



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 334 497**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03700315 .9**

(96) Fecha de presentación : **07.01.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1463541**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2004**

(54) Título: **Biomateriales basados en éster bencílico de ácido hialurónico para terapia anti-angiogénica en el tratamiento de tumores.**

(30) Prioridad: **11.01.2002 IT PD02A0003**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.03.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.03.2010

(73) Titular/es: **FIDIA FARMACEUTICI S.p.A.**
Via Ponte della Fabbrica 3-A
35031 Abano Terme, Padova, IT
Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

(72) Inventor/es: **Fusenig, Norbert, E.;**
Stark, Hans-Jurgen;
Willhauck, Michael y
Pavesio, Alessandra

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Biomateriales basados en éster bencílico de ácido hialurónico para terapia anti-angiogénica en el tratamiento de tumores.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere al uso en el campo médico-quirúrgico de biomateriales basados en éster bencílico de ácido hialurónico, opcionalmente en asociación con biopolímeros naturales, sintéticos o semisintéticos, para suprimir el proceso angiogénico asociado con la proliferación tumoral (en tumores primarios y secundarios).

Antecedentes de la invención

La inducción y desarrollo de angiogénesis es un requisito previo para el desarrollo de un tumor primario, y para cualquier metástasis subsiguiente.

Angiogénesis es un proceso dinámico estrechamente unido a la proliferación de células cancerosas, porque estas últimas son principalmente responsables de la producción y liberación de factores angiogénicos, tales como citoquinas y otros factores tróficos. Un aumento en la vascularización de un tumor primario puede provocar un aumento en el número de células cancerosas que entran en la circulación y dan lugar a nuevas metástasis.

Recientes estudios han demostrado que un aumento en la densidad de microvasos en un área afectada por neoplasia indica crecimiento de tumor nuevo.

Por lo tanto, es clínicamente importante suprimir angiogénesis para inhibir su desarrollo, si es posible. Efectivamente, asociando terapia anti-angiogénica con terapia anticáncer “clásica” con medicamentos y/o radiación, con o sin extirpación quirúrgica del tumor, es posible detener la proliferación de células cancerosas, previniendo así la invasión de tejidos adicionales por dichas células, y el consiguiente desarrollo de nuevas metástasis (Skobe H. y col., *Nature Medicine*, 1222-1227 (1997)).

En la evaluación histológica de la aparición del proceso angiogénico asociado con un crecimiento canceroso, es importante buscar marcadores del sistema vascular del tumor, por ejemplo, con anticuerpos que diferencien las células endoteliales de las cancerosas. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD3 es específico para marcar las células endoteliales y por lo tanto facilita su identificación en el proceso angiogénico asociado con el desarrollo de nuevas metástasis. Su uso ha resultado esencial en la evaluación del nivel de desarrollo de microvasos asociado con neoplasia. Efectivamente, gracias al marcado de anticuerpo, es posible visualizar y contar el número de interconexiones de los vasos con el tejido canceroso para entender y cuantificar el proceso de angiogénesis, relacionándolo con nuevos desarrollos en la neoplasia (decidiendo de este modo si se asocia y cuánto y cómo una terapia que modula o inhibe angiogénesis con una terapia anticáncer establecida/clásica).

Una terapia de este tipo consiste en administrar medicamentos que actúan bloqueando los receptores de los factores tróficos (PGDF, bFGF, VEGF) que también son factores angiogénicos.

Resultados preclínicos “*en vivo*” han mostrado que dichos medicamentos resultan importantes en la inhibición de crecimiento tumoral pero no determinan la regresión del propio tumor: sobre la base de estos datos experimentales principales, se han introducido medicamentos en numerosas pruebas clínicas.

Sin embargo, una terapia clínica anti-angiogénica que proporciona una administración farmacológica generalmente oral en forma crónica puede tener muchos efectos laterales tóxicos, puesto que la angiogénesis está asociada no solamente con trastornos patológicos sino también con procesos fisiológicos tales como reproducción y reparación tisular (“*Cáncer: Principie Practice of Oncology*” V. de Vita, S. Hellmann and S. Rosenberg, 6th Edition).

Por lo tanto es de importancia estratégica asociar la terapia anticáncer clásica con una terapia anti-angiogénica “*in situ*”, y éste es el objeto de la presente invención.

El ácido hialurónico es uno de los componentes principales de la matriz extracelular del tejido conjuntivo, y hay numerosa publicaciones científicas concernientes a esta función en diversos procesos, tanto fisiológicos como patológicos, tales como la formación de tejido de granulación, quimiotaxis en el proceso inflamatorio, diferenciación celular para diversos tipos de células. Otros estudios conciernen a su función dentro de la familia de “moléculas de adhesión de sustrato”.

Se ha usado ácido hialurónico para las indicaciones siguientes:

- como agente diferenciador en terapia para leucemia aguda mieloide (Charrad R. S. y col., *Nature Medicine* 5, 669-676 (1999));
- como vehículo para medicamentos tales como esteroides o NSAID, agentes antibióticos y anti-neoplásticos, debido a la expresión abundante de su receptor (CD44) en células cancerosas; Freemantle, C. y col., *Int. J. Tiss. React.* XVIII (4) 157-166 (1995); Coradini, D. y col., *Int. J. Cancer* 5, 411-416 (1999));

- en estudios preclínicos sobre la inhibición de metástasis pulmonar, debido a su capacidad para inhibir la adhesión de células cancerosas al endotelio vascular (Karasaza K. y col., Clinical & Experimental Metastasis 15, 83-93 (1997));
- como medio para controlar adhesión al sustrato con subsiguiente proliferación de células (posiblemente también células cancerosas) permanentemente “*in situ*” después de extirpación quirúrgica de tejidos (incluso tumores) (U.S. 5.627.162).

Sin embargo, observaciones experimentales “*en vivo*” han revelado que el ácido hialurónico puede tener actividad quimiotáctica sobre células cancerosas dentro del tejido de granulación que se forma después de la extirpación de metástasis cutánea de melanoma (Salmon-Ehr, V. y col., Ann. Dermatol. Venereol, 123, 194-195 (1996)). Aun más, numerosos estudios preclínicos han demostrado que el ácido hialurónico potencia la migración de células cancerosas, favoreciendo de este modo la metástasis, puesto que se sabe que los productos de degradación de ácido hialurónico, esto es, oligosacáridos constituidos por 10 y 20 oligómeros, son inductores fuertes del proceso angiogénico (Hayen y col., J. Cell. Sci. 112, 2241-2251 (1999); Slevin, M. y col., Lab. Invest. 78(8), 987-1003 (1998)).

El documento WO 00/54762 describe preparaciones farmacéuticas para uso tópico formadas a partir de la reacción de ácido hialurónico o carboximetilcelulosa y una carbodiimida o divinilsulfona. Estas composiciones están en forma de película o geles para ser aplicadas directamente en el sitio del tumor.

Aun más, biomateriales basados en ácido hialurónico y/o derivados del mismo nunca se han usado como terapia anti-angiogénica, ni se ha usado nunca ningún otro biopolímero biodegradable y/o no biodegradable en terapias anticáncer.

Por lo tanto, es absolutamente innovador el uso de biomateriales basados en derivados de ácido hialurónico tales como Hyaff® (EP 0 216 453 B1) o ACP (EP 0 341 745 B1) en la forma de fieltros no tejidos por ejemplo (EP 0 618 817 B1) o como estructuras tridimensionales (WO 99/61080), posiblemente en asociación con diversos biomateriales (por ejemplo los naturales tales como colágeno, celulosa, polisacáridos, quitina, quitosano, pectina, agar, gelano y ácido algínico, los sintéticos tales como ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poliuretanos y resinas polisulfónicas, o los semisintéticos tales como colágeno reticulado con aldehído, diamina y gelano) como terapia para suprimir y/o inhibir el proceso angiogénico que potencia y determina la metástasis tumoral.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a biomateriales basados en éster bencílico de ácido hialurónico hechos en fieltros no tejidos (como forma preferida de biomaterial), opcionalmente en asociación con biopolímeros naturales, sintéticos o semisintéticos, para uso en el campo médico-quirúrgico como una nueva terapia anti-angiogénica (“*in situ*”), opcionalmente asociada con terapias anticáncer farmacológicas clásicas y/o radioterapia, para modular indirectamente la proliferación de tumores, bloqueando así la formación de recaídas locales y, por lo tanto, cualquier nueva metástasis.

A fin de estudiar, caracterizar y luego evaluar “*en vivo*” el efecto del biomaterial de la presente invención en el proceso angiogénico que apoya el desarrollo de carcinomas de piel (que se considera que son un ejemplo clarificador), el solicitante ha desarrollado un nuevo modelo de interacción de tumor/soporte de célula estromal que se describe como sigue:

- 1) dos líneas celulares de queratinocitos humanos se transfectan con el ras-oncogén: HACaT II-4, variante maligna y A5, variante benigna;
- 2) dichas células se transfieren a un gel de colágeno montado sobre anillos de teflón cubiertos por una cámara de silicona, conocida como la cámara de silicona Fusenig (FSC);
- 3) dicha FSC se coloca a continuación sobre la fascia muscular de los dorsos de ratones rasurados, en presencia o ausencia de una capa inmediatamente subyacente de biomaterial basado en Hyaff® 11 (éster bencílico total de ácido hialurónico) hecho en forma de un fieltro no tejido;
- 4) cuatro a seis semanas más tarde, se habrán formado dos tipos de diferentes de tejido de granulación por debajo del epitelio canceroso;
- 5) se evalúa el desarrollo del tumor epitelial y del tejido de granulación subyacente, a lo largo del tiempo, tanto por análisis histológico clásico (hematoxilina/eosina) como por técnicas inmunohistoquímicas usando el anticuerpo anti-CD31, para visualizar la presencia de epitelio vascular y por lo tanto determinar el desarrollo del proceso angiogénico;
- 6) se examinan los niveles de proliferación celular usando técnicas inmunohistoquímicas asociadas con la introducción de BrdU en el ADN de células proliferantes, tanto dentro del tejido de granulación por debajo del epitelio como en el propio epitelio canceroso. También se evaluó marcando con el anticuerpo anti-integrina $\alpha 6$ para estudiar el nivel de proliferación celular dentro del epitelio canceroso.

Los resultados del experimento fueron como sigue:

Línea HACaT A5

Después de 4-6 semanas, el epitelio canceroso en la FSC de control (es decir, sin biomaterial colocado bajo el epitelio), estaba bien desarrollado y con capas múltiples, mientras que la capa de tejido de granulación por debajo había sustituido completamente a la capa de colágeno que separaba el epitelio del tejido subyacente (Fig. 1).

Por el contrario, cuatro semanas más tarde, el epitelio canceroso en la FSC colocada sobre el biomaterial basado en Hyaff® en la forma de un fieltro no tejido está menos desarrollado que el control correspondiente y la capa de colágeno que lo separa del tejido de granulación naciente por debajo todavía es grueso y no está infiltrado por células y/o vasos (Fig. 1).

Después de seis semanas la cantidad de colágeno todavía es abundante, justo con una capa inicial de tejido de granulación que comienza a formarse sobre el biomaterial (Fig. 1).

Línea HACaT II 4

Después de cuatro a seis semanas, en la FSC de control, las células cancerosas han constituido un epitelio grueso que penetra en el espesor del nuevo tejido de granulación por debajo, que ya ha sustituido completamente a la capa de colágeno que la separaba el epitelio (Fig. 2).

Cuatro semanas más tarde, en la FSC colocada sobre el biomaterial basado en Hyaff®, el epitelio canceroso es delgado pero fácilmente distinguible del tejido de granulación que se forma sobre el biomaterial, separado de este tejido por el gel de colágeno que todavía está presente y aun no absorbido (Fig. 2).

Seis semanas más tarde, la masa tumoral y el tejido de granulación han establecido un contacto estrecho, pero no hay infiltración real de células tumorales en el tejido de granulación, a diferencia del control, en el que las células tumorales han invadido completamente al tejido de granulación nuevo, por debajo (Fig. 2).

Usando técnicas inmunohistoquímicas unidas al marcado específico de nucleótidos particulares tales como BrdU, en la 1ª y la 2ª semana, es evidente una buena proliferación celular dentro del tejido de granulación naciente en el control y en el biomaterial basado en Hyaff®, mientras que a las 4, y especialmente a las 6, semanas después del trasplante, la velocidad de crecimiento celular cae drásticamente en el tejido de granulación por debajo del epitelio canceroso, que por el contrario mantiene en ambas muestras un buen nivel de proliferación celular (Fig. 3).

El crecimiento del epitelio canceroso también puede ser visualizado con un anticuerpo específico contra la proteína integrina $\alpha 6$. Dicha molécula es, efectivamente, un componente de los hemidesmosomas y su expresión normalmente está asociada solamente con el área proliferativa de las capas epiteliales.

La Fig. 3a muestra que el anticuerpo que marca la proteína de integrina $\alpha 6$ está notablemente presente por todo el epitelio canceroso tanto en la FSC de control como en la FSC con el biomaterial basado en Hyaff®, aun cuando la expresión de la proteína de prueba aparece menos extendida por todo el espesor del epitelio canceroso en esta última muestra.

Marcado específico de epitelio vascular con anticuerpo anti-CD31 revela, adicionalmente, que en los controles, después de cuatro semanas, el proceso angiogénico está bien establecido puesto que los vasos en el tejido de granulación subyacente ya alcanzan el epitelio canceroso y después de seis semanas lo invade, favoreciendo así la metástasis (Fig. 4).

En el caso de la FSC con el biomaterial basado en Hyaff®, después de cuatro semanas, todavía no hay contacto estrecho entre tejido de granulación y epitelio canceroso. Esto solamente ocurrirá después de seis semanas, aun cuando no hay invasión del epitelio por los microvasos subyacentes, que permanecen relegados al tejido de granulación (Fig. 4).

El proceso angiogénico parece que está paralizado, que ya no potencia el desarrollo tumoral. La vascularización se limita al área cubierta por el biomaterial basado en Hyaff®, de modo que las células tumorales no invaden el tejido de granulación que se ha formado dentro del biomaterial.

En conclusión, el biomaterial basado en Hyaff®, demostró que era capaz de modular/inhibir el proceso angiogénico relacionado con la vascularización del epitelio canceroso. Por tanto, se demuestra que es particularmente ventajoso usar biomateriales basados en éster benéfico de ácido hialurónico en el campo oncológico, cuando es importante modular el proceso angiogénico y por tanto, indirectamente, la proliferación de células cancerosas en tumores primarios y secundarios.

Según la invención, los biomateriales que pueden ser útiles en el campo oncológico como nueva terapia anti-angiogénica “*in situ*” pueden estar, por ejemplo, en la forma de fieltros no tejidos, esponjas, películas, membranas, microesferas o en otras formas tridimensionales en los casos en que es necesario llenar las cavidades que son susceptibles de formarse después de extirpación quirúrgica de un tumor.

ES 2 334 497 T3

Aun más, la acción anti-angiogénica del biomaterial puede ser apoyada suplementando el biomaterial con NSAID, esteroides, hormonas, antibióticos y especialmente medicamentos anticáncer tales como fluorouracilo, metotrexato, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, etopóxido, ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de biomateriales basados en éster bencílico de ácido hialurónico, para la preparación de agentes anti-angiogénicos para el tratamiento de tumores primarios y secundarios.

2. El uso según la reivindicación 1 en el que éster bencílico de ácido hialurónico está en asociación con otros biopolímeros naturales, sintéticos y/o semisintéticos.

3. El uso según la reivindicación 2, en el que el biopolímero natural se selecciona entre el grupo constituido por colágeno, celulosa, polisacáridos, quitina, quitosano, pectinas, agar, gelano y ácido algínico.

4. El uso según la reivindicación 2, en el que el biopolímero sintético se selecciona entre el grupo constituido por ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poliuretanos y resinas polisulfónicas.

5. El uso según la reivindicación 2, en el que el biopolímero semisintético se selecciona entre el grupo constituido por colágeno reticulado con aldehídos, diamina y gelano.

6. El uso según la reivindicación 1 en el que el biomaterial está en asociación con sustancias farmacológicamente activas.

7. El uso según la reivindicación 6, en el que la sustancia farmacológicamente activa se selecciona entre el grupo constituido por fluorouracilo, metotrexato, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, etopóxido, ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina.

8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que el biomaterial está en forma de un fieltro no tejido, esponja, microesfera, película o membrana u otras estructuras tridimensionales.

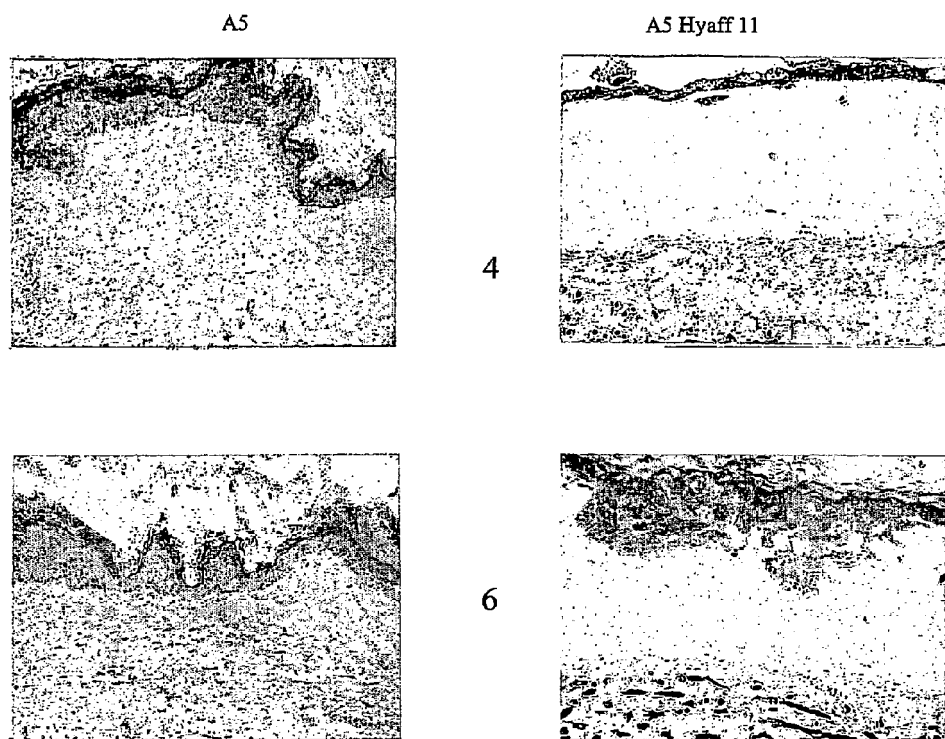


Fig. 1

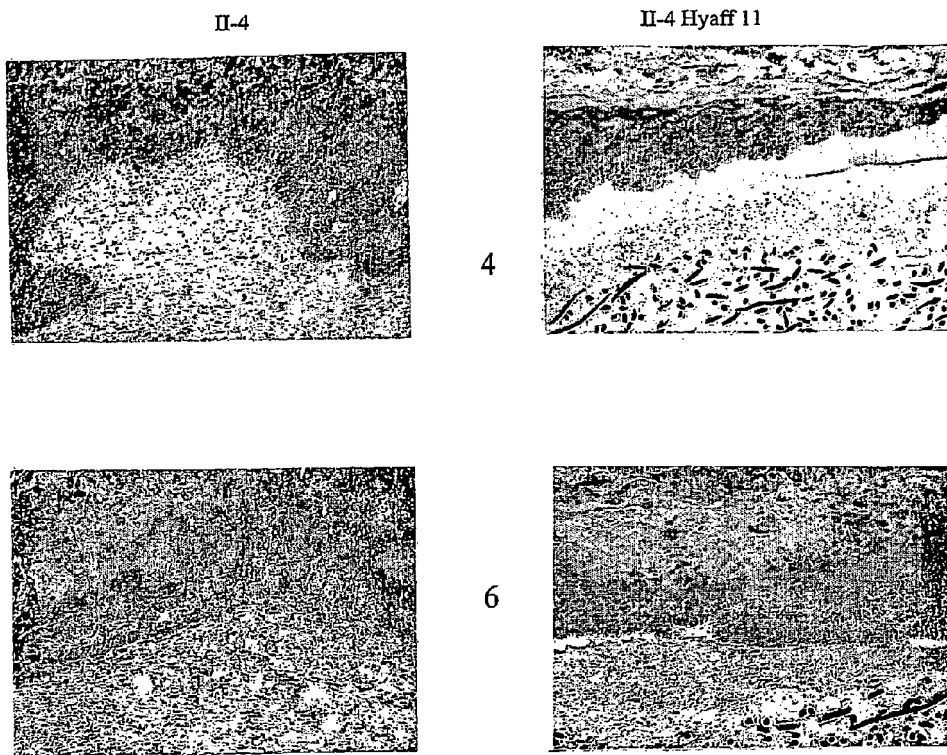


Fig. 2

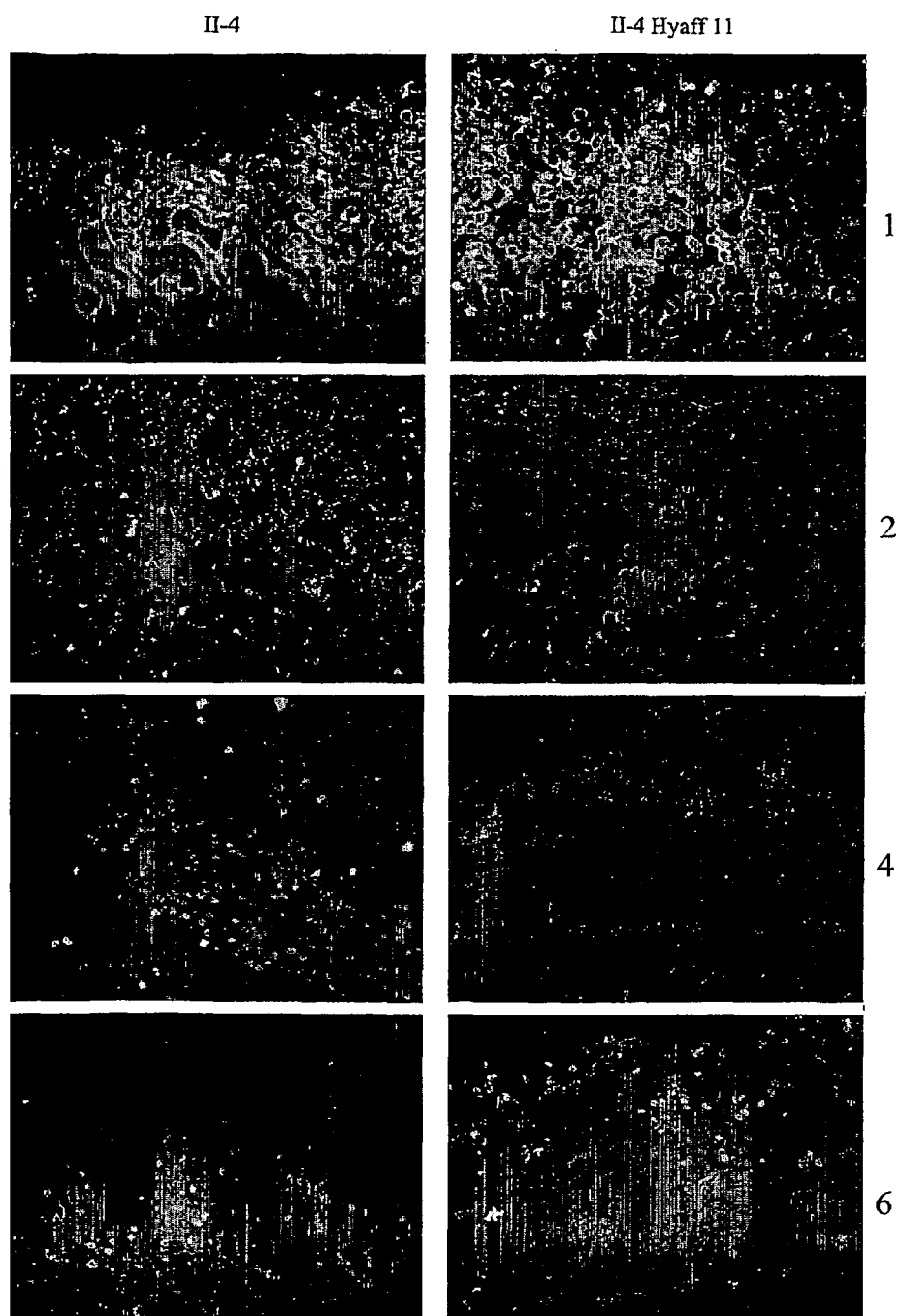
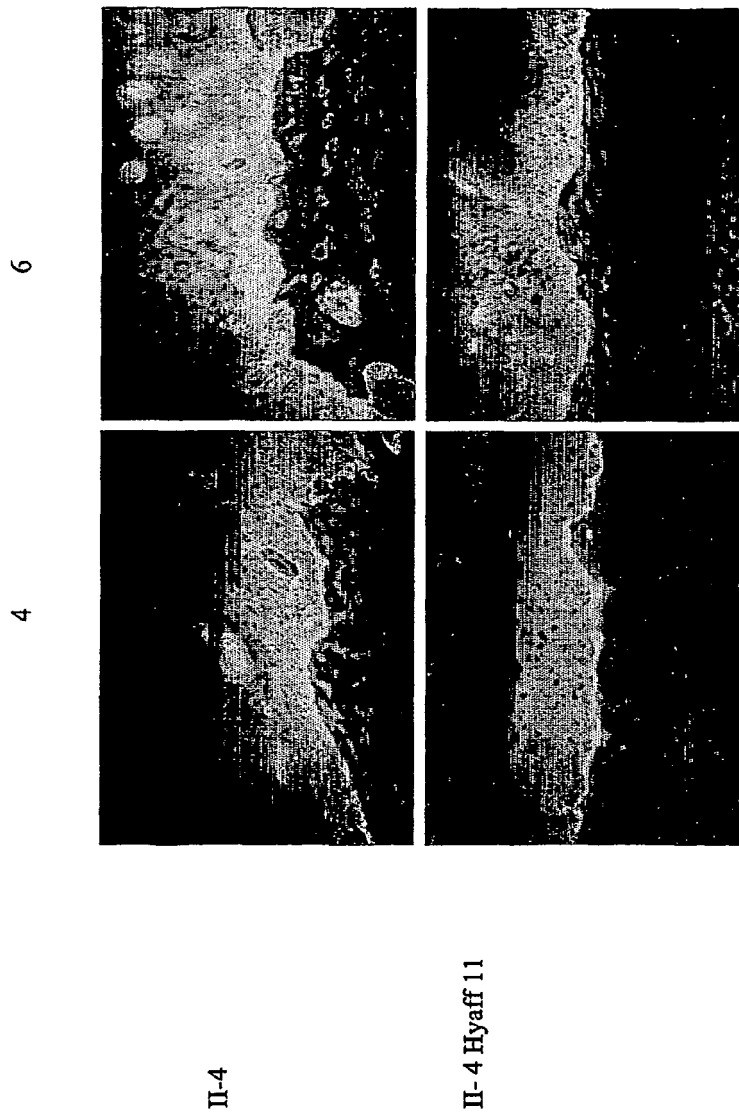
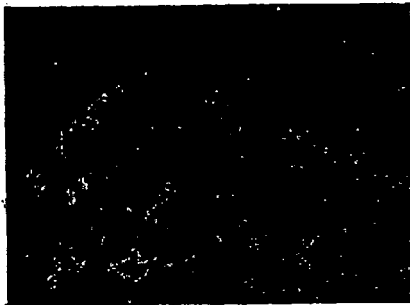


Fig. 3



П-4



П-4 Hyaff 11



4



6



Fig. 4