo en ratón.

Materiales y métodos

Purificación y caracterización de exosomas

Los exosomas del líquido ascítico de pacientes diagnosticadas con adenocarcinoma ovárico en el Hospital Universitario de Santiago de Compostela se purificaron por ultracentrifugación. Brevemente, 36 ml de líquido ascítico se centrifugaron secuencialmente a 300 g durante 10 min, 2.000 g durante 20 min, y 10.000 g durante 30 min con el fin de precipitar células y restos celulares. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de tamaño de poro de 22 micrómetros y se centrifugó adicionalmente a 100.000 g durante 90 min (rotor SW80; Beckman Instruments). El precipitado resultante se resuspendió en 100 μ l de solución salina tamponada en fosfato, se hicieron alícuotas y almacenaron a -20°C. La cuantificación de los exosomas se realizó por lisis de proteínas exosómicas por nanodrop y ensayo de Bradford. El tamaño de los exosomas se analizó a 25°C con un ángulo de detección de 90° y anemometría Doppler láser respectivamente (Zetasizer 3000HS Malvern Instruments). La morfología de los exosomas se evaluó por microscopía electrónica de transmisión (MET) usando 10 μ l de suspensión acuosa de nanopartículas.

Dispositivo de trampa

Los productos de la invención que comprenden un soporte y un agente para modular la diseminación de células tumorales, o un agente para modular la diseminación de células tumorales sin un soporte, también se denominan en el presente documento dispositivos de trampa o trampas, o M-trap ya que sirven para “atrapar” células tumorales. En un ejemplo un dispositivo de trampa se hizo marcando exosomas aislados con DID (octadecilindocarbocianina) un marcador fluorescente rojo, y dejándolos caer en el 3D InsertTM-PS con andamiaje de cultivo tisular de nanomalla (3D Biotek, Nueva Jersey, EE UU). Los andamiajes con exosomas se implantaron en ratones anestesiados por laparotomía quirúrgica y se unieron a la superficie de la pared abdominal con la ayuda de pegamento quirúrgico (Sistema de sellado de fibrina SurgiSeal; BioSTAR, Toronto, Canadá).

Alternativamente, se hizo un dispositivo de trampa usando 50000 células madre mesenquimatosas de origen adiposo (hMSC Adip P10763 Innoprot, Bizkaia, España) que se sembraron en el andamiaje 3D por capilaridad según las instrucciones del fabricante (véase el esquema en la figura 9), 24 horas antes de la implantación en los ratones. El andamiaje 3D era el 3D InsertTM-PS con andamiaje de cultivo tisular de nanomalla (3D Biotek, Nueva Jersey, EE UU).

La referencia en el presente documento a “M-Trap” se refiere a un andamiaje 3D-Biotek consistente en insertos 3D de poliestireno/policaprolactona con nanomalla (<http://www.3dbiotek.com/web/prod/3dnanomesh.aspx>), típicamente M-Trap está decorado con un agente para modular la diseminación de células tumorales, tal como un agente de captura o un quimioatrayente.

Modelo en ratón

1x10⁶ células SKOV3, que expresaban establemente un gen indicador luciferasa, se resuspendieron en 200 ml de solución salina tamponada en fosfato y se inyectaron en el peritoneo de ratones. Una semana después de la inyección, se administró el sustrato luciferina a los ratones por inyección por vía intraperitoneal y, después del sacrificio, se usó imagenología de luminiscencia en el sistema de imagenología CT espectro IVIS para determinar el patrón de metástasis de células SKOV3 en el peritoneo de los ratones.

Las células SKOV3 con células epiteliales derivadas de ascitis de un adenocarcinoma ovárico (para más información: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-77&Template=cellBiology>).

5 Los ratones usados con hembras SCID de 6-8 semanas de edad.

10 Un fin de la presente invención era proporcionar un producto/dispositivo de trampa que pueda capturar células tumorales, el producto o dispositivo de trampa también puede actuar como un potente transmisor de señales que son capaces de atraer células tumorales. Este producto representaría una trampa para las células tumorales y, al modular la diseminación de células tumorales, este producto (trampa) prevendría la generación de focos metastásicos en localizaciones indeseadas.

15 Resultados

Modelo de cáncer ovárico

20 Los datos presentados en el presente documento demuestran que en un modelo de cáncer ovárico que mimetiza la diseminación tumoral un producto/trampa de la invención puede modular la metástasis del cáncer. En el modelo, 1×10^6 células de cáncer ovárico SKOV3 se inyectan por vía intraperitoneal en un ratón lo que genera un patrón reproducible de metástasis con focos en el páncreas y la grasa gonadal una semana después de la inyección (Figura 1).

25 El producto de la invención usado para capturar/atrapar las células tumorales metastásicas era un M-Trap consistente en un 3D InsertTM-PS con andamiaje de cultivo tisular de nanomalla (3D Biotek, Nueva Jersey, EE UU), que contenía 50 µg de exosomas purificados del líquido ascítico de una paciente de cáncer ovárico (Figura 2).

30 La capacidad de los exosomas para atraer y atrapar células SKOV3 se demostró *in vitro* en un ensayo de migración en cámara de Boyden. Brevemente, 50.000 células SKOV3 se sembraron en el compartimento superior y los exosomas se colocaron en el compartimento inferior de una cámara de Boyden. Después de 24 horas de incubación, se cuantificó el número de células SKOV3 que migran a través de la membrana porosa debido al gradiente de quimioatracción de los exosomas. Como se muestra en la figura 3, los exosomas atrajeron eficazmente células SKOV3 en comparación con el control de medio de cultivo sin ningún quimioatrayente. A partir de estos resultados se concluyó que los exosomas son quimioatrayentes eficaces de células tumorales y pueden capturar las células atraídas.

35 La capacidad de los exosomas para capturar células SKOV3 se demostró *in vivo* usando un modelo animal, donde el producto de la invención, o M-trap, estaba compuesto de un andamiaje y exosomas. Estos experimentos demostraron que el producto de la invención era capaz de atrapar células tumorales metastásicas. En los experimentos, se inyectaron ratones por vía intraperitoneal con 1×10^6 células SKOV3 que expresan el gen indicador luciferasa para seguir la eficacia de la inyección y para el seguimiento *in vivo* de la formación de metástasis. Los ratones se inyectaron en ausencia o presencia del andamiaje con los exosomas implantados en la parte contralateral de la pared abdominal. El páncreas se consideró como uno de los focos naturales de metástasis en este modelo. Los andamiajes con los exosomas se implantaron en el peritoneo por laparotomía con la ayuda de pegamento quirúrgico (Sistema de sellado de fibrina SurgiSeal; BioSTAR, Toronto, Canadá), y las células SKOV3 se inyectaron una semana después de la cirugía. Como se muestra en la figura 5, mientras que las células SKOV3 inyectadas por vía intraperitoneal generaron focos metastásicos en el páncreas y la grasa gonadal (Figura 5A), se encontró una única localización de células SKOV3 dentro de y alrededor del andamiaje/trampa que contenía los exosomas como quimioatrayente y/o agente de captura (Figura 5B).

50 Estos resultados demostraron que una trampa/producto de la invención es capaz de interferir con la diseminación de células tumorales, y de atraer y atrapar las células metastásicas en una única localización previniendo de esta manera la metástasis.

55 Para demostrar adicionalmente la eficacia de los exosomas para atraer y atrapar células tumorales y prevenir el desarrollo de focos metastásicos modulando la diseminación de células tumorales, independientemente del andamiaje, se desarrolló un modelo *in vivo* de diseminación ovárica metastásica en presencia de exosomas inyectados en la grasa gonadal de los ratones. Para esto, exosomas purificados del líquido ascítico de una paciente de cáncer ovárico se resuspendieron en 100 µl de PBS (15 mg de exosomas/ml), y se realizó cirugía peritoneal para inyectar la solución de exosomas en la grasa localizada en la base del útero de los ratones (grasa gonadal en la figura 6A). En este caso, la grasa representaba el soporte de los exosomas. Una semana después, se inyectaron 1×10^6 células SKOV3 por vía intraperitoneal y siete días después los ratones se sacrificaron para analizar el patrón de diseminación de metástasis. Como se muestra en la figura 6B, los exosomas localizados en la grasa gonadal fueron capaces de atraer y atrapar todas las células SKOV3, eliminando el foco de metástasis en el páncreas (véase el patrón normal de diseminación de células SKOV3 en la figura 5A o 7B). Se obtuvieron resultados similares cuando los exosomas purificados se embebieron en MatrigelTM, una matriz extracelular que proporcionaba una consistencia semisólida a los exosomas (Figura 6C); Matrigel con los exosomas se puede considerar como una alternativa a un andamiaje con los exosomas.

Para evaluar la validez del producto de la invención/dispositivo de trampa para atraer y/o atrapar células tumorales con otros agentes para modular la diseminación de células tumorales, se desarrolló un producto que comprende un andamiaje 3D sembrado con células madre mesenquimatosas (MSC), como una alternativa a los exosomas. Para probar la capacidad de las MSC para modular la diseminación de células metastásicas, un dispositivo de trampa que comprendía 50.000 MSC de origen adiposo se sembró en el andamiaje 3D Biotek 24 horas antes de la implantación en la pared abdominal de los ratones (Figura 7A). Como en los experimentos previos, siete días después de la implantación de este producto alternativo, 1×10^6 células SKOV3 se inyectaron por vía intraperitoneal y una semana después los ratones se sacrificaron y el patrón de diseminación de metástasis se analizó. Como se muestra en figuras previas, el patrón normal de diseminación de células SKOV3 en este modelo consiste en focos metastásicos en el páncreas y en la grasa gonadal (Figura 7B). Sin embargo, el producto compuesto de MSC dentro del andamiaje 3D atrajo eficazmente las células SKOV3 (Figura 7C). Estos resultados confirmaron la capacidad del producto/dispositivo de trampa para atrapar células tumorales metastásicas con un agente diferente para modular la diseminación de células tumorales usado.

Modelo de cáncer de colon y endometrial

Para evaluar la validez del producto de la invención/dispositivo de trampa para modular la diseminación de células tumorales independiente del tipo de cáncer, los experimentos con el andamiaje 3DBiotek y exosomas se reprodujeron usando células tumorales de colon (HCT116) y de origen endometrial (Ishikawa), más que células tumorales ováricas. Estos dos tipos de cáncer también presentan diseminación de células tumorales dentro del peritoneo.

El andamiaje con los exosomas se implantó en la pared abdominal contralateral al páncreas, como se ha descrito (Figura 5; Figura 7). Una semana después de la cirugía, 1×10^6 células HCT116 o Ishikawa que expresaban establemente el gen indicador luciferasa se inyectaron por vía intraperitoneal y siete días después de la inyección los ratones se sacrificaron y el patrón de diseminación de células tumorales y metástasis peritoneal se evaluó por luminiscencia. En paralelo, se inyectaron células HCT116 o Ishikawa en ratones sin andamiajes para evidenciar el patrón normal de metástasis. Como se muestra en la figura 8, las células tumorales de colon HCT116 principalmente se metastatizaban al páncreas y al hígado (Figura 8A), mientras que la diseminación de células tumorales endometriales Ishikawa preferentemente producía un único foco de metástasis en el páncreas (Figura 8C). Como se observó con las células de cáncer ovárico SKOV3, el páncreas representa un sitio preferente para el desarrollo de metástasis relacionada con la diseminación peritoneal en estos modelos. Además, los tropismos específicos de tipo celular incluían la grasa gonadal en el caso de las células tumorales ováricas, y el hígado para las células tumorales de colon.

Como con el cáncer de ovario, el patrón de diseminación de metástasis estaba completamente modificado cuando se inyectaron células tanto HCT116 como Ishikawa en presencia del andamiaje con exosomas. La gran mayoría de las células se localizaban en y alrededor del andamiaje, lo que demuestra la capacidad del dispositivo de trampa compuesto de un andamiaje 3D que contiene exosomas como quimioatrayente para atraer y capturar eficazmente las células de cáncer de colon HCT116 (Figura 8B) y las células tumorales endometriales Ishikawa (Figura 8D). Estos resultados demuestran que el producto de la invención/dispositivo de trampa es capaz de atraer y capturar células tumorales metastásicas independientemente del tipo de cáncer.

El producto de la invención actúa como un nicho preferente para la implantación y captura eficazmente células metastásicas peritoneales

Para confirmar si un producto de la invención, ejemplificado usando el M-Trap (un andamiaje 3D-Biotek decorado con exosomas como se ha descrito anteriormente) también se puede comportar como un dispositivo no farmacológico, y para demostrar que un modo de acción del producto es apoyar una implantación (o captura) preferente de células tumorales metastásicas, se realizaron ensayos de adhesión celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Primero, se realizaron ensayos de adhesión a corto plazo con células SKOV3 marcadas con calceína sembradas en pocillos hechos del mismo material de poliestireno que el andamiaje M-Trap, y se lavaron después de 1 hora de incubación a 37°C; después las SKOV3 unidas al fondo de los pocillos se cuantificaron por fluorescencia. Como se muestra en la figura 10A, las células SKOV3 presentaron más capacidad adhesiva en presencia de exosomas que decoraban el fondo del pocillo. Además, la adhesión de células SKOV3 a los exosomas se pudo abolir parcialmente con anticuerpos dirigidos contra dos de las proteínas de exosomas identificadas previamente descritas que median la adhesión celular, las tetraspaninas CD9 y CD81, indicativo de un papel específico de los exosomas en mediar la adhesión de células SKOV3 (Figura 10A). A continuación, dirigiéndose a mimetizar *in vitro* el flujo natural de fluido peritoneal dentro de cavidad abdominal, que está dirigido por gravedad a sus sitios más dependientes y proporciona una ruta para la diseminación transcelómica de células tumorales despegadas (Tan et al., Lancet Oncol. 2006;7:925-34), se evaluó la adhesión de células SKOV3 a un dispositivo M-Trap sometido a movimiento orbital (Figura 10B). En estas condiciones dinámicas, la implantación preferente de células SKOV3 en presencia de exosomas aumentó en comparación con la adhesión al andamiaje y al andamiaje pretratado con polihema para evitar la adhesión (Figura 10B). Además, la captura de células SKOV3 por el andamiaje vacío se pudo aumentar por decoración con proteínas CD9 o CD81 (Figura 10B), y la de M-Trap disminuir por bloqueo de los exosomas con anticuerpos anti-CD9 o anti-CD81 (Figura 10B). Además, la decoración del andamiaje vacío con estas dos proteínas aumentó sus propiedades de adhesión de una manera

dependiente de la dosis, similar a las cantidades aumentadas de exosomas (Figura 10C). Por último, la adhesión dinámica de células SKOV3 al andamiaje pretratado o no con polihema y a tecnología M-Trap se investigó adicionalmente en condiciones de perfusión donde se bombeó un flujo constante de 750 µl/min de células tumorales en suspensión en una cámara donde se colocaron los andamiajes. Como se muestra en la figura 10D, la captura basal de células SKOV3 en el andamiaje debido a las propiedades adhesivas se mejoró más en presencia de exosomas. A partir de estos resultados se puede concluir que *in vitro*, la capacidad adhesiva de la tecnología M-Trap se comporta como un modo de acción para capturar células tumorales; la adhesión basal de células SKOV3 al andamiaje 3D-Biotek aumenta tanto con exosomas purificados como con las proteínas adhesivas exosómicas CD9 y CD81. Además, el flujo orbital que mimetiza la diseminación transcelómica presente en la cavidad peritoneal en metástasis de cáncer ovárico puede facilitar el paso y contacto de células tumorales metastásicas con M-Trap, mejorando de esta manera su eficacia.

Una vez caracterizado *in vitro*, se emprendieron experimentos para trasladar este modo de acción de M-Trap a un modelo de ratón *in vivo* de inyección intraperitoneal de células SKOV3 que mimetiza la diseminación de cáncer ovárico y la metástasis peritoneal. Para esto, M-Trap se implantó quirúrgicamente en la pared interna del peritoneo, enfrente del páncreas (esquema en la figura 11A) y 1×10^6 células SKOV3 que expresaban establemente el gen indicador luciferasa se inyectaron una semana después. Los animales se sacrificaron una semana después de la inyección intraperitoneal, y el patrón de diseminación se evaluó por bioluminiscencia. El patrón de metástasis peritoneal en ausencia de andamiaje presentaba dos focos principales en el páncreas y la almohadilla grasa gonadal (Figura 11B). En contraste, en presencia de un andamiaje vacío sin exosomas, se observó un foco adicional de células SKOV3 dentro del andamiaje (Figura 11C), trasladando a un modelo *in vivo* la capacidad del andamiaje de adherir células tumorales metastásicas. Notablemente, el patrón de diseminación de las células tumorales ováricas metastásicas en presencia del dispositivo M-Trap se remodeló/moduló por completo, con la erradicación de los lugares habituales de metástasis y presentando un único foco dentro del andamiaje con exosomas (Figura 11D).

Además, cuando la capacidad adhesiva del andamiaje vacío se limitó por un tratamiento con polihema, se observó una capacidad reducida para capturar células SKOV3 metastásicas (Figura 12A). Por el contrario, cuando la capacidad adhesiva del andamiaje se aumentó al decorarlo con la tetraspanina CD81, se evidenció una capacidad aumentada para capturar células SKOV3 metastásicas por la eliminación de metástasis pancreática (Figura 12B). Se obtuvieron resultados similares al decorar el andamiaje con tetraspanina CD9 (datos no mostrados). A partir de estos resultados se puede concluir que de forma análoga a los datos *in vitro*, se pudo observar una capacidad adhesiva gradual de los andamiajes que producía la captura de células SKOV3 metastásicas, demostrando los andamiajes pretratados con polihema una adhesión residual probablemente debida a una reacción inflamatoria a cuerpo exógeno a biomateriales, una adhesión relevante al andamiaje 3D-Biotek implantado, mejorada más con la decoración de tetraspaninas CD9 o CD81, y una remodelación completa del patrón de metástasis con exosomas purificados. Globalmente, estos resultados trasladaron a un modelo *in vivo* de metástasis peritoneal ovárica que demostró la capacidad de M-Trap o una trampa de la invención para capturar células tumorales en diseminación, en donde la trampa principalmente actúa como un nicho premetastásico artificial potente donde las células metastásicas que circulan en el peritoneo se pueden adherir preferentemente en competición con los sitios naturales de implantación de metástasis.

La figura 14 demuestra adicionalmente la capacidad de trampas según la invención para capturar células SKOV3 metastásicas que se diseminan a través del peritoneo en un modelo de ratón. En esta figura se muestra que andamiajes 3D-Kube Biomerix (en donde el andamiaje está hecho de una matriz de policarbonato poliuretano-urea, entrecruzada, reticulada, no reabsorbible) decorados con fibronectina y colágeno atrapan células SKOV3 en un modelo *in vivo* de metástasis peritoneal ovárica.

La figura 15 demuestra también la capacidad de trampas según la invención para capturar células SKOV3 metastásicas que se diseminan a través del peritoneo en un modelo de ratón cuando la trampa comprende un andamiaje. En esta figura un hidrogel hecho de poloxámeros, conocido como pluronics, se usó como la trampa. La trampa se hizo al rellenar un andamiaje 3D-Biotek vacío con el hidrogel a baja temperatura para mantenerlo en forma líquida. La temperatura se aumentó después para polimerizar y solidificar el hidrogel. El hidrogel solidificado se introdujo después en el peritoneo de los ratones. Como se puede observar en la figura 15, esta trampa no biológica alternativa era capaz de capturar células metastásicas tan eficazmente como los exosomas.

La eficacia de M-Trap y otros productos/trampas según la invención para remodelar el patrón de metástasis y para transformar una enfermedad diseminada en una enfermedad focalizada se demostró adicionalmente en un modelo similar de metástasis peritoneal en cáncer colorrectal y endometrial. Ambos son tumores que clínicamente se diseminan a través de la cavidad peritoneal además de propagación hepática y sanguínea sistémica y linfática (Figura 13). Asimismo, cultivos primarios aislados de ascitis de pacientes de cáncer ovárico fueron eficazmente capturados dentro de los dispositivos M-Trap/trampa cuando se inyectaron por vía intraperitoneal en el modelo *in vivo* (Figura 13), trasladando adicionalmente el potencial de la invención para capturar células metastásicas a muestras clínicas relevantes. Por último, exosomas embebidos en una plataforma de alginato porosa (AlgiMatrix™ 3D Culture System; Gibco™, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) o en un andamiaje biointegrador (Biomerix 3D Scaffold™; Biomerix Corporation, Fremont, CA) atrapan eficazmente células SKOV3 inyectadas por vía intraperitoneal (Figura 13), lo que demuestra que la competencia de la invención es independiente del andamiaje. Todos estos resultados demuestran en un modelo *in vivo* la capacidad de dispositivos de trampa según la invención para capturar células

tumorales, los exosomas en el andamiaje generan un sitio preferente para la migración dirigida de las células tumorales metastásicas que se diseminan a través del peritoneo.

Las trampas según la invención mejoran la supervivencia en el modelo de metástasis ovárica

5 Se estudió el impacto de las trampas según la invención sobre la supervivencia en un modelo animal que mimetiza carcinomatosis peritoneal de cáncer ovárico. Un grupo control de animales fueron inyectados con $2,5 \times 10^6$ células SKOV3 por vía intraperitoneal y esto se comparó con un grupo de animales previamente implantados con un andamiaje con exosomas (grupo M-Trap). Los animales se estudiaron con respecto a morbilidad aumentada en estadios
10 avanzados de la enfermedad, y el comportamiento y estado funcional de los animales, definiéndose el punto final como una caída en su peso del 25%. Mientras que ausencia de tecnología M-Trap los ratones empezaron a perder peso aproximadamente 100 días después de la inyección de células SKOV3 y alcanzaron el punto y tuvieron que ser sacrificados a los cuatro meses, el peso de los ratones implantados con la tecnología M-Trap empezó a caer el día
15 150 y presentaron una supervivencia acumulada significativa ($p=0,025$; Figura 16A). Estos resultados demuestran claramente una ventaja clínica de la tecnología de trampa de la invención en un modelo animal que mimetiza la diseminación metastásica peritoneal en cáncer ovárico.

Notablemente, cuando la distribución de la metástasis peritoneal se analizó en el grupo M-Trap, solo se encontró una masa tumoral que crecía en el andamiaje. El examen histológico del andamiaje mostró un componente infiltrante de fibroblastos en el andamiaje y la implantación de las células tumorales ováricas en la luz del peritoneo (Figura 16B),
20 sin ningún efecto significativo sobre la atracción y captura de células tumorales metastásicas. Estos resultados refuerzan adicionalmente la tecnología de trampa de la invención como una tecnología apropiada que se dirige a capturar células tumorales metastásicas y a transformar una enfermedad sistémica en una enfermedad focalizada.

Eliminación quirúrgica de M-Trap

Para evaluar el impacto de la tecnología de trampa de la invención en un escenario clínico más realista, un animal tratado con un andamiaje con exosomas (M-trap) tuvo el andamiaje quirúrgicamente eliminado una vez que las células metastásicas ováricas habían sido capturadas. En este experimento el dispositivo M-Trap se implantó quirúrgicamente
30 como se ha descrito previamente y después $2,5 \times 10^6$ células SKOV3 se inyectaron por vía intraperitoneal. Un mes después de la inyección, cuando las células tumorales metastásicas habían sido capturadas y la masa tumoral dentro del M-Trap se pudo evidenciar (panel izquierdo en la figura 16C), el andamiaje se eliminó y los ratones se siguieron. Como se pudo observar en el panel derecho de la figura 16C, la eliminación del dispositivo M-Trap produjo una erradicación completa de células SKOV3 metastásicas de la cavidad peritoneal.
35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente que comprende una estructura porosa 3D que comprende una matriz de policarbonato poliuretano no reabsorbible con entrecruzamientos de urea; y colágeno en o sobre la matriz, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer metastásico.
2. El agente para su uso según la reivindicación 1, que comprende además fibronectina en o sobre la matriz.
- 10 3. El agente para su uso según cualquier reivindicación precedente, en donde en uso el agente atrae y/o captura células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas o cualquier célula diseminada de un tumor primario.
- 15 4. El agente para su uso según cualquier reivindicación precedente, en donde en uso el colágeno fomenta la adhesión de células tumorales diseminadas.
5. El agente para su uso según cualquier reivindicación precedente, en donde en uso el agente captura y/o atrapa células tumorales diseminadas remodelando el sitio de implantación mediante una reacción a cuerpo exógeno.
- 20 6. El agente para su uso según cualquier reivindicación precedente, que comprende además uno o más agentes quimioterapéuticos.
7. El agente para su uso según cualquier reivindicación precedente, en donde el agente se pretende para uso en la cavidad peritoneal.
- 25 8. El agente para su uso según la reivindicación 1, en donde se pretende eliminar o inactivar las células tumorales diseminadas atraídas y/o capturadas.
- 30 9. El agente para su uso según la reivindicación 8, en donde el cáncer metastásico se selecciona del grupo que comprende cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer urotelial, cáncer esofágico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, mesotelioma, sarcoma de Kaposi, cáncer ovárico, sarcoma de tejidos blandos, glioma, melanoma, cáncer de pulmón microcítico y no microcítico, cáncer endometrial, carcinoma de células basales, carcinoma de células transicionales del aparato urotelial, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, sarcoma uterino, mieloma múltiple, sarcoma de tejidos blandos y huesos, y colangiocarcinoma o un cáncer diseminado de los mismos.
- 35 10. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 8 o 9, en donde se pretende implantar el agente en la cavidad peritoneal de un sujeto.
- 40 11. El agente para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 8-10, en donde el cáncer metastásico es un cáncer de la cavidad peritoneal o un cáncer diseminado en la cavidad peritoneal.
- 45 12. El agente para su uso según la reivindicación 11, en donde el cáncer metastásico se selecciona del grupo que comprende cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer urotelial, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma de células transicionales del aparato urotelial, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer hepatocelular, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de vejiga y sarcoma uterino o un cáncer diseminado de los mismos.

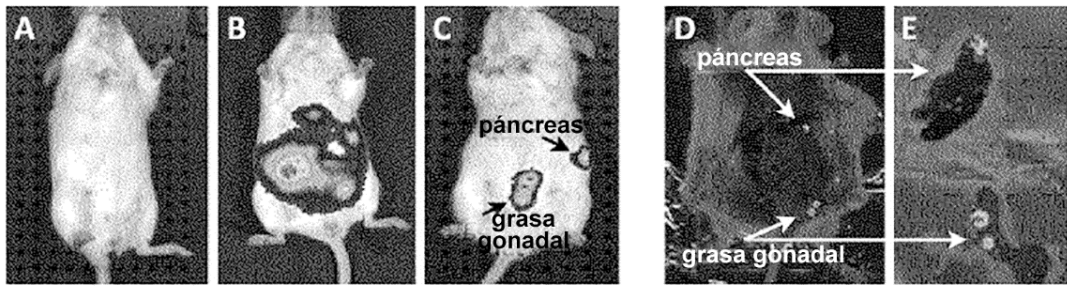


Figura 1

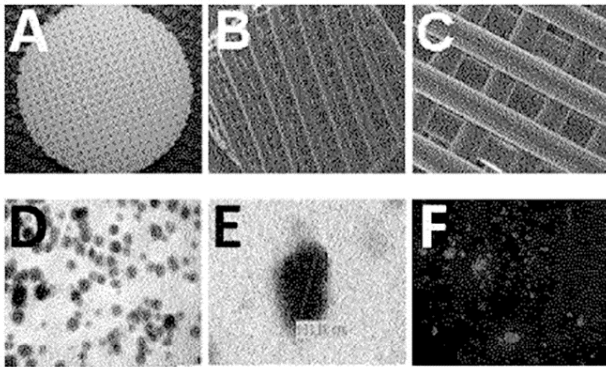


Figura 2

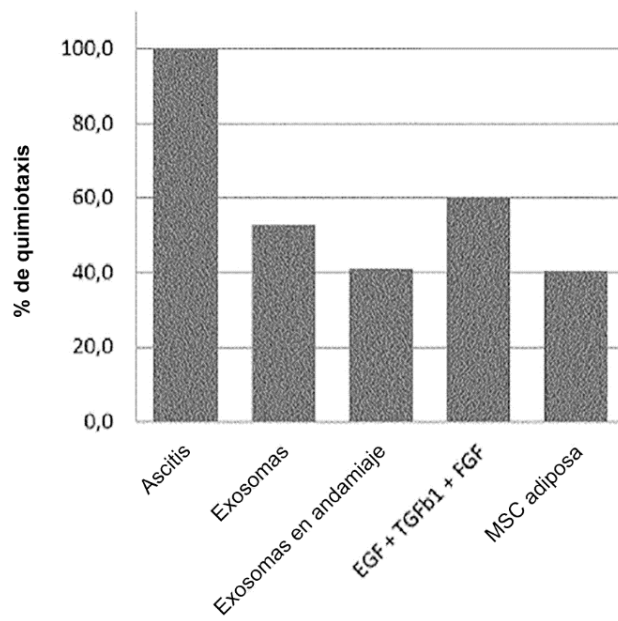


Figura 3

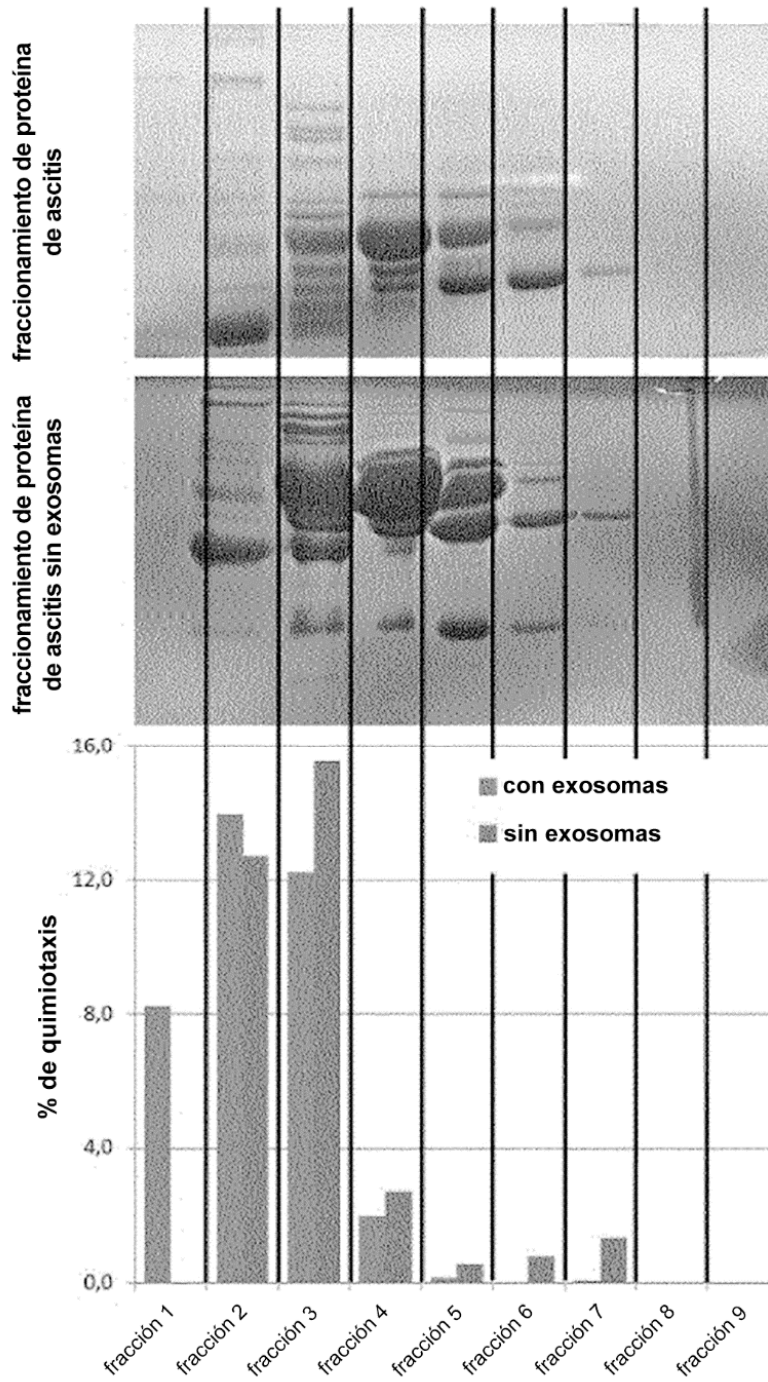


Figura 4

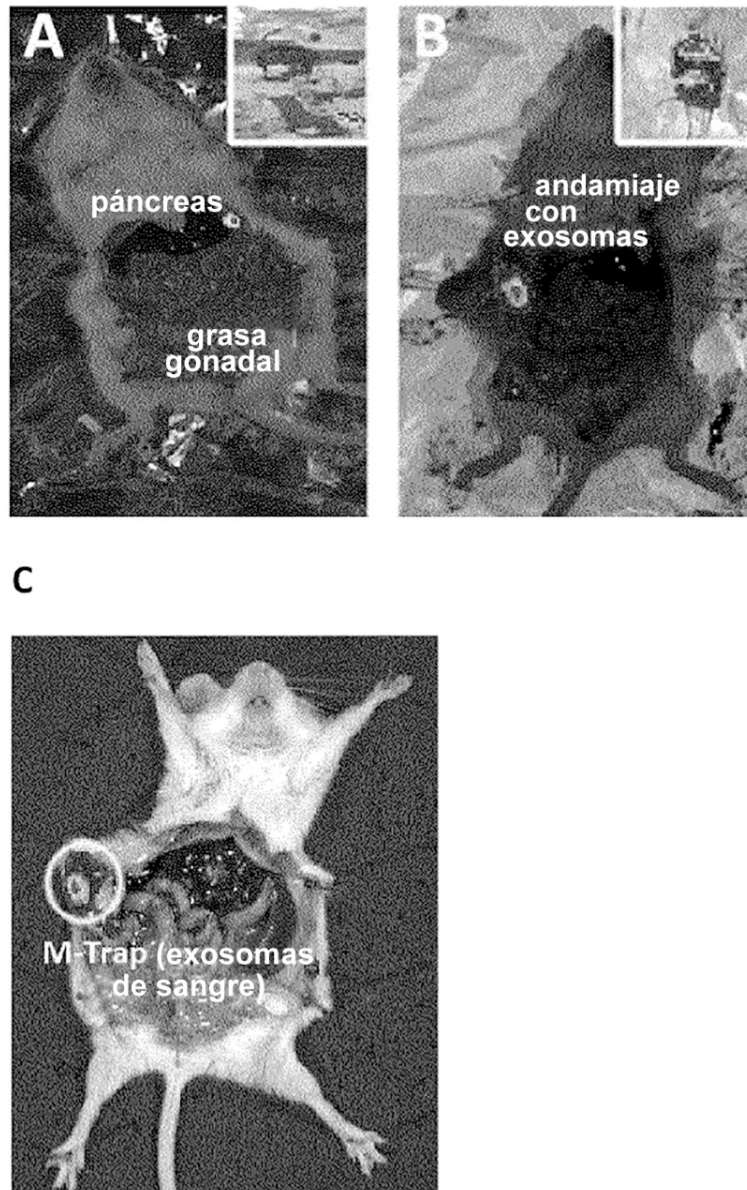


Figura 5

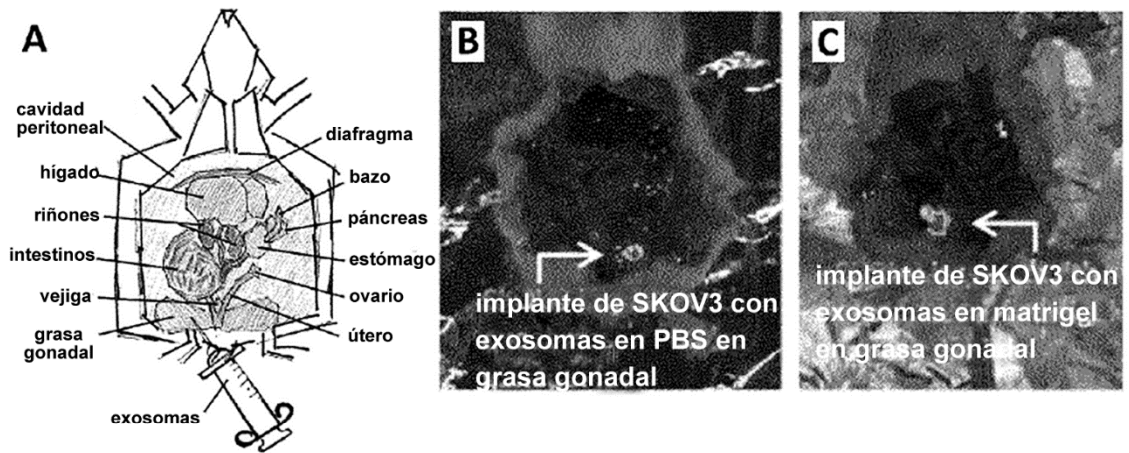


Figura 6

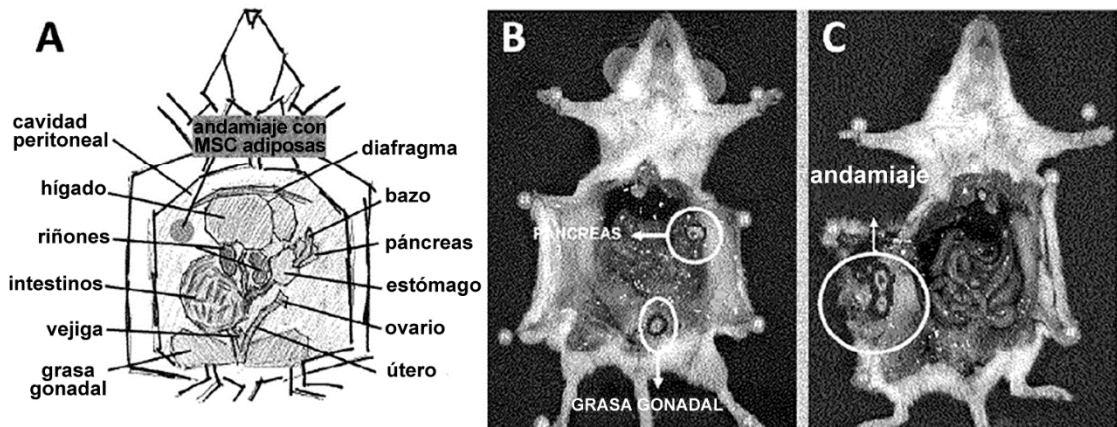


Figura 7

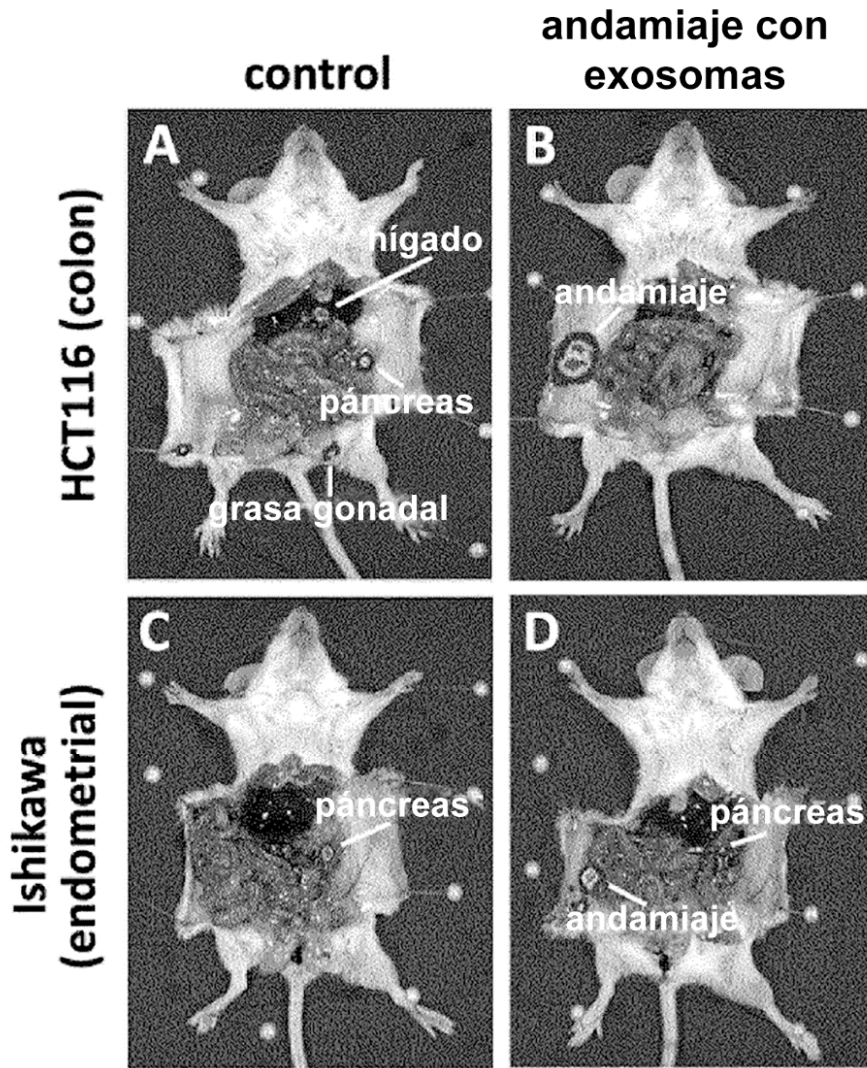


Figura 8

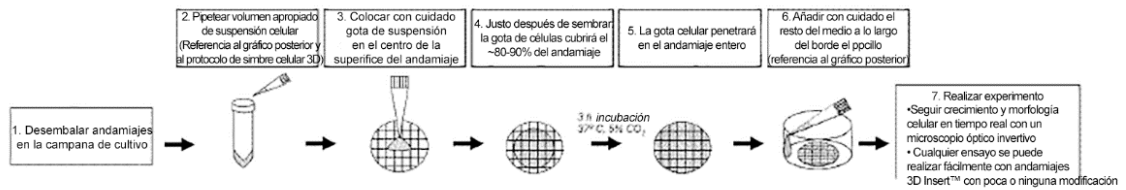


Figura 9

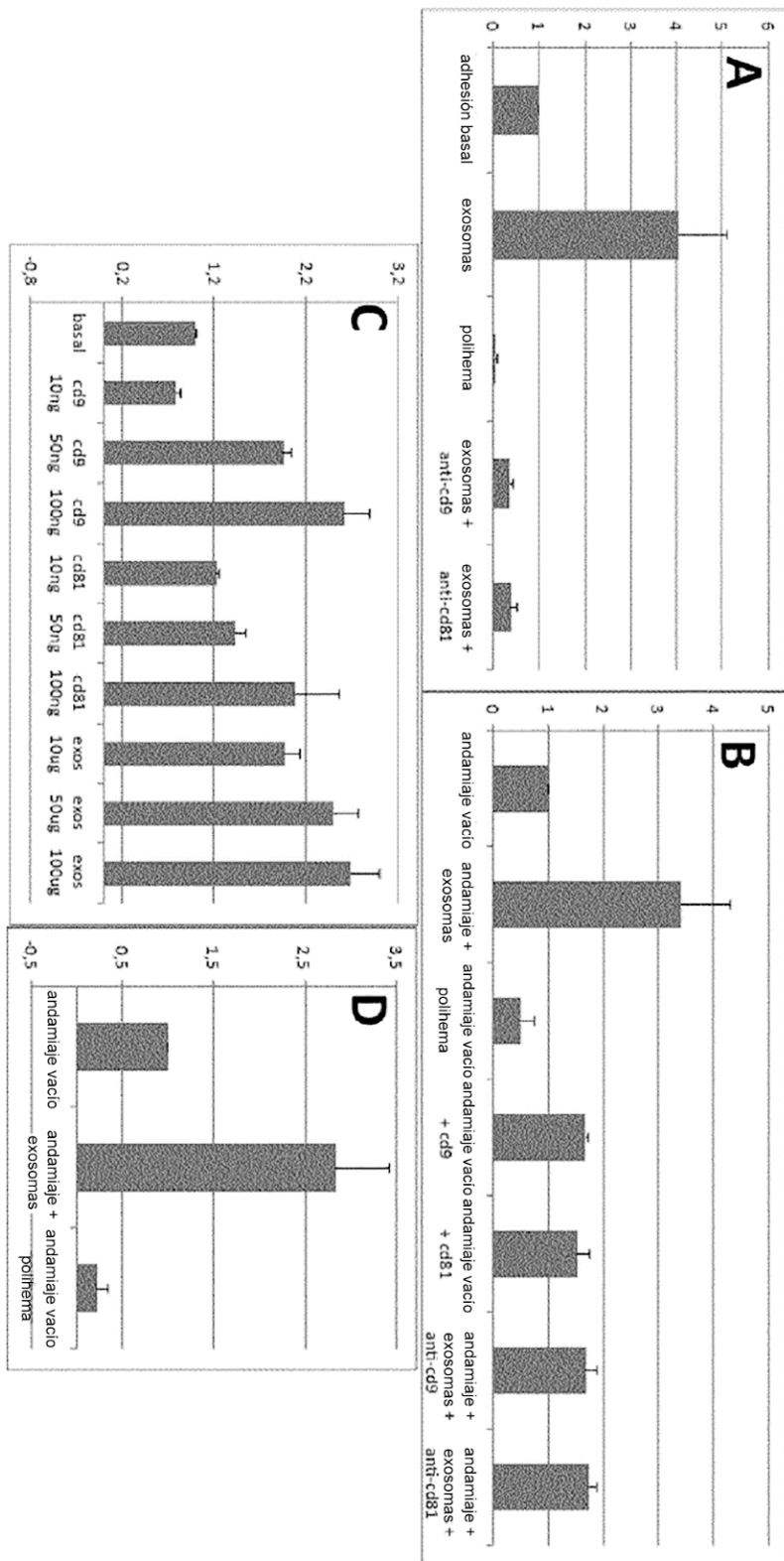


Figura 10

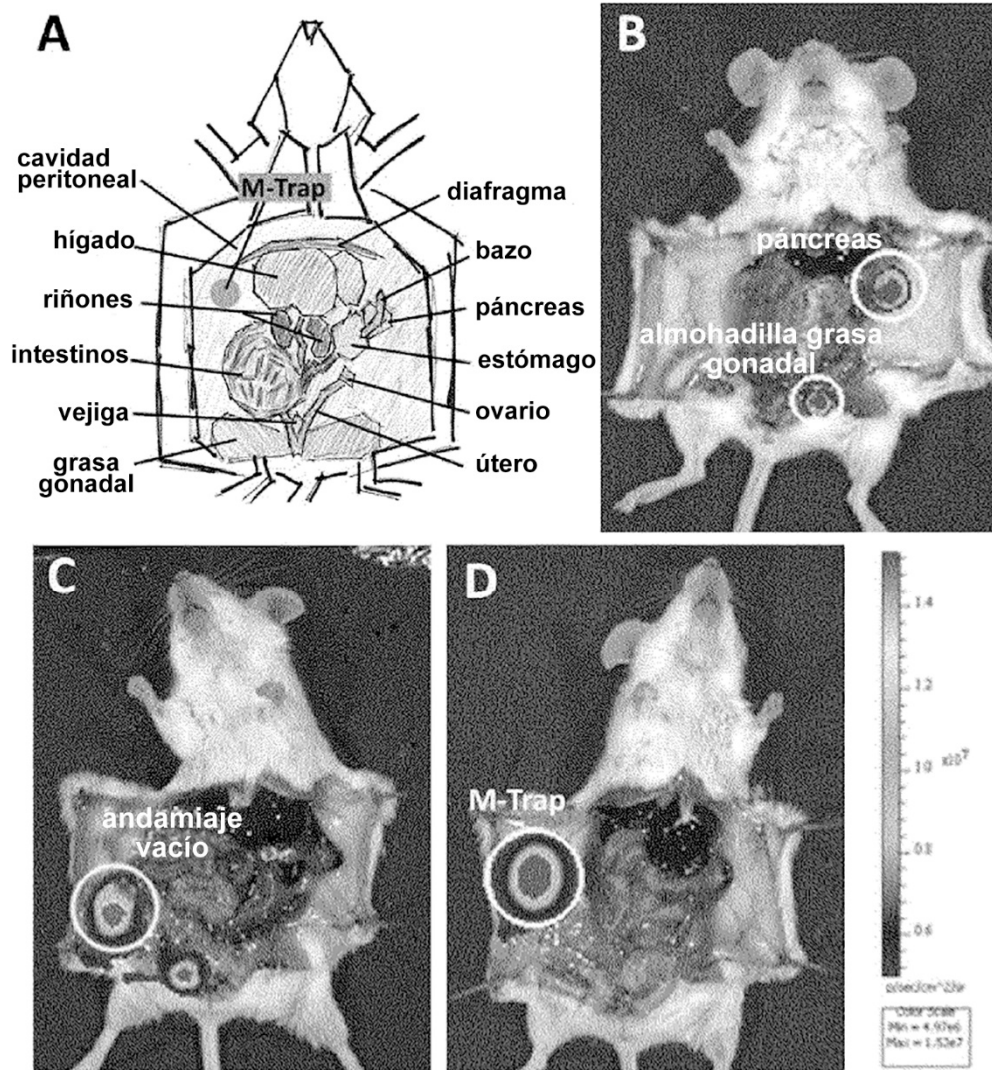


Figura 11

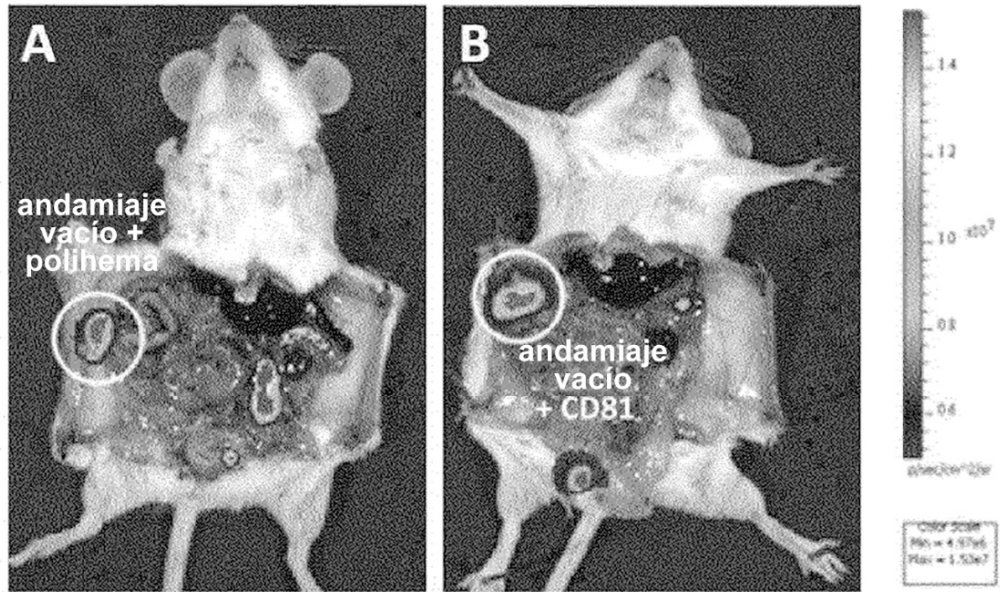


Figura 12

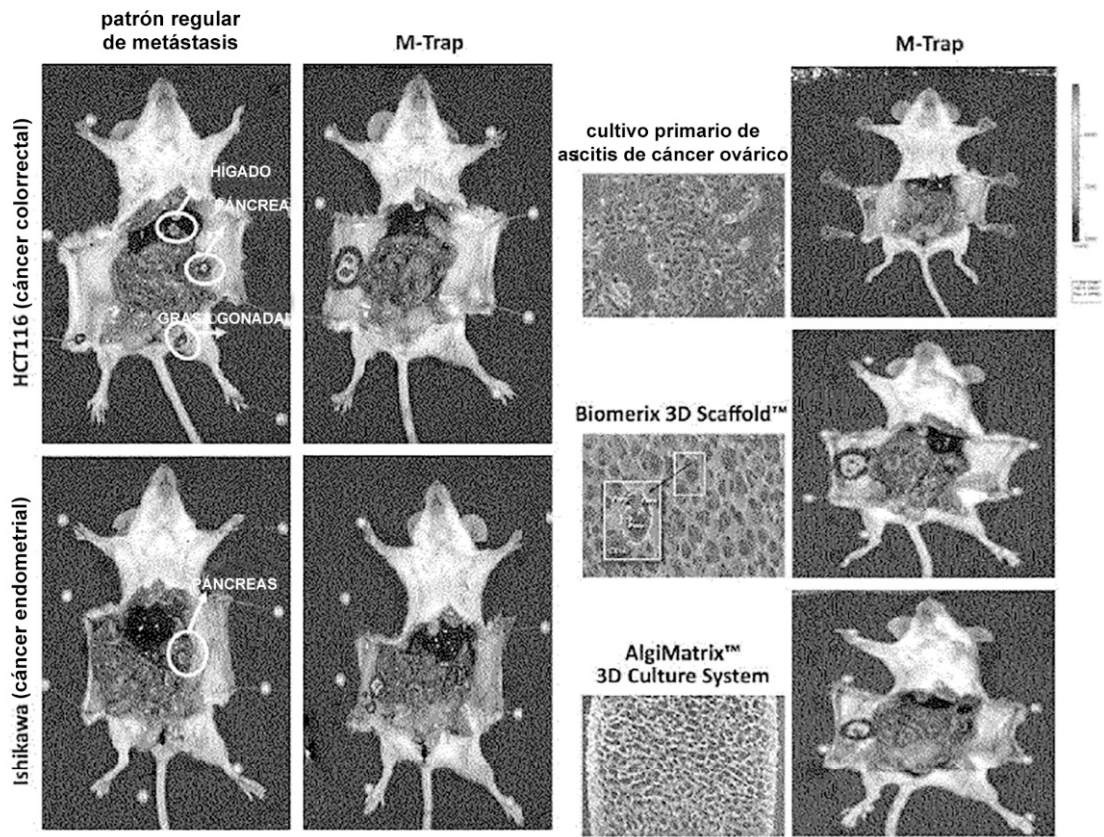


Figura 13

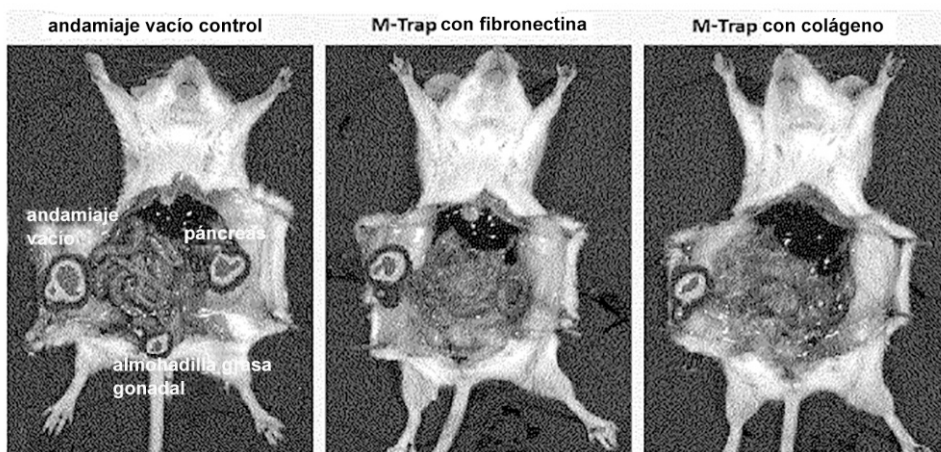


Figura 14

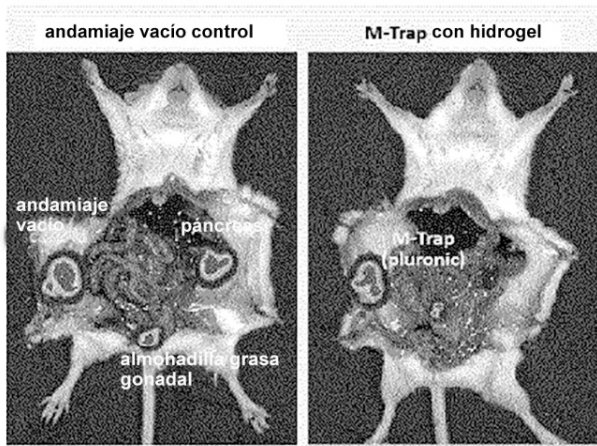


Figura 15

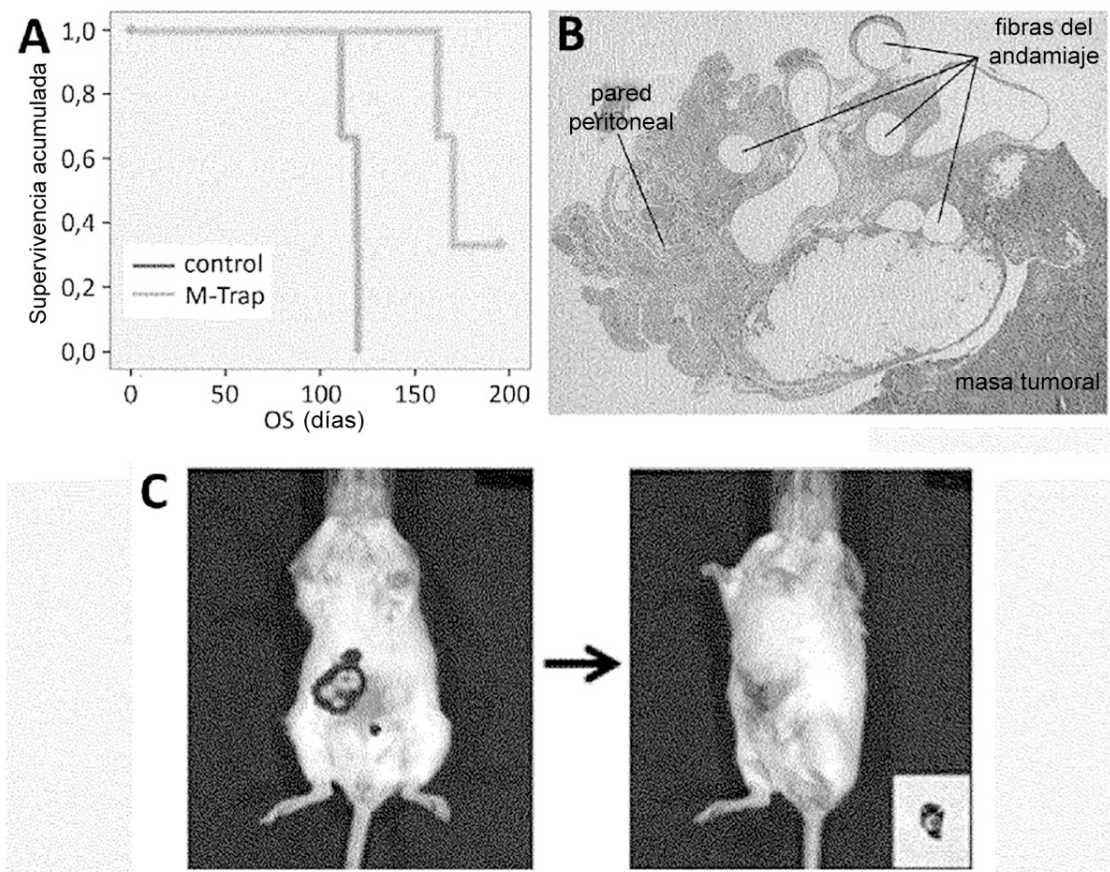


Figura 16