



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 486**

51 Int. Cl.:
A61K 31/711 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07117228 .2**
96 Fecha de presentación : **27.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1867335**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **Oligodesoxirribonucleótidos combinados con rapamicina para el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **03.03.2005 IT MI05A0336**
28.10.2005 US 731404 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2011

73 Titular/es: **GENTIUM S.p.A.**
Piazza XX Settembre 2
22079 Villa Guardia, Como, IT

72 Inventor/es: **Iacobelli, Massimo;**
Eissner, Gunter y
Ferro, Laura Iris

74 Agente: **Morales Durán, Carmen**

ES 2 366 486 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

Oligodesoxirribonucleótidos combinados con rapamicina para el tratamiento del cáncer

5 Formulaciones con acción tumoral dependiente de angiogénesis

10 El objeto de la presente invención es un método para el tratamiento de un mamífero que padece tumor en el que a dicho mamífero se le administra una cantidad eficaz de defibrotida en combinación con rapamicina; en particular se refiere al uso de defibrotida en combinación con rapamicina para el tratamiento de tumores dependientes de angiogénesis.

Antecedentes de la invención

15 La angiogénesis es un proceso multietapa que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura preexistente y es necesaria para el crecimiento tumoral primario, invasividad y desarrollo de metástasis (20). Normalmente está suprimida en el adulto, en el que la angiogénesis se produce transitoriamente solamente durante la reproducción desarrollo y cicatrización de heridas. Adicionalmente, por encima de un volumen crítico, un tumor no puede extenderse en ausencia de neovascularización (12). Para promover esto, un tumor debe adquirir el fenotipo angiogénico que es el resultado del equilibrio neto entre reguladores positivos (pro-angiogénicos) y negativos (anti-angiogénicos) (16). Sin embargo, los tumores son altamente heterogéneos en la arquitectura vascular, diferenciación e irrigación sanguínea funcional (24). Estas diferencias en cuanto al tamaño de tumores pre-angiogénicos avasculares pueden deberse en parte a la capacidad de las células tumorales para sobrevivir en diferentes grados de hipoxia (18).

25 La demostración de la dependencia de angiogénesis de determinados tumores, tales como mieloma múltiple, incluso leucemias y linfomas no sólidos (8) y (21), así como cáncer de mama (25), colorrectal (7), gástrico (26), de próstata (9), de cuello uterino (19), hepatocelular (23) y no microcítico pulmonar (13) procede de la observación de que la medición del grado de angiogénesis, la densidad de los microvasos, es un factor de pronóstico independiente para la supervivencia en las entidades clínicas mencionadas (17). En un estudio clínico reciente, de nuevo en carcinoma de mama, resulta evidente que los genes relacionados con la angiogénesis son importantes para resultados clínicos, por ejemplo, el factor de crecimiento celular endotelial vascular VEGF, el receptor FLT1 de VEGF y la metaloproteínasa MMP9 (6).

35 Definiciones

El término defibrotida identifica un polidesoxirribonucleótido que se obtiene por extracción de tejidos animales y/o vegetales pero que también puede producirse sintéticamente; el polidesoxirribonucleótido se usa normalmente en forma de una sal alcalino metálica, generalmente una sal de sodio, y generalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 45-50 kDa (Número de Registro CAS: 83712-60-1). Preferentemente, la defibrotida presenta las características físicas/químicas descritas en (4) y (5), que se incorporan en este documento por referencia.

40 Descripción de la invención

45 Los autores de la invención han desarrollado recientemente un modelo para una ruta alternativa de angiogénesis tumoral. Además del crecimiento de células endoteliales a partir de vasos preexistentes, los autores de la invención sugieren que las células endoteliales en sangre también podrían dar lugar a vasculatura tumoral. Estas células de tipo endotelial (ELC) pueden transdiferenciarse a partir de células dendríticas asociadas a tumores en condiciones de cultivo específicas (11). En resumen, monocitos procedentes de productos de leucoféresis de donantes de sangre humana sanos se filtran por lavado y se cultivan en presencia de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4) para estimular la diferenciación de células dendríticas (DC). Además, las células se tratan con un cóctel específicamente liberado por células tumorales (M-CSF, IL.6 y lactato, Gottfried et al., manuscrito presentado) para promover el resultado de células dendríticas asociadas a tumores (TuDC).

55 Estas TuDC-ELC adquieren el fenotipo de células endoteliales (FactorVIII relacionado con Ag, vWF) aunque pierden marcadores monocíticos (CD14) y de células dendríticas (CD1a). Cabe destacar, que no expresan CD34, ni CD133 o CD146 lo que promueve que sean auténticos productos de transdiferenciación y no contaminantes de progenitores endoteliales circulantes (CD34, CD133) o de células endoteliales circulantes maduras (CD146). Además, pueden formar estructuras tubulares en Matrigel™, en un ensayo de angiogénesis *in vitro*.

60 El ensayo en Matrigel™ es uno de los ensayos más conocidos y ampliamente usados en ensayos de angiogénesis *in vitro* (22).

65 Matrigel™ es una mezcla sintética semisólida de proteínas de la matriz extracelular que simulan la matriz que existe fisiológicamente por debajo de la pared celular endotelial de un vaso sanguíneo. Cuando las células en cuestión se cultivan sobre esta matriz en portaobjetos de cámara microscópica, se activan para formar estructuras

tubulares en 3-7 días, pero solamente en el caso en el que tengan un fenotipo endotelial. Por lo tanto, este ensayo es adecuado para demostrar la posible capacidad de las células para dar lugar a una vasculatura tumoral.

5 Los datos de los autores de la invención demuestran que la defibrotida en concentraciones clínicas y subclínicas puede inhibir la formación de tubos de la transdiferenciación de ELC (TuDC-ELC) en Matrigel™. Se incubaron TuDC-ELC y células endoteliales diferenciadas, maduras [células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) o células endoteliales microvasculares humanas (HMEC) como controles “estables”] en presencia o ausencia de Defibrotida (10 µg/ml cada uno) durante 7 días. Cabe destacar, después de una sola adición de Defibrotida, que HUVEC y HMEC no se vieron afectadas en su posible formación de tubos, lo que sugiere que la Defibrotida
10 solamente conduce la transdiferenciación de células endoteliales (Figura 1 A). Sin embargo, cuando se añadió Defibrotida repetidas veces, también pudo bloquear la angiogénesis de células endoteliales maduras completamente diferenciadas (véase a continuación).

15 Usando un programa informático complementario del NIH (Image J, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), los autores de la invención pudieron cuantificar estos efectos, se calculó la longitud total de los tubos y el área de la fotografía, después la densidad microvascular (MVD) se proporcionó en longitud total/área [pix-1]. La DF regula negativamente de manera significativa ($p=0,02$, TTEST) la MVD de TuDC-ELC (Figura 1 B).

20 Para apoyar estos datos con un ensayo alternativo de angiogénesis el crecimiento de células endoteliales de aorta de rata en Matrigel™ se impidió casi al 100% cuando se aplicó DF diariamente (Figura 2), lo que sugiere que DF no sólo interviene en la transdiferenciación, sino también sobre las células endoteliales maduras completamente diferenciadas.

25 El ensayo de anillo aórtico investiga células endoteliales macrovasculares. Pero a menudo, la vasculatura tumoral comprende células endoteliales microvasculares. Por lo tanto, se realizó un tercer ensayo de angiogénesis *in vitro* basándose en la vascularización de células endoteliales microvasculares a través de una capa de fibroblastos dérmicos después de 9-11 días de cultivo. Posteriormente, estas estructuras de tipo vaso pueden visualizarse mediante tinción para CD31 y vWF.

30 Como se demuestra en la Figura 3 (A y B), la DF también puede bloquear la angiogénesis de células endoteliales microvasculares humanas con una superioridad para la aplicación diaria. Cabe destacar que, las concentraciones de aproximadamente 10 µg/ml parecen ser las más eficaces. Una sola aplicación de DF podría no bloquear significativamente la angiogénesis.

35 Considerados en su conjunto, los datos de los autores de la invención sugieren firmemente que la defibrotida puede bloquear la angiogénesis de células endoteliales de transdiferenciación asociadas a tumores y de aquellas que provienen de células vasculares ya existentes.

40 Es objeto de estudios en curso si la defibrotida también inhibe la angiogénesis *in vivo*. Actualmente los autores de la invención realizan un ensayo de cámara dorsal dérmica (14) que investiga el efecto de la defibrotida en un modelo de ratón con carcinoma gástrico humano altamente vascularizado (sistema de Xenoinjerto). Los primeros datos demuestran claramente que la densidad microvascular (MVD) de tumores tratados con DF es menor que la de los tumores de control. Este conjunto de experimentos se reproducirá más adelante.

45 El mecanismo de acción mediante el cual la DF puede bloquear la angiogénesis todavía no está claro pero pruebas preliminares procedentes de análisis de transferencia de Western sugieren un efecto regulador negativo de DF en p70S6 quinasa (p-p70S6), una proteína quinasa activada por mitógeno.

50 Se obtuvieron pruebas adicionales para determinar el impacto de p70S6 quinasa procedentes de otro ensayo de formación de tubos incubando HMEC en presencia o ausencia del inhibidor DRB de la p70S6 quinasa.

También existen primeros datos clínicos disponibles de pacientes (pts.) que han recibido trasplante alogénico de células madre (SCT): En un grupo de 17 pts tratados con defibrotida se observó un notable descenso en suero de niveles del VEGF lo que también sugiere que la defibrotida podría actuar a través del factor de crecimiento eliminando el crecimiento de células endoteliales tumorales.
55

La defibrotida es un firme candidato para una terapia de tumores dependientes de angiogénesis y se usa en combinación con rapamicina (14).

60 Cabe destacar que, la rapamicina tiene el efecto secundario negativo de actividad pro-trombótica (15) lo que podría atenuarse mediante la aplicación simultánea de la defibrotida con actividad antitrombótica y fibrinolítica.

Bibliografia

1. US5646127
- 5 2. US5646268
3. US6046172
- 10 4. US4985552
5. US5223609
- 15 6. 't Veer, L. J., et al.(2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415, 530-536.
7. Abdalla, S. A., et al.(1999) Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours. *Oncol. Rep.*, 6, 839-842.
- 20 8. Andersen, N. F., et al. (2005) Syndecan-1 and angiogenic cytokines in multiple myeloma: correlation with bone marrow angiogenesis and survival. *Br. J. Haematol.*, 128, 210-217.
9. Bostwick, D. G. & Iczkowski, K.A. (1998) Microvessel density in prostate cancer: prognostic and therapeutic utility. *Semin.Urol.Oncol.*, 16, 118-123.
- 25 10. Eissner, G., et al. (2002) Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. *Blood*, 100, 334-340.
- 30 11. Fernandez, P. B., et al. (2001) Dendritic cells derived from peripheral monocytes express endothelial markers and in the presence of angiogenic growth factors differentiate into endothelial-like cells. *Eur.J.Cell Biol.*, 80, 99-110.
12. Folkman, J., et al. (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp.Med.*, 133, 275-288.
- 35 13. Fontanini, G., et al. (1995) Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J. Pathol.*, 177, 57-63.
14. Guba, M., et al.(2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.*, 8, 128-135.
- 40 15. Guba, M., et al. (2005) Rapamycin induces tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF. *Blood*.
16. Hanahan, D. & Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86, 353-364.
- 45 17. Hasan,J., et al. (2002) Intra-tumoural microves-sel density in human solid tumours. *Br.J.Cancer*, 86, 1566-1577.
18. Helmlinger, G., et al. (1997) Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.*, 3, 177-182.
- 50 19. Kainz, C., et al. (1995) Prognostic value of tumour microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. *Anticancer Res.*, 15, 1549-1551.
- 55 20. Morabito, A., et al. (2004) Antiangiogenic strategies, compounds, and early clinical results in breast cancer. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 49, 91-107.
21. Podar, K. & Anderson, K. C. (2005) The patho-physiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood*, 105, 1383-1395.
- 60 22. Staton, C.A., et al. (2004) Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int. J. Exp.Pathol.*, 85, 233-248.
23. Sun, H. C., et al. (1999) Microvessel density of hepatocellular carcinoma: its relationship with prognosis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125, 419-426.
- 65

24. Verheul, H. M., et al. (2004) Are tumours angio-genesis-dependent? *J.Pathol.*, 202, 5-13.

25. Weidner, N., et al. (1992) Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84, 1875-1887.

5

26. Xiangming, C., et al. (1998) Angiogenesis as an unfavorable factor related to lymph node metastasis in early gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 5, 585-589.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de defibrotida en combinación con rapamicina para la fabricación de una formulación farmacéutica para el tratamiento de tumor dependiente de angiogénesis.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha defibrotida se obtiene por extracción de tejidos animales y/o vegetales, preferentemente de órganos de mamíferos.
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha defibrotida se obtiene de sintéticamente.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho tumor dependiente de angiogénesis es un mieloma múltiple.
- 15 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho tumor dependiente de angiogénesis es un carcinoma mamario.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha formulación se administra a un mamífero.
- 20 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha formulación se administra a un ser humano.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha formulación se administra por vía intravenosa.
- 25 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha formulación es una solución acuosa.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha formulación contiene excipientes y/o adyuvantes habituales.

Los oligonucleótidos y la DF inhiben la formación de tubos de las ELC,
pero no de HMEC ni de HUVEC

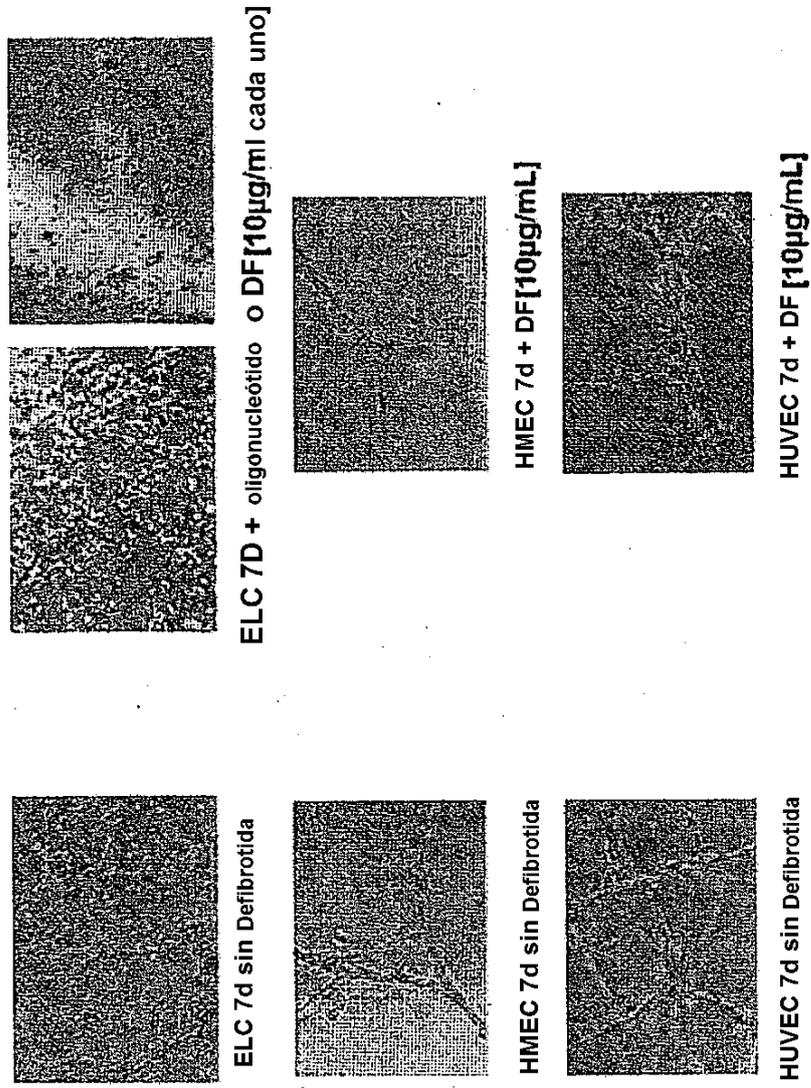
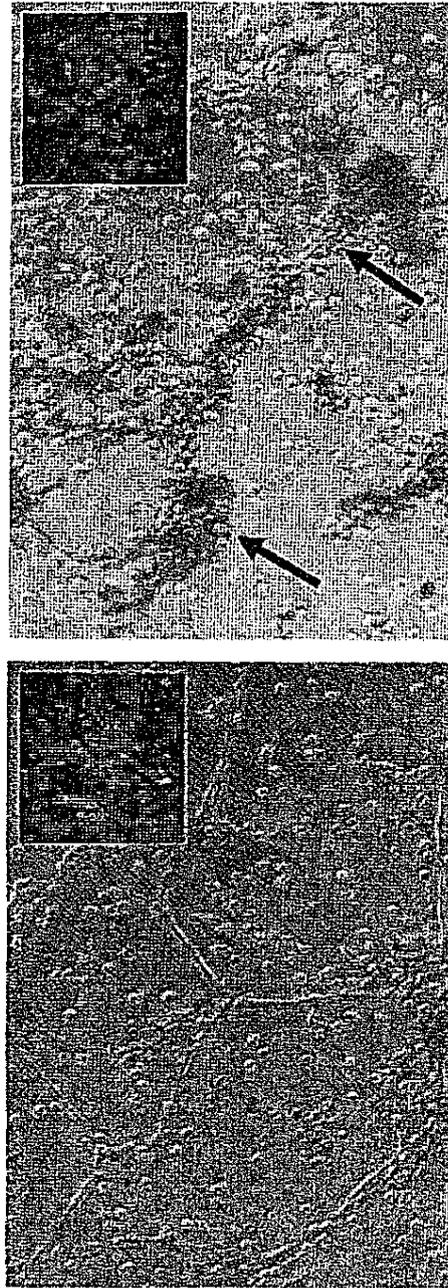


Fig. 1A

La DF inhibe la formación de tubos, no se produce transdiferenciación de TuDC-ELC



TuDC-ELC 7d sin DF

TuDC-ELC 7d + DF [10µg/ml]

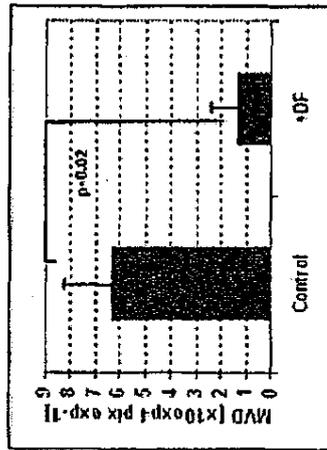


Fig. 1B

La DF impide el crecimiento de EC en el ensayo de anillo aórtico

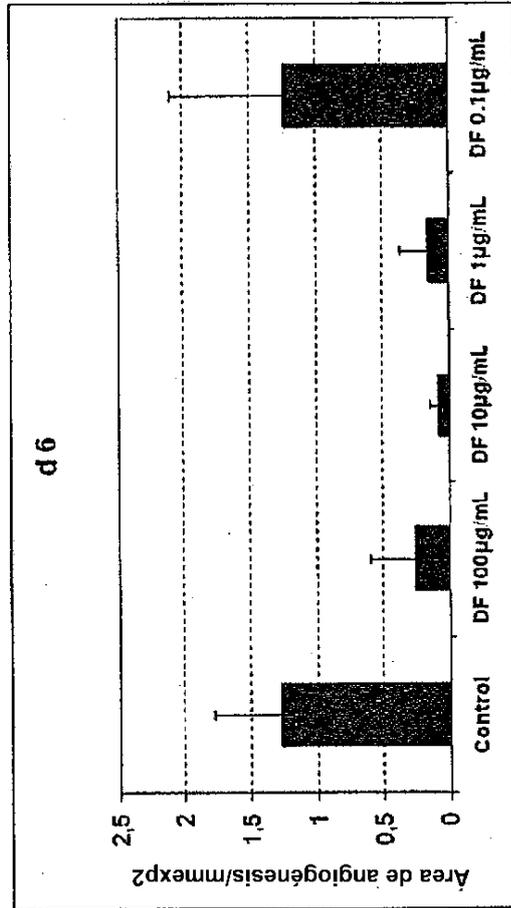
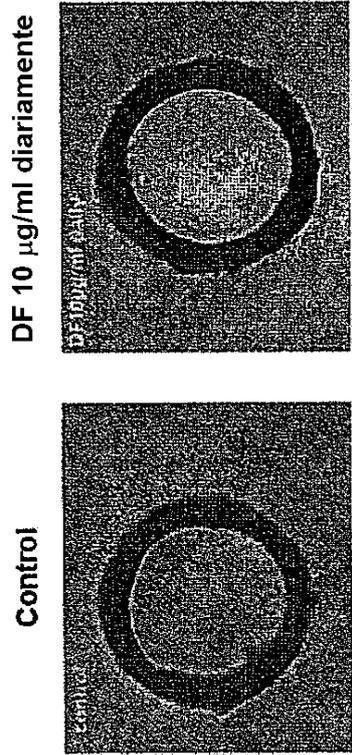


Fig. 2

La DF impide la angiogénesis de células endoteliales microvasculares humanas en el ensayo de Angiokit™

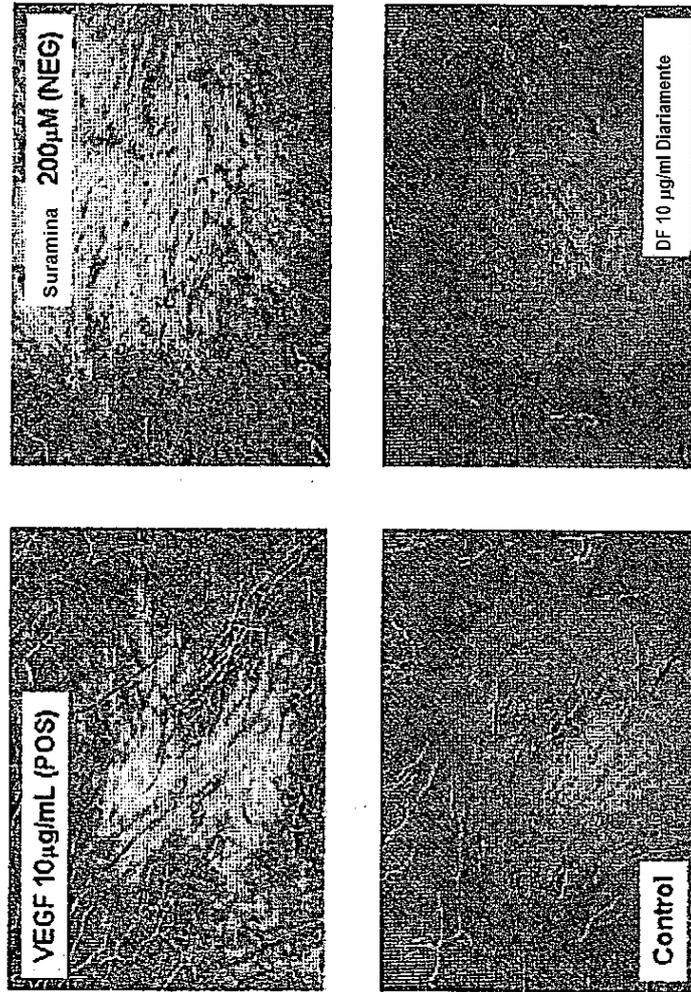


Fig. 3A

Densidad microvascular (MVD) [pix-⁻¹] = Longitud total de los vasos [pixel] / área [pixel²]

La DF impide la angiogénesis de células endoteliales microvasculares humanas en el ensayo AngioKit™

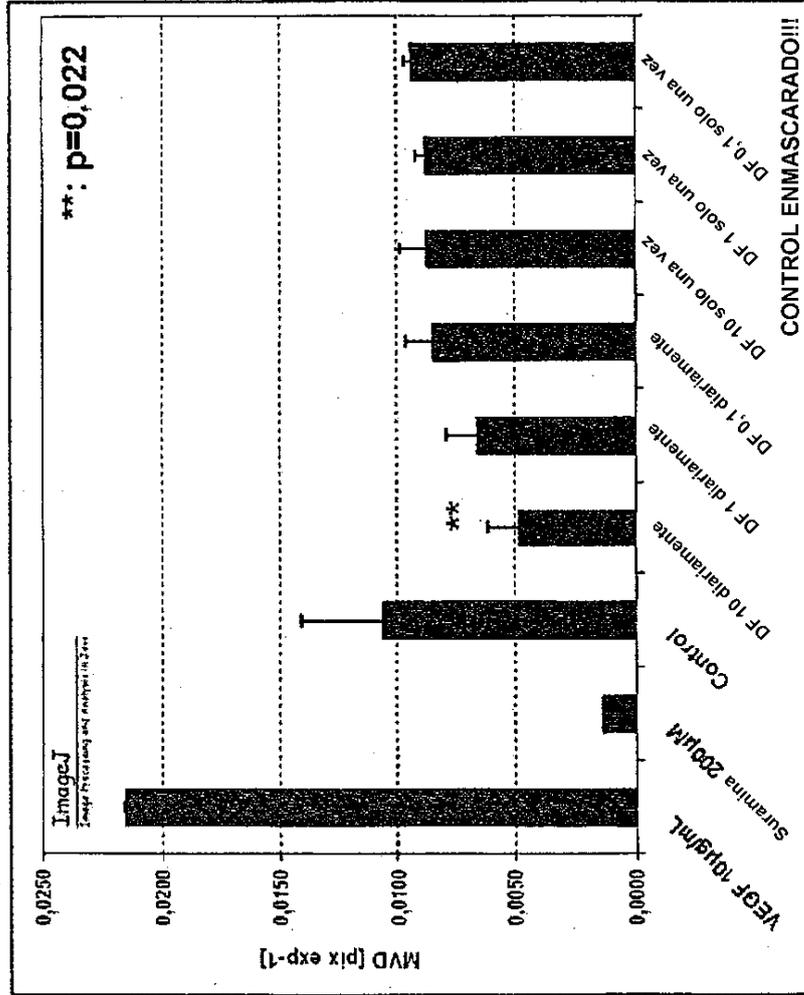


Fig. 3B