



MD/EP 4132587 T2 2024.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 4132587 (13) T2

(51) Int. Cl.:A61K 47/61 (2017.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
C08B 37/08 (2006.01.01)
C08L 5/08 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2023 0180 (22) Data de depozit: 2021.04.07 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 21717556.1, 2021.04.07 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:4132587, 2023.02.15 (31) Numărul cererii prioritare: 202000007747 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2020.04.10 (33) Țara cererii prioritare: IT	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 09/2024, 2024.09.30 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 18/2024, 2024.05.01 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 02/2023, 2023.02.28
(71) Solicitant: FIDIA FARMACEUTICI S.P.A., IT (72) Inventatori: PIZZOCARO Carlo, IT; ROSATO Antonio, IT (73) Titular: FIDIA FARMACEUTICI S.P.A., IT (74) Mandatar autorizat: SOCOLOVA Sofia	

(54) Conjugat HA-paclitaxel pentru tratamentul mezoteliomului

(57) Rezumat:

Conjugat HA-paclitaxel pentru utilizare în tratamentul loco-regional al mezoteliomului, adică al mezoteliomului pleural malign, mezoteliomului pericardial și mezoteliomului peritoneal, preferabil mezoteliomului pleural malign, și compoziții farmaceutice în legătură cu aceasta sunt descrise.

Revendicări: 8

Figuri: 2

MD/EP 4132587 T2 2024.09.30

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de titular)****OBIECTUL INVENȚIEI**

- 5 Prezentă invenție descrie conjugatul de acid hialuronic la paclitaxel și compoziția care cuprinde sau constă dintr-un astfel de conjugat asociat cu diluanți/excipienti acceptabili farmacologic, pentru utilizare în tratamentul loco-regional al mezoteliomului, în special pleural malign.

DOMENIUL INVENȚIEI

- 10 Termenul membrană seroasă sau tunică înseamnă un anumit țesut format dintr-un epiteliu simplu de pavaj cunoscut sub numele de **mezoteliu** susținut de un țesut conjunctiv subiacent, vascularizat și inervat. Funcția membranei seroase este de a acoperi organele toracelui și abdomenului, de aceea se poate distinge în visceral, stratul sau foaia care acoperă organul, și parietal, stratul sau foaia exterioară care este îndreptată spre și câptușește peretele; între cele două straturi este identificată o cavitate virtuală cunoscută sub denumirea de cavitate seroasă care conține cantități moderate de lichid seros produs de mezoteliu, în timp
- 15 ce țesutul conjunctiv subiacent asigură alimentarea cu sânge și nervi fiind mezoteliul complet lipsit de vase de sânge și nervi.

Pe baza organului sau a peretelui acoperit, se distinge o membrană seroasă

- care acoperă inima și mediastinul, cunoscută sub numele de pericard;
- care acoperă plămânii și peretele toracic, cunoscută sub numele de pleură;
- 20 • care acoperă peretele abdominal și organele conținute în acesta, cunoscută sub numele de peritoneu;
- care acoperă testiculul, cunoscută sub numele de tunică vaginală;
- care acoperă, în cele din urmă, uterul, cunoscută sub numele de perimetru.

- 25 Pleura este așadar o membrană seroasă cu perete dublu care acoperă și aderă la peretele interior al toracelui cu foaia parietală și la peretele distal al fiecărui plămân cu foaia sa viscerală.

Neoplasmul care provine din celulele mezoteliului se numește **mezoteliom** și, prin urmare, poate proveni din torace, abdomen și, foarte rar, din cavitatea din jurul inimii și din membrana care acoperă testiculele.

- 30 Mezoteliomul este o tumoră rară, reprezentând mai puțin de 1% din totalul bolilor oncologice chiar dacă incidența sa este în continuă creștere cu 2,2 cazuri la milion de oameni; este un neoplasm foarte agresiv iar cea mai frecventă formă este cea care afectează pleura: în acest caz este definit ca mezoteliom pleural malign (MPM) care reprezintă aproximativ 80% din totalul cazurilor de mezoteliom, cazurile de mezoteliom peritoneal, pericardic și testicular fiind mai rare; mai frecvent la bărbați, incidența mezoteliomului crește odată cu vârsta cu 75% dintre pacienți având vârsta peste 65 de ani.

- 35 Cel mai important factor de risc pentru mezoteliom pleural (dar în general pentru toate tipurile de mezoteliom) este reprezentat de expunerea la azbest: într-adevăr, majoritatea acestor tumori afectează persoanele care au intrat în contact cu această substanță în principal la locul de muncă, sau care locuiesc cu oameni care lucrează cu ea. Azbestul este un mineral natural cu o structură fibroasă aparținând clasei chimice a silicaților și, datorită rezistenței sale deosebite la căldură, a fost utilizat pe scară largă în trecut
- 40 pentru etanșarea și izolarea acoperișurilor (într-un material cunoscut sub numele de Eternit), la nave și trenuri, în construcții (tigle, pardoseli, vopsele...), la costume de pompieri, la autoturisme (componente mecanice și vopsele) și în alte sectoare.

- Când acest mineral este fragmentat, de exemplu în timpul extracției și prelucrării mineralelor sau pentru uzura materialului care îl conține, se produce o pulbere foarte fină rămasă în suspensie în aer chiar
- 45 și pentru o perioadă lungă de timp și care este ușor de inhalat. Această pulbere poate deteriora celulele mezoteliale provocând (în unele cazuri) cancer chiar și la zeci de ani de la expunere. Alți factori de risc pentru mezoteliom sunt:

- virusul simian SV40, utilizat în vaccinurile poliomielitei între 1955 și 1963;
- dioxid de toriu utilizat între anii 1920 și 1950;
- 50 • radiații către torace și abdomen.

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

- Tratamentul mezoteliomului depinde în general de locul tumorii, stadiul bolii, vârsta pacientului și starea generală de sănătate. Opțiunile standard de tratament includ chirurgie, radioterapie și
- 55 chimioterapie.

În general, în stadiul I MPM, tumora este limitată la pleura parietală și nu este prezentă în ganglionii limfatici; în stadiul II afectează și pleura viscerală, plămânul sau diafragma; în stadiul III, tumora a invadat primul strat al peretelui toracic, o parte a mediastinului sau un punct de pe peretele toracic; poate afecta, de asemenea, suprafața exterioară a pericardului și a ganglionilor limfatici de pe una dintre cele două

părți ale toracelui; în stadiul IV, tumora a ajuns în alte organe (metastaze) precum ficatul, creierul, oasele sau ganglionii limfatici de pe ambele părți ale toracelui.

Conform studiilor clinice recente, chimioterapia poate fi considerată ca singurul tratament capabil să prelungească (cel puțin parțial) viața pacientului, îmbunătățind, deși limitat, calitatea acesteia. Medicamentele aprobate pentru o astfel de utilizare, utilizate în mod obișnuit singure (sau mai des în combinație), sunt pemetrexed (Alimta®), cisplatină și raltitrexed (Tomudex®); mitomicina, vinorelbina și gemcitabina sunt în schimb încă în stadiu experimental, cu toate acestea, mezoteliomul pleural malign MPM (ca toate celelalte forme de mezoteliom) este în general refractar la astfel de tratamente și rezultatele obținute sunt modeste (Stahel RA. și colab., Ann Oncol., 2015, 26(8):1649-60). Agenții chimioterapeutici au, de asemenea, efecte secundare foarte debilitante și, prin urmare, există multe incertitudini și chiar contraindicații cu privire la oportunitatea de a începe chimioterapia la diagnosticul sau la debutul simptomelor precoce ale MPM.

În Sasai Masao și colab., ANTICANCER RESEARCH, vol. 36, nr. 3, paginile 907-912, un conjugat de acid hialuronic și un compus de bor este utilizat în tratamentul mezoteliomului.

Până în prezent nu există nicio terapie capabilă să trateze sau să încetinească semnificativ mezoteliomul pleural malign, este posibilă doar reducerea masei tumorale a acestuia și, în consecință, prelungirea supraviețuirii pacientului cu câteva luni. Cele mai de succes proceduri implică stadiile incipiente ale bolii și combină chimioterapia preoperatorie cu procedura chirurgicală și radioterapia ulterioară postoperatorie. Cu toate acestea, o astfel de abordare poate fi propusă numai pacienților foarte tineri fără boli concomitente. În orice caz, studiile adecvate care să demonstreze un beneficiu eficient în ceea ce privește prelungirea vieții nu sunt încă disponibile. Din păcate, timpul mediu de supraviețuire după diagnostic încă este de 6-9 luni fără chimioterapie, 12 luni cu o astfel de terapie.

Având în vedere motivele de mai sus, sunt testate noi abordări farmaceutice, cum ar fi, de exemplu, imunoterapia sau tratamente care vizează direct tratamentul neoplasmului prin utilizarea sistemelor de *livrare a medicamentelor*. Într-adevăr, astfel de sisteme pot transporta medicamentele direct la locul tumorii permițând tratamentul neoplasmului la doze mai mici de agent chimioterapeutic decât un tratament sistemic, prin urmare cu o toxicitate mai mică și rezultând o calitate a vieții mai bună pentru pacient, dar, mai ales, astfel de sisteme, atunci când sunt cu adevărat eficiente, sunt capabile să mărească semnificativ speranța de viață a unui pacient cu cancer.

Acidul hialuronic este unul dintre polimerii (și polizaharidele) folosiți în formarea acestor sisteme de *livrare a medicamentelor* atât ca polimer asociat, cât și ca polimer legat chimic la numeroase categorii de medicamente antineoplazice (Liao YH. și colab., Drug Deliv., 2005, 12(6):327-42). HA este o heteropolizaharidă compusă din resturi alternante de acid D-glucuronic și N-acetil-D-glucosamină, este un polimer cu lanț liniar cu o greutate moleculară cuprinsă între 50.000 și 13×10^6 Da, în funcție de sursa din care se obține și de metodele de preparare folosite. Este prezent în mod natural în gelurile pericelulare, în substanța esențială a țesutului conjunctiv al organismelor vertebrate, în lichidul sinovial articular, în umoarea vitrească și în cordonul ombilical. HA joacă un rol important în organismul biologic, de exemplu ca suport mecanic al celulelor multor țesuturi precum pielea, tendoanele, mușchii și cartilajele, fiind componenta principală a matricei extracelulare, dar acționând și funcții ulterioare precum hidratarea țesuturilor, lubrifierea celulelor, migrarea și diferențierea (Weigel P. și colab., J Theoretical Biol, 1986:219-234). Printre sistemele de *livrare a medicamentelor* care utilizează HA, conjugatul de paclitaxel cu acid hialuronic (HA) derivat cu molecule de hidrazidă legate de gruparea carboxil a HA prin legătură amidă (Luo Y. și colab., Biomacromolecules, 2000, 1(2):208-218) este cunoscut: cu toate acestea, până în prezent nu există studii preclinice sau clinice care să fi demonstrat eficacitatea unui astfel de derivat.

Sistemul constituit din HA conjugat cu paclitaxel printr-un distanțier (EP2045270) este de asemenea cunoscut: un astfel de conjugat a fost testat atât în studii *in vitro* (și în special în cancerul vezicii urinare, cancerul de sân și celulele cancerului ovarian) care dovedesc că ar fi cel puțin la fel de activ ca medicamentul de referință și în protocoale clinice *in vivo* (în desfășurare în prezent) privind tratamentul cancerului neinvaziv al vezicii urinare (IT 102018000009731).

Conjugarea cu HA face paclitaxelul solubil și, prin urmare, administrarea de paclitaxel se poate întâmpla fără multiplele fenomene de hipersensibilitate care apar în mod normal în timpul utilizării medicamentului datorită prezenței Cremophor EL, solventul de solubilizare utilizat în prezent în protocoalele clinice standard, a cărui prezență este necesară tocmai pentru că ingredientul activ este liposolubil (Taxol®). Paclitaxelul este un agent anti-cancer (Huizing MT și colab., Cancer Inv., 1995, 13: 381-404) exercitându-și acțiunea antiproliferativă acționând asupra organizării microtubulilor sistemului citoscheletic celular împiedicându-l să se reorganizeze normal în timpul diviziunii mitotice (Manfredi JJ și colab., J Cell Biol, 1982, 94:688-696); principalele sale indicații terapeutice fiind tratamentul cancerului de sân, cancerului pulmonar, cancerului ovarian, cancerului de vezică urinară, cancerului de prostată și endometrial și necuprinzând tratamentul mezoteliomului.

În conjugatul HA-paclitaxel, legătura dintre paclitaxel și HA permite medicamentului să ajungă direct la suprafața membranei celulei tumorale caracterizată printr-o supraexprimare a receptorului HA, CD44 (Isacke CM. și colab., Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34:718-21). În consecință, paclitaxelul conjugat cu HA este capabil să se lege în mod specific la CD44 al celulei tumorale fiind astfel capabil să intre în citoplasma celulară în care, prin hidroliza medicamentului de legătură/HA, acesta este activat. Acest mecanism de transport selectiv al medicamentului este definit de „*direcționarea*” la celula țintă.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Obiectul prezentei invenții este conjugatul HA-paclitaxel pentru utilizare în tratamentul loco-regional al mezoteliomului, prin urmare mezoteliom pleural malign, mezoteliom pericardic și mezoteliom peritoneal, în special pentru utilizare în tratamentul MPM, în care un astfel de conjugat HA-paclitaxel are o legătură ester între carboxilul acidului hialuronic (HA) și un distanțier, legat la rândul său printr-o legătură ester prin carboxilul său la gruparea hidroxil la carbonul C2' al paclitaxelului, în care distanțierul introdus este acidul 4-bromobutiric și în care gradul de derivatizare al paclitaxelului în conjugatul HA-paclitaxel este în intervalul care variază de la 15% până la 21% în greutate (g/g), și preferabil de la 16% până la 20% (g/g).

În continuare, în prezenta descriere, gradul de derivatizare (sau esterificare) al conjugatului menționat mai sus înseamnă procentul în greutate de paclitaxel în raport cu greutatea conjugatului HA-paclitaxel.

Prin urmare, 100 mg de conjugat cu grad de derivatizare cuprins între 15% și 21% g/g, va conține 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg sau 20 mg sau 21 mg de paclitaxel chimioterapeutic, în funcție de gradul de derivatizare indicat (pentru a exemplifica aceasta în continuare, gradul de derivatizare la 20% g/g conține 20 mg de paclitaxel la 100 mg de conjugat); este totuși evident pentru persoana de specialitate că, la sfârșitul unor astfel de procese de sinteză industrială, poate apărea o mică variație a raporturilor de greutate între molecule, de aceea, în continuare, solicitantul, descriind și revendicând domeniul de derivatizare a conjugatului menționat mai sus, cuprins între 15% și 21% g/g, intenționează să revendice toate valorile procentuale raportate cuprinzând $\pm 1\%$: cu titlu de exemplu, gradul de 20% g/g se intenționează, în consecință, să fie considerat ca $20\% \pm 1\%$.

Conjugatul HA-paclitaxel pentru utilizarea revendicată mai sus a fost preparat conform unui procedeu de sinteză cunoscut în stadiul tehnicii așa cum este descris în EP2045270 și, pentru gradul de derivatizare de 20%, îmbunătățit în IT 102018000009731.

În termeni largi, într-un astfel de proces de sinteză a conjugatului menționat mai sus, distanțierul/linkerul acid 4-bromobutiric este introdus între acidul hialuronic și paclitaxel prin formarea legăturii esterice între carboxilul acidului hialuronic și distanțier, respectivul distanțier fiind legat la rândul său (întotdeauna prin legătură esterică) prin carboxilul său de gruparea hidroxil la carbonul C2' al paclitaxelului, mai precis gruparea carboxil a acidului 4-bromobutiric, prin activare cu un agent de activare și în prezența unui catalizator, formează o legătură ester cu funcția hidroxil la carbonul C2' al paclitaxelului; ulterior intermediarul astfel obținut reacționează cu o sare de HA, în condiții adecvate, dând naștere la substituția nucleofilă a COO- a HA la carbonul legat de bromul linkerului distanțier. În acest fel, legătura esterică este formată între HA și elementul de legătură distanțier legat anterior la paclitaxel.

HA utilizat pentru sinteza unui astfel de conjugat HA-paclitaxel poate proveni din orice sursă, de exemplu prin extracție din faguri de cocoș (EP0138572, WO2018020458), pe cale fermentativă (EP0716688), sau pe cale biotehnologică (EP2614088, EP2614087) și având o greutate moleculară medie în greutate (MW) cuprinsă între 400 și 3×10^6 Da, în special de la 400 la 1×10^6 Da, chiar mai ales de la 140.000 la 250.000 Da (greutatea moleculară medie înseamnă cea calculată cu metoda „*vâscozității intrinsece*” (Terbojevich și colab., Carbohydr Res, 1986, 363-377).

De preferință, HA utilizat pentru sinteza conjugatului HA-paclitaxel pentru utilizare conform prezentei invenții este un HA fermentativ cu o greutate medie MW cuprinsă între 140.000 și 250.000 Da.

De preferință, conjugatul HA-paclitaxel pentru utilizare conform prezentei invenții are un grad mediu de derivatizare de 20% g/g.

Un alt obiect al prezentei invenții este, de asemenea, o compoziție farmaceutică constând în esență din conjugatul HA-paclitaxel descris mai sus, asociat cu diluanți/excipienti acceptabili farmacologic, de preferință o compoziție farmaceutică formulată în apă izotonă sterilă, care conține 5% g/v glucoză pentru utilizare în tratamentul loco-regional al mezoteliomului, deci al mezoteliomului pleural malign, mezoteliomului pericardic și mezoteliomului peritoneal, de preferință pentru utilizare în tratamentul mezoteliomului pleural malign.

O astfel de compoziție farmaceutică este astfel formulată ca soluție apoasă sterilă și izotonă, constând în esență din conjugatul însuși.

Solicitantul descrie și revendică conjugatul pentru utilizarea de mai sus în tratamentul loco-regional al tuturor formelor de mezoteliom cunoscute și mai sus citate și, de preferință, utilizarea în

tratamentul loco-regional al MPM, deoarece efectul sinergic al HA și al paclitaxelului legate chimic în conjugatul obiect al invenției, atât în testele efectuate *in vitro* cât și *in vivo* vs paclitaxel neconjugat, este demonstrat mai jos.

Rezultatele obținute, atât în ceea ce privește IC₅₀ pentru studiile *in vitro* cât și exprimate ca valori de bioluminescență ca indice al mărimii masei tumorale la animalele tratate, demonstrează în mod surprinzător potența farmacologică a conjugatului HA-paclitaxel și efectul sinergic al conjugatului acid hialuronic cu agent chimioterapeutic față de paclitaxel neconjugat în tratamentul mezoteliomului, în special a mezoteliomului pleural.

Un astfel de rezultat este cu atât mai important având în vedere tratamentul loco-regional destinat a fi revendicat pentru un astfel de conjugat: această cale de administrare, adică intrapleurală, sau intraperitoneală și intrapericardică, permite de fapt administrarea conjugatului direct la masa tumorală în doze la nivel inferior/analog sau chiar mai mari decât agentul chimioterapeutic de referință, pentru a obține o eficacitate terapeutică mai mare decât *medicamentul de referință* cu menținerea unui profil ridicat de siguranță.

Conjugatul HA-paclitaxel rămâne într-adevăr ca *depozit* în cavitatea de administrare direct în contact cu masa tumorală timp prelungit, permițând astfel concentrarea acestuia în principal la locul de acțiune (și nu la nivel sistemic), maximizând astfel interacțiunea cu tumora fără a deteriora țesutul înconjurător, reducând efectele colaterale. Se folosește și mecanismul de transport selectiv al medicamentului către celula tumorală pentru exprimarea ridicată a CD44 pe suprafața unor astfel de celule, prin acțiunea de „șintire” a acidului hialuronic.

Testele pe animale descrise mai jos demonstrează în special eficacitatea *in vivo* a unui astfel de conjugat HA-paclitaxel, în care o astfel de eficacitate va duce la oameni nu numai la creșterea supraviețuirii persoanelor bolnave, ci și la o mai bună calitate a vieții pentru o categorie de pacienți care, după cum s-a raportat anterior, au o speranță de viață extrem de limitată chiar și după tratamentul cu chimioterapie.

Exemplul 1

Citotoxicitatea conjugatului HA-paclitaxel în celulele de mezoteliom vs paclitaxel

Procedura experimentală: a fost evaluată activitatea citotoxică a conjugatului HA-paclitaxel obiect al invenției *in vitro* prin efectuarea testului MTT pe linii celulare de mezoteliom uman H2052, H28 și H2452 disponibile comercial, în care toate aceste linii celulare exprimă receptorul CD44 pentru acid hialuronic. Conjugatul folosit pentru un astfel de proces a fost preparat conform IT 102018000009731, deci cu un grad mediu de derivatizare de 20% g/g pornind de la un HA fermentativ cu o greutate medie MW cuprinsă între 140.000 și 250.000 Da.

Celulele au fost placcate (Ziua 0) în *placă cu mai multe godeuri* cu 96 de godeuri cu fund plat (3000 de celule per godeu) în mediu de cultură EMEM (SIGMA, Saint Louis, Missouri, SUA) și ulterior au fost incubate timp de 24 de ore la 37°C în prezența a 5% CO₂. A doua zi (Ziua 1) mediul a fost schimbat furnizând celulelor mediu EMEM proaspăt conținând alternativ paclitaxel, ca martor, sau conjugatul HA-paclitaxel în diluții adecvate. După două zile de incubare (Ziua 3), fiecare godeu care conține celulele a fost tratat cu 100 μl de reactiv bromură de 3-2,5-difeniltetrazoliu (5 mg/ml în DMEM) timp de 90 de minute. Ulterior, la îndepărtarea reactivului din fiecare godeu și adăugarea corespunzătoare a 100 μl de DMSO, s-a măsurat absorbanta sării de formazan (albastru, produsă prin reacția de rupere a inelului de tetrazoliu MTT, realizată de enzima mitocondrială „succinat dehidrogenază” prezentă numai în celulele viabile) la lungimea de undă de 570 nm de către un cititor cu mai multe plăci. O astfel de analiză MTT, larg cunoscută persoanei de specialitate, permite evaluarea viabilității celulelor tratate cu conjugat față de cele tratate doar cu paclitaxel și, prin urmare, determinarea susceptibilității *celulelor* menționate mai sus la probele testate. Datele au fost apoi normalizate la control și valoarea IC₅₀ a fost calculată în μg/ml de conjugat (exprimată în termeni de echivalenți de paclitaxel) comparativ cu paclitaxel neconjugat.

Rezultatele sunt rezumate în tabelul de mai jos unde este clar evident că conjugatul HA-paclitaxel prezintă o activitate (deci o eficacitate antitumorală) de până la 65-70 de ori mai mare decât cea a paclitaxelului neconjugat.

IC₅₀ Normalizat, μg/ml

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

Exemplul 2

Studiu in vivo pe soareci NSG imunodeficienti

Liniile celulare ale mezoteliomului uman H2052 au fost transduse cu un vector lentiviral (metodă prin care genele pot fi inserate în celule folosind lentivirusul) care conține un promotor bidirecțional care permite exprimarea ridicată și coordonată a două gene reporter pentru sinteza luciferazei și eGFP (*proteina verde fluorescentă îmbunătățită*), așa cum este descris în Amendola și colab., Nat Biotechnol 2005, 23:108-16: luciferaza este o enzimă care catalizează oxidarea luciferinei care oxidând emite energie (electroni) sub formă de radiație luminoasă și o astfel de reacție are o sensibilitate ultra-înaltă; eGFP derivă din meduza *Aequorea victoria*, și este capabil să emită lumină verde strălucitoare atunci când este expus la anumite lungimi de undă; ambele astfel de proteine sunt folosite mai jos ca „sistem marker” pentru celulele mezoteliom umane H2052 transduse ca mai sus, pentru a identifica masa tumorală care se formează la animalele cărora li s-au injectat astfel de celule și pentru a determina dimensiunile acestora și creșterea în timp printr-un senzor de bioluminescență adecvat.

Celulele au fost incubate timp de 6 ore într-un amestec de mediu complet (RPMI + 10% FBS, 1% HEPES, L-glutamină și penicilină/streptomicina) care conține vectorul menționat mai sus și sulfat de protamină. La sfârșitul a 6 ore de incubare, supernatanții au fost reintegrați cu mediu complet. După 5 zile, efectul transducției a fost evaluat prin citometrie în flux.

Celulele au fost apoi extinse și subdivizate pentru a izola populația cu o expresie mai mare a genelor reporter. Astfel de celule transduse și selectate au fost apoi injectate în peritoneul șoarecilor NSG, (adică, imunodeficienți care, prin urmare, permit grefarea unei game largi de celule canceroase umane), 10 șoareci/probă, care au fost apoi supuse următorului tratament:

1° probă tratată cu HA-paclitaxel 40mg/Kg, administrare loco-regională pe cale intraperitoneală (**ip**);

2° probă tratată cu paclitaxel 10mg/Kg, prin administrare intravenoasă (**iv**) pentru 3 tratamente, trecând apoi la administrare **ip** din cauza tolerabilitatii foarte slabe a tratamentului **iv** cu paclitaxel al șoarecilor NSG;

3° probă tratată cu paclitaxel 10mg/Kg, administrare loco-regională pe cale intraperitoneală (**ip**);

4° probă netratată;

prin administrare săptămânală timp de 10 săptămâni.

Toate animalele tratate au fost monitorizate prin detectarea bioluminescenței emise de zona lor tumorală tratată cu conjugat HA-paclitaxel, pentru a evalua în timp dimensiunea (și deci creșterea) tumorii cu referire la animalele netratate cu niciun agent chimioterapeutic și la cele tratate cu paclitaxel neconjugat.

Rezultatele au fost reprezentate grafic în Figura 1, unde este clar evident că luminiscenta (exprimată în fotoni/sec, Ph/sec) animalelor netratate atinge valori medii de ordinul mărimii 1×10^{12} în ziua 100 de supraviețuire, indicând deci dimensiunea/creșterea atinsă de tumora netratată; probele 2 și 3, ambele tratate cu paclitaxel neconjugat cu moduri diferite de administrare, sunt comparate cu o astfel de probă controlată: această comparație indică un rezultat important pentru ambele, deoarece valorile medii de luminescență atinse se dovedesc a fi de ordinul mărimii de 1×10^{11} , deci mai mici decât netratat, indicând o masă tumorală redusă comparativ cu controlul.

Cu toate acestea, rezultatul conjugatului HA-paclitaxel este cu totul surprinzător, deoarece din ziua 14 până la ziua 125 de supraviețuire, luminescența scade dramatic și rămâne neglijabilă în timp. Aceste date complet neașteptate arată reducerea semnificativă a tumorii atât față de controlul netratat, cât și față de animalele tratate cu agent chimioterapeutic neconjugat administrat iv și ip, demonstrând eficacitatea totală a conjugatului în sine. În figura 1, data de luminescență legată de conjugatul HA-paclitaxel este reprezentată în a treia din cele patru coloane corespunzătoare zilelor de supraviețuire raportate în abscisă.

În Figura 2 sunt raportate în schimb datele obținute după 139 de zile de observație, unde este clar evident că detectarea bioluminescenței în Ph/sec emisă de zona lor tumorală tratată și, prin urmare, reprezentativă pentru masa tumorală, rămâne în jur de $1-2 \times 10^{11}$ la șoarecii tratați cu paclitaxel neconjugat, în timp ce la șoarecii tratați cu conjugat această valoare este extrem de mică și apropiată de 0, indicând prin urmare o reducere aproape completă a masei tumorale.

Prin rezultatele discutate mai sus, solicitantul a demonstrat potența farmacologică și, prin urmare, eficacitatea conjugatului HA-paclitaxel în tratamentul loco-regional al mezoteliomului, în special al MPM, mezoteliomului peritoneal și pericardic, deoarece este capabil să determine reducerea semnificativă a masei tumorale, crescând în consecință supraviețuirea pacientului și calitatea vieții acestuia.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2020/084525
- LUO YI ET AL: "A Hyaluronic Acid-Taxol Antitumor Bioconjugate Targeted to Cancer Cells", BIOMACROMOLECULES, vol. 1, no. 2, 13 June 2000 (2000-06-13), pages 208-218, XP002601147, ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/BM000283N [retrieved on 2000-03-25] cited in the application
- EDMOND AUZENNE ET AL: "Hyaluronic acid-paclitaxel : antitumor efficacy against CD44(+) human ovarian carcinoma xenografts", NEOPLASIA, vol. 9, no. 6, 2007, pages 479-486, XP008139171, ISSN: 1522-8002, DOI: 10.1593/NEO.07229
- WO-A2-2004/035629
- MIRANDA P. WEEN ET AL: "Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, vol. 12, no. 2, 31 January 2011 (2011-01-31), pages 1009-1029, XP055042928, DOI: 10.3390/ijms12021009
- US-A1- 2010 173 865
- S. J. LEE ET AL: "Metronomic Activity of CD44-Targeted Hyaluronic Acid-Paclitaxel in Ovarian Carcinoma", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 18, no. 15, August 2012 (2012-08), pages 4114-4121, XP055750858, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3250
- RAJENDAR K. MITTAPALLI ET AL: "Paclitaxel-Hyaluronic NanoConjugates Prolong Overall Survival in a Preclinical Brain Metastases of Breast Cancer Model", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 12, no. 11, 6 November 2013 (2013-11-06), pages 2389-2399, XP055750970, ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0132
- CHAD E GALER ET AL: "Hyaluronic acidpaclitaxel conjugate inhibits growth of human squamous cell carcinomas of the head and neck via a hyaluronic acid-mediated mechanism", ORAL ONCOLOGY, vol. 47, no. 11, 28 July 2011 (2011-07-28) , pages 1039-1047, XP028320587, ISSN: 1368-8375, DOI: 10.1016/J.ORALONCOLOGY.2011.07.029 [retrieved on 2011-08-04]
- ASPLUND T ET AL: "HYALURONAN RECEPTORS ARE EXPRESSED ON HUMAN MALIGNANT MESOTHELIOMA CELLS BUT NOT ON NORMAL MESOTHELIAL CELLS", CANCER RESEARCH, vol. 54, no. 16, August 1994 (1994-08), pages 4516-4523, XP000872939, ISSN: 0008-5472
- LOURDES CORTES-DERICKS ET AL: "CD44 and its ligand hyaluronan as potential biomarkers in malignant pleural mesothelioma: evidence and perspectives", RESPIRATORY RESEARCH, vol. 18, no. 1, ART. 58, 12 April 2017 (2017-04-12), pages 1-12, XP055750863, ISSN: 1465-993X, DOI: 10.1186/s12931-017-0546-5
- SASAI MASAO ET AL: "Novel Hyaluronan Formulation Enhances the Efficacy of Boron Neutron Capture Therapy for Murine Mesothelioma", ANTICANCER RESEARCH, vol. 36, no. 3, 14 March 2016 (2016-03-14) , pages 907-912, XP055809687, Retrieved from the Internet: URL:https://ar.iijournals.org/content/an_ticanres/36/3/907.full.pdf>

(57) Revendicări:

1. Un conjugat HA-paclitaxel pentru utilizare în tratamentul loco-regional al mezoteliomului, în care respectivul conjugat acid hialuronic-paclitaxel are o legătură ester între carboxilul acidului hialuronic (HA) și un distanțier, legat la rândul său printr-o legătură ester prin carboxilul său la gruparea hidroxil la carbonul C2' al paclitaxelului, în care distanțierul introdus este acid 4-bromobutiric, în care gradul de derivatizare a paclitaxelului în conjugatul HA-paclitaxel este în intervalul care variază de la 15% la 21% în greutate/greutate (g/g) și

în care HA utilizat pentru sinteza conjugatului HA-paclitaxel este un HA fermentativ cu o greutate medie MW variind de la 140.000 la 250.000 Da.

2. Conjugatul HA-paclitaxel pentru utilizare conform revendicării 1, în care mezoteliomul este mezoteliom pleural malign, mezoteliom pericardic și mezoteliom peritoneal,

3. Conjugatul HA-paclitaxel pentru utilizare conform revendicării 1, în care mezoteliomul este mezoteliom pleural malign.

4. Conjugatul HA-paclitaxel pentru utilizare conform uneia sau mai multor revendicări anterioare, în care calea de administrare este intrapleurală sau intraperitoneală și intrapericardică.

5. Conjugatul HA-paclitaxel pentru utilizare conform uneia sau mai multor revendicări anterioare, în care gradul de derivatizare a paclitaxelului în conjugatul HA-paclitaxel variază de la 16% la 20% g/g.

6. Conjugatul HA-paclitaxel pentru utilizare conform uneia sau mai multor revendicări anterioare, în care gradul de derivatizare a paclitaxelului în conjugatul HA-paclitaxel este egal cu 20% g/g.

7. Compoziție farmaceutică, constând în esență dintr-un conjugat HA-paclitaxel pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 6, asociat cu diluanți/excipienți acceptabili farmacologic.

8. Compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 7, în care respectiva compoziție farmaceutică este formulată în apă izotonă sterilă, conținând 5% g/v glucoză.

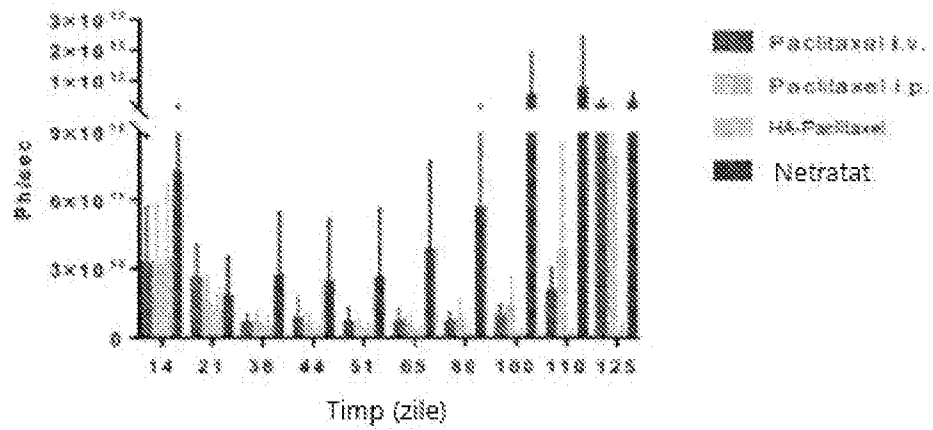


Figura 1

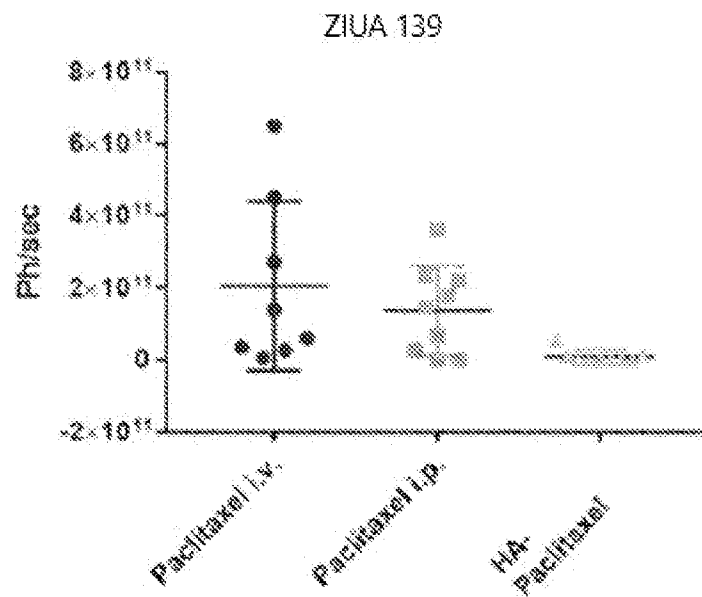


Figura 2