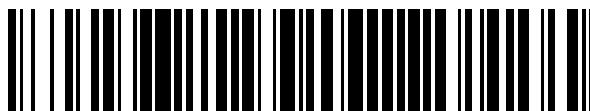


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 127**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2008 E 08776311 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **31.03.2010 EP 2167134**

54 Título: **Uso de conjugados del ácido hialurónico en el tratamiento local de enfermedades hiperproliferativas de la piel**

30 Prioridad:

22.06.2007 IT MI20071267

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

22.01.2013

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
VIA PONTE DELLA FABBRICA 3/A
35031 ABANO TERME (PADOVA), IT**

72 Inventor/es:

**RENIER, DAVIDE y
PANFILO, SUSY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 394 127 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

Uso de conjugados del ácido hialurónico en el tratamiento local de enfermedades hiperproliferativas de la piel

La presente invención se refiere al uso de un conjugado entre el ácido hialurónico o sus derivados y a fármacos antitumorales con respecto a las reivindicaciones, para la preparación y composiciones farmacéuticas destinadas para el tratamiento de queratosis actínica.

Campo de la invención

La queratosis actínica (QA), o queratosis solar, es una enfermedad ocasionada sustancialmente por exposición crónica a radiación solar, particularmente a radiación ultravioleta. Sus síntomas son lesiones en la piel en la mayoría de los casos localizadas en zonas principalmente expuestas al sol; casi todas las lesiones consisten en placas de tamaño razonable, con una superficie seca e irregularmente escamosa. La base puede ser clara u oscura, pardo rojiza, rosa, roja, pero también puede ser del mismo color que la piel; en el último caso, la lesión se identifica palpando ya que la superficie escamosa que se forma es seca y áspera. Las lesiones en la piel son de tipo hiperqueratósico o paraqueratósico con presencia de una densa población de queratinocitos displásicos.

Se considera que la queratosis actínica es la fase prodrómica de una enfermedad más grave e invasiva e incluso metastatizante; de hecho existe una correlación epidemiológica entre la QA y el carcinoma de células escamosas, conocido también como carcinoma espinocelular. Sin embargo, la QA se define como una situación precancerosa, cuya erradicación debe evaluarse cuidadosamente cada vez en relación con el riesgo de degeneraciones malignas.

La estrategia terapéutica contra la QA consiste sustancialmente en la eliminación de las zonas hiperqueratósicas y puede efectuarse quirúrgicamente/ablativamente, (crioterapia, exfoliación química, curetaje, dermoabrasión, láser) o farmacológicamente. En el estado de la técnica las soluciones farmacológicas más utilizadas contemplan el uso de:

- retinoides, tanto tópicos como sistémicos, caracterizados sin embargo, por importantes y graves efectos secundarios y cuya administración debe por lo tanto evaluarse cuidadosamente;
- inmunomoduladores locales, tales como imiquimod (Al-dara[®]), para los cuales existen considerables efectos secundarios locales (picor, enrojecimiento, irritación);
- derivados del ácido metil aminolevulínico, que permiten una terapia fotodinámica. Estos derivados son adecuados para la queratosis con un ligero grosor o no hiperqueratósica, no pigmentada, del rostro o cuero cabelludo y por consiguiente poseen un campo de aplicación relativamente limitado;
- agentes antiinflamatorios basados en diclofenaco (Solaraze[®]), adecuado para situaciones menos graves;
- 5-fluorouracilo tópico (Efudex[®] pomada); como en el caso de retinoides e inmunomoduladores, los efectos secundarios son bastante graves, en cuanto a acción local (enrojecimiento, picor, formación de ampollas, exfoliación, dermatitis por contacto) como sistémica. De hecho, el 5-fluorouracilo se absorbe regularmente y, entre otras cosas, puede producir alteraciones del esperma y leucocitosis. Su uso está, por lo tanto, limitado a situaciones de alto riesgo.

Existe por tanto una gran necesidad de un tratamiento farmacológico tópico que sea activo contra las diversas formas de queratosis actínica, que tenga una toxicidad baja, que sea fácil de administrar y que posea efectos secundarios locales y/o sistémicos limitados.

Un objetivo de la presente invención es por tanto encontrar composiciones farmacéuticas que superen los inconvenientes mencionados anteriormente, que estén presentes en las composiciones farmacéuticas descritas y que se usen en el estado de la técnica para el tratamiento farmacológico tópico de diversas formas de queratosis actínica y, más generalmente, otros tipos de enfermedades hiperproliferativas de la piel.

La presente invención satisface esta necesidad gracias a composiciones farmacéuticas basadas en un conjugado entre el ácido hialurónico (un derivado del mismo) y fármacos antitumorales de acuerdo con las reivindicaciones.

El Solicitante ha descubierto de manera sorprendente que el uso de estas composiciones farmacéuticas se caracteriza por una alta eficacia, seguridad y baja toxicidad en el tratamiento tópico de la patología precancerosa descrita, es decir, en la queratosis actínica y también en el tratamiento de otros tipos de enfermedades hiperproliferativas de la piel, tales como soriasis, o en el tratamiento *in situ* de formas tumorales, tales como carcinoma celular escamoso.

Un objeto de la presente invención se refiere por lo tanto al uso de un conjugado entre el ácido hialurónico o un derivado del mismo y fármacos antitumorales de acuerdo con las reivindicaciones para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento tópico de la queratosis actínica.

La composición farmacéutica se basa en un conjugado entre el ácido hialurónico o un derivado del mismo y un fármaco antitumoral seleccionado entre paclitaxel o 5-fluorouracilo, más preferentemente el fármaco antitumoral es

paclitaxel.

Incluso más preferentemente, el conjugado AH-paclitaxel corresponde al éster conjugado AH-paclitaxel que tiene un grado de sustitución igual al 20% p/p.

5 El conjugado AH-5-fluorouracilo corresponde preferentemente al éster conjugado que tiene un grado de sustitución igual al 15% p/p.

Los conjugados entre el ácido hialurónico o un derivado del mismo y paclitaxel son ya conocidos en el estado de la técnica (solicitud de patente EP 1560854) y han demostrado ser eficaces en el tratamiento sistémico de numerosas formas tumorales.

10 La conjugación AH-5-fluorouracilo se describe en la solicitud de patente WO2007/14784, a la que se hace referencia en el presente documento para cada característica relacionada con la síntesis química del compuesto y sus características. Como se ha especificado anteriormente, el uso del 5-fluorouracilo en la queratosis actínica descrito en el estado de la técnica está muy limitado por efectos secundarios significativos. La unión con el AH hace que el principio activo sea mucho menos tóxico después de la administración tópica, ya que solo permite su permanencia a nivel de la lesión a tratar, impidiendo su acumulación sistémica.

15 Una ventaja fundamental de las composiciones farmacéuticas usadas de acuerdo con la presente invención es que estas permanecen en el lugar de la aplicación y se liberan progresivamente, sin absorción sistémica.

20 Una ventaja adicional de las composiciones farmacéuticas usadas de acuerdo con la presente invención es que los fuertes efectos secundarios de los principios activos adoptados se reducen drásticamente. También permiten minimizar los efectos de irritación y exfoliación que normalmente surgen en el tratamiento de las patologías descritas.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención describe y reivindica el uso de conjugados entre el ácido hialurónico, o un derivado del mismo, y un fármaco antitumoral, activo sobre la proliferación celular, siendo dicho fármaco paclitaxel o 5-fluorouracilo, incluso más preferentemente paclitaxel, en la preparación de composiciones farmacéuticas para la terapia tópica de la queratosis actínica.

Como ya se ha mencionado, los conjugados AH-paclitaxel se conocen en el estado de la técnica; en el documento EP 1560854 se describe su preparación y uso sistémico en diversos tipos de neoplasias.

Los conjugados AH-paclitaxel son molécula obtenidas a partir de la conjugación, es decir, creación de un enlace químico de tipo éster o amida, entre el ácido hialurónico, o un derivado del mismo, y paclitaxel.

30 El enlace puede ser directo, cuando el AH y el fármaco están directamente unidos entre sí, o indirecto, cuando el enlace se produce a través de un "espaciador" que actúa como un puente molecular. Normalmente, como espaciadores, se usan cadenas alifáticas de diversas longitudes, que, entre otras, pueden ser cadenas bromo-butíricas o bromo-propiónicas. La conjugación modifica las propiedades farmacocinéticas del paclitaxel, haciéndole más estable e hidrosoluble; la posibilidad de funcionar con vehículos acuosos hace que el uso, en las diversas formulaciones de solubilizantes oleaginosos, tales como Cremofor, sea ineficaz, y esto reduce drásticamente la formación de efectos no deseados asociados con la toxicidad de estas sustancias.

40 En lo que concierne al conjugado AH-5-fluorouracilo, su preparación y características se describen en el documento WO2007/14784; también en este caso, el principio farmacológico activo y el AH se unen mediante un espaciador que puede ser bromo-butírico o bromo-propiónico, mediante la formulación de enlaces éster o amida. El conjugado AH-5-Fluorouracilo así obtenido es una molécula que tiene mejores características de hidrosolubilidad y resistencia a la degradación con respecto al principio activo tal cual, ya que el ácido hialurónico "protege" al principio activo al cual se une.

45 La posibilidad de obtener composiciones farmacéuticas que tengan propiedades reológicas muy diferentes entre sí es de gran importancia para las aplicaciones descritas en el presente documento: esto depende de las características intrínsecas del AH, cuya molécula, antes de conjugarse con el principio farmacéutico activo, puede modificarse enormemente mediante diversas reacciones químicas. Las modificaciones químicas conocidas en el estado de la técnica son las descritas, entre otras, en el documento EP 1.560.854 y son, más específicamente, la salificación con bases orgánicas y/o inorgánicas (documento EP 0138572 B1), esterificación con alcoholes de la serie alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica (Hyaff[®], documento EP 216453 B1), amidación con aminas de la serie alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica (HYADD[®], documento EP 1095064 B1), O-sulfatación (documento EP 0702699 B1), esterificación interna (ACP[®], documento EP 0341745 B1), desacetilación, percarboxilación (Hyox[®], documento EP 1313772 B1).

Los derivados obtenidos mediante estas reacciones conservan las características biológicas del polisacárido de partida, pero tienen mejores propiedades mecánicas; también pueden formularse fácilmente en forma de hidrogeles,

cremas, pomadas, películas, tiritas, tejidos no tejidos, etc., y por lo tanto permiten producir una amplia diversidad de formas farmacéuticas tópicas, completamente adaptables a cada necesidad terapéutica individual.

En lo que concierne a las características del ácido hialurónico usado para los fines de la presente invención, ha de hacerse referencia a lo descrito en los documentos EP 1560854 y WO2007/14784.

- 5 Resumiendo brevemente, el ácido hialurónico que puede usarse en la presente invención puede derivar de cualquier fuente, por ejemplo por extracción de crestas de gallo (documento EP 0138572) o por fermentación (documento EP 0716688), y tiene un peso molecular que variaría de 400 a 3.000.000 Da, en particular de 50.000 a 1.000.000 Da.

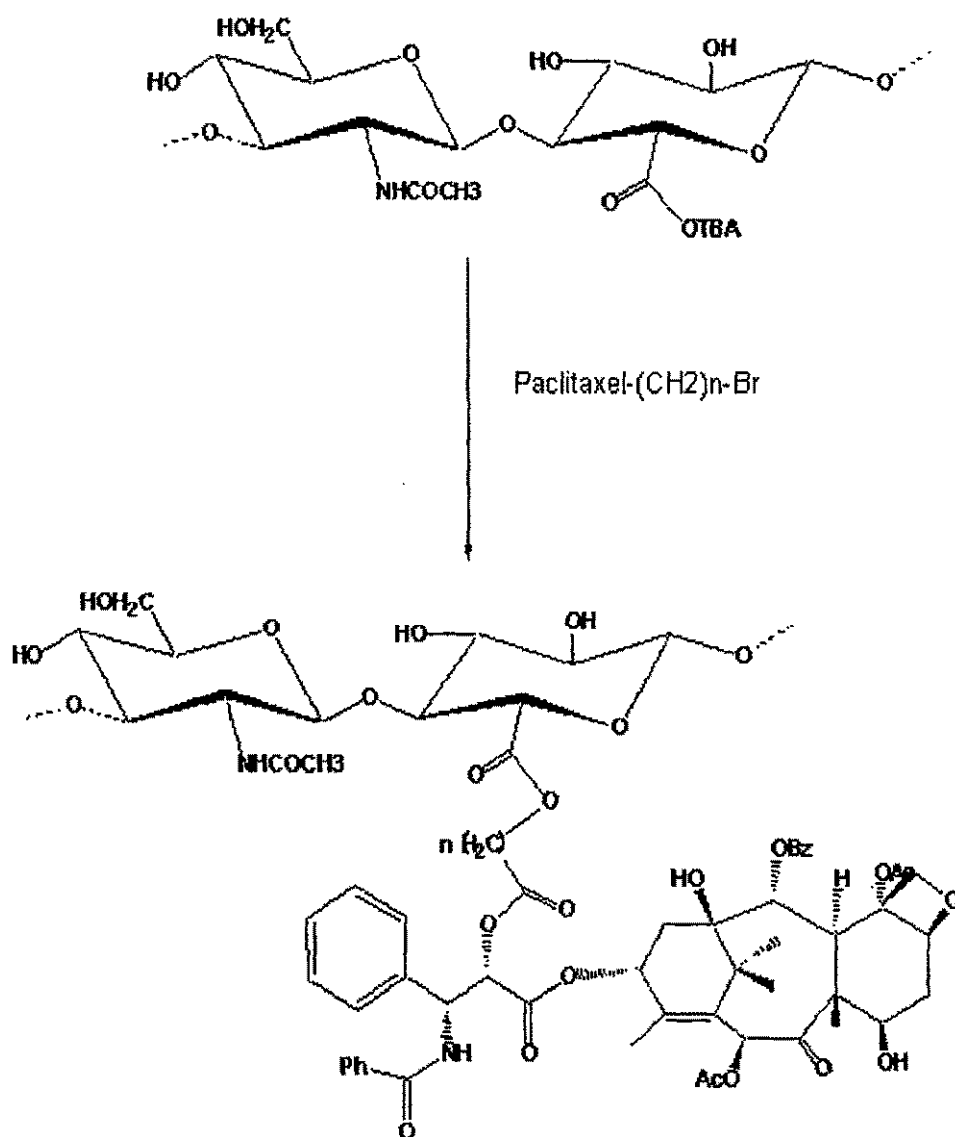
Los derivados del ácido hialurónico que pueden usarse en la preparación de los conjugados objeto de la presente invención son los siguientes:

- 10 1) sales con bases orgánicas y/o inorgánicas también biológicamente activas (documento EP 138572 B1);
 2) HYAFF®: ésteres del ácido hialurónico con alcoholes de la serie alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica con un porcentaje de esterificación que puede variar de acuerdo con el tipo de alcohol y con la longitud del alcohol usado (documento EP 216453 B1);
 15 3) HYADD®: amidas del ácido hialurónico con aminas de la serie alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica (documento EP 1095064 B1);
 4) derivados O-sulfatados (documento EP 0702699 B1) del ácido hialurónico (documento AP 0971961 A1);
 5) ACP®: ésteres internos del ácido hialurónico con un porcentaje de esterificación no mayor del 20% (documento EP 0341745 B1);
 20 6) desacetilados del AH: la fracción N-acetil glucosamina se desacetila con un porcentaje de desacetilación que varía preferentemente del 0,1 al 30% (documento EP 1313772 B1);
 7) percarboxilatos del AH obtenidos por la oxidación del grupo hidroxilo primario de la fracción N-acetil-glucosamina con un grado de percarboxilación que varía del 0,1 al 100% (HYOXX®, documento EP 1339753 A1).

- 25 En particular, el conjugado AH-paclitaxel se obtiene preferentemente mediante un enlace covalente entre el paclitaxel y un éster del Ah, puede obtenerse comenzando a partir de moléculas de AH químicamente no modificadas y efectuando posibles modificaciones del AH únicamente después de la síntesis del conjugado con el principio activo.

- 30 El enlace covalente puede ser directo o mediante un espaciador también en el caso del conjugado AH-paclitaxel. En particular, el procedimiento para preparar el conjugado AH-paclitaxel en el que el principio activo paclitaxel está unido covalentemente al AH, o a un derivado del mismo, puede ser un procedimiento por medio de síntesis indirecta con la introducción de un espaciador entre el paclitaxel y el AH o un derivado del mismo; o puede ser un procedimiento de síntesis directa entre el paclitaxel y el AH o un derivado del mismo. Los posibles esquemas de reacción tanto directos como indirectos para la síntesis del conjugado AH-paclitaxel ya se indican y se describen con detalle en el documento WO2004/035629 y.

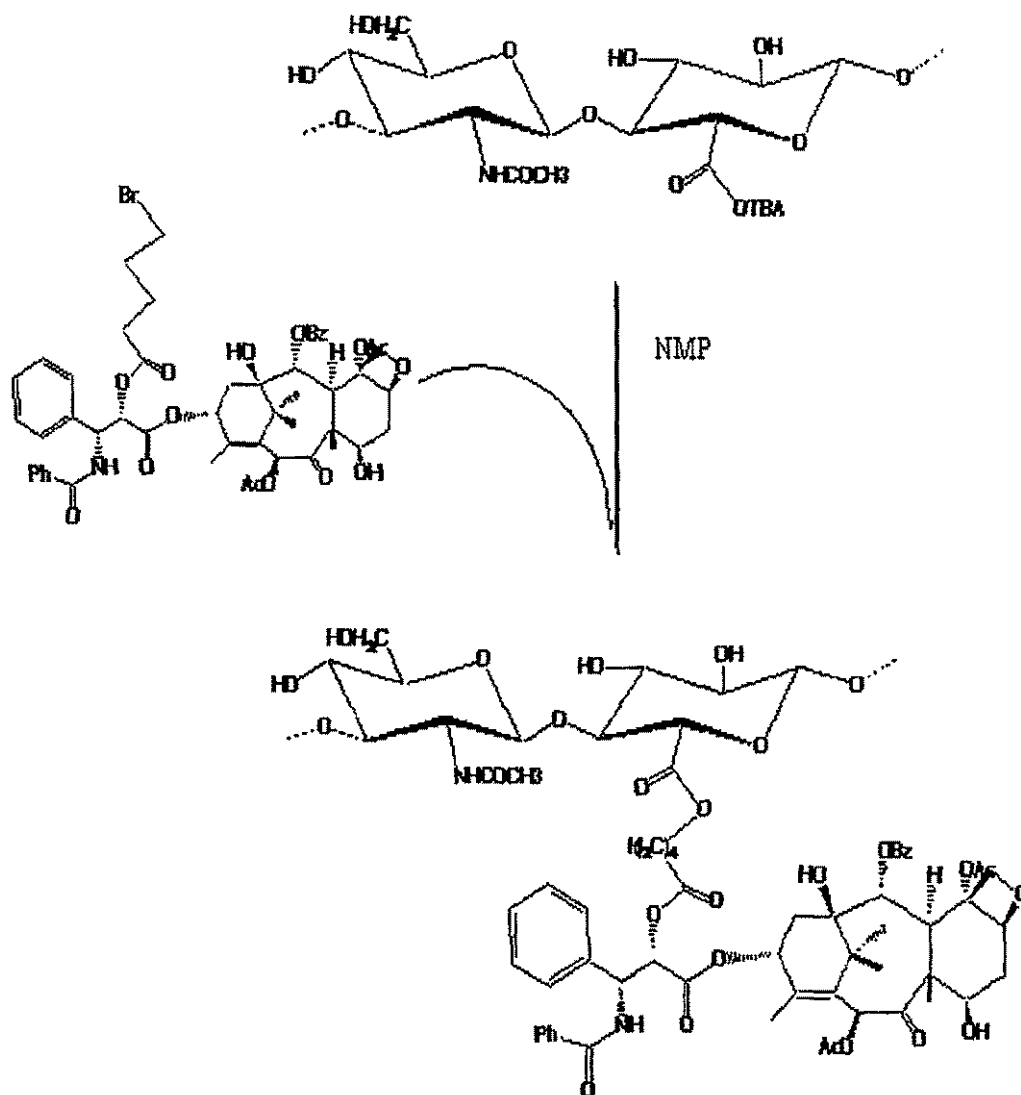
- 35 La síntesis del conjugado AH-paclitaxel se describe, con fines puramente ilustrativos, mediante el procedimiento indicado en el siguiente esquema 1:



Esquema 1

Como se ha indicado anteriormente, se prefiere el uso del conjugado AH-paclitaxel correspondiente al éster del conjugado AH/paclitaxel que tiene un grado de sustitución igual al 20% p/p.

También se proporciona el Esquema 2, a continuación en el presente documento, con respecto a la síntesis del conjugado AH-paclitaxel (éster al 20% de AH con paclitaxel a través del espaciador Bromo-butírico):



Esquema 2

Por otro lado, el conjugado AH-5-fluorouracilo, se obtiene por la formación de un enlace covalente indirecto entre el AH, o un derivado del mismo, y el principio activo mediante un espaciador que forma un enlace éster o amida con el grupo carboxílico del AH o un derivado del mismo. Los espaciadores preferidos son ácido bromo-butírico o ácido bromo-propiónico.

En particular, el conjugado AH-5-fluorouracilo se obtiene por enlace indirecto entre el AH, o un derivado del mismo, y 5-fluorouracilo mediante un espaciador a través de la formación de enlaces éster de acuerdo con el siguiente procedimiento:

un grupo funcional adecuado del espaciador, que también contiene un segundo grupo capaz de reaccionar con la función carboxílica del AH, reacciona con un grupo funcional perteneciente al principio activo. La reacción puede necesitar posiblemente una activación. En una fase posterior, por contacto directo entre una sal de tetraalquilamonio del AH en un medio anhidro, el compuesto que consiste en el principio activo modificado, reacciona dando lugar a una sustitución nucleófila del grupo saliente en el grupo carboxilo del AH, formando un enlace éster entre el AH y el espaciador.

Como alternativa, es posible hacer reaccionar en primer lugar un grupo carboxilo del AH con el espaciador (sustitución nucleófila) y posteriormente unir el espaciador a una función del principio activo antitumoral.

Otros procedimientos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen con detalle en el documento WO2007/014784 para la formación del conjugado a través de la formación de un enlace amida.

5 Como se ha observado anteriormente, los derivados obtenidos a través de estas reacciones conservan las características biológicas del polisacárido de partida, pero tienen mejores propiedades mecánicas; también pueden formularse fácilmente en forma de hidrogeles, cremas, pomadas, películas, tiritas, tejidos no tejidos, etc. y por lo tanto permiten la producción de una amplia diversidad de formas farmacéuticas tópicas, que pueden adaptarse completamente a cada necesidad terapéutica individual.

10 En particular, por lo tanto, la composición farmacéutica tópica usada de acuerdo con la presente invención se formula en forma de cremas, hidrogeles, pomadas o en forma de tiritas o películas medicinales que contienen el conjugado. Estas formulaciones contemplan una cantidad de conjugado entre el AH, o un derivado del mismo, y el fármaco o principio activo antitumoral que varía del 0,05 al 10% en peso, preferentemente del 0,2 al 5% en peso, con respecto al peso total de la composición.

La complementación hasta 100, de la composición de acuerdo con la presente invención, consiste en aditivos, típicos de formulaciones tópicas, farmacológicamente aceptables y agua.

15 Son ejemplos de formulaciones tópicas de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención los indicados en las siguientes tablas (los porcentajes se indican como % en peso).

Tabla 1: Formulación en crema

1.a	
Componente	%
Conjugado AH-paclitaxel	1 %
Cera emulsionante	0,5%
Decil oleato	1,25%
Sorbitol	0,4%
Metil p-hidroxibenzoato	0,05%
Glicerol	0,4%
Monoestearato de PEG 400	2,5%
Deshidroacetato Sódico	0,05%
Propil p-hidroxibenzoato	0,005 %
Aromas	0,01 %
Agua	Complementar hasta 100
1.b	
Componente	%
Conjugado AH-paclitaxel	2,5%
Cera emulsionante	0,5%
Decil oleato	1,25%
Sorbitol	0,4%
Metil p-hidroxibenzoato	0,05%
Glicerol	0,4%
Monoestearato de PEG 400	2,5%
Deshidroacetato sódico	0,05%
Propil p-hidroxibenzoato	0,005%
Aromas	0,01%
Agua	Complementar hasta 100

(continuación)

1.c	
Componente	%
Conjugado AH-paclitaxel	5%
Cera emulsionante	0,5%
Decil oleato	1,25%
Sorbitol	0,4%
Metil p-hidroxibenzoato	0,05%
Glicerol	0,4 %
Monoestearato de PEG 400	2,5%
Deshidroacetato sódico	0,05 %
Propil p-hidroxibenzoato	0,005%
Aromas	0,01 %
Agua	Complementar hasta 100

Tabla 2. Formulación en hidrogel

2.a	
Componente	%
Conjugado AH-paclitaxel	1 %
Carbopol	1,5%
Glicerol vegetal	6,7 %
Propilenglicol	0,2 %
Trietanolamina	1,3%
Polietilenglicol	6,7 %
Propil p-hidroxibenzoato	0,2 %
Metil p-hidroxibenzoato	0,2%
Agua	Complementar hasta 100
2.b	
Componente	%
Conjugado AH-paclitaxel	2,5%
Carbopol	1,5%
Glicerol vegetal	6,7%
Propilenglicol	0,2 %
Trietanolamina	1,3%
Polietilenglicol	6,7%
Propil p-hidroxibenzoato	0,2%
Metil p-hidroxibenzoato	0,2%
Agua	Complementar hasta 100

(continuación)

2.c	
Componente	%
Conjugado AH/paclitaxel	5 %
Carbopol	1,5%
Glicerol vegetal	6,7%
Propilenglicol	0,2%
Trietanolamina	1,3%
Polietilenglicol	6,7%
Propil p-hidroxibenzoato	0,2%
Metil p-hidroxibenzoato	0,2 %
Agua	Complementar hasta 100

Tabla 3: Formulación en crema

Componente	%
conjugado	2,5%
Cera emulsionante	0,5%
Decil oleato	1,25%
Sorbitol	0,4%
Metil p-hidroxibenzoato	0,05%
Glicerol	0,4%
Monoestearato de PEG 400	2,5%
Deshidroacetato Sódico	0,05 %
Propil p-hidroxibenzoato	0,005%
Aromas	0,01 %
Agua	Complementar hasta 100

5

Tabla 4: Formulación en hidrogel

Componente	%
Conjugado AH-5-fluorouracilo	2,5%
Carbopol	1,5%
Glicerol vegetal	6,7%
Propilenglicol	0,2%
Trietanolamina	1,3%
Polietilenglicol	6,7%
Propil p-hidroxibenzoato	0,2%
Metil p-hidroxibenzoato	0,2%
Agua	Complementar hasta 100

Tabla 5: Formulación en pomada

5.a	
Componente	%
Conjugado AH-paclitaxel	1 %
Parafina líquida ligera	20%
Vaselina filante	Complementar hasta 100
5.b	
Componente	%
Conjugado AH-paclitaxel	2,5%
Parafina líquida ligera	20%
Vaselina filante	Complementar hasta 100
5.c	
Componente	%
Conjugado AH-paclitaxel	5%
Parafina líquida ligera	20%
Vaselina filante	Complementar hasta 100

Se realizaron los siguientes ensayos *in vitro* e *in vivo* en ratones en los que se indujo queratosis actínica para demostrar que el fármaco o el principio activo antitumoral conjugado con el AH, o un derivado del mismo, es eficaz, permanece en el sitio de aplicación y se libera progresivamente sin que haya absorción sistémica. De esta manera los graves efectos secundarios de los principios activos usados, que ejercen una acción antiproliferativa, se reducen drásticamente; gracias a las propiedades regeneradoras, cicatrizantes y humectantes del AH, es más, los efectos irritantes y exfoliantes, que normalmente se producen en el tratamiento de las patologías descritas, se minimizan.

La presente invención se describe ahora de acuerdo con sus realizaciones preferidas con particular referencia a las figuras de los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra el gráfico de los resultados del ensayo con MTT realizado en la línea inmortalizada de queratinocitos (NCTC-2544) que ilustra actividad proliferativa de los queratinocitos en respuesta a diferentes concentraciones de conjugado (5 ng/ml, 50 ng/ml y 500 ng/ml);

La Figura 2 muestra el gráfico de los resultados del ensayo con MTT realizado en queratinocitos primarios sanos que ilustra la actividad proliferativa de los queratinocitos en respuesta a diferentes concentraciones de conjugado (5 ng/ml, 50 ng/ml y 500 ng/ml);

La Figura 3 muestra el examen histológico de las lesiones después de 8-9 semanas de radiación;

La Figura 4 muestra el examen histológico de las lesiones después de 8-9 semanas de radiación a mayor aumento;

La Figura 5 muestra el examen histológico de la piel lesionada tras la aplicación de la preparación basada en el conjugado de acuerdo con la invención, en la que puede observarse la presencia de polimorfonucleares eosinófilos (visibles de color rojo y señalados mediante la flecha), indicativo de un proceso inflamatorio en curso, prodromico de la fase reparadora de la piel.

Ejemplo 1: Evaluación de la actividad antiproliferativa del éster conjugado AH/paclitaxel que tiene un grado de sustitución igual al 20% p/p en la línea celular inmortalizada de queratinocitos NCTC-2544 y en queratinocitos humanos primarios.

Para verificar la actividad antiproliferativa del conjugado AH/paclitaxel, se efectuaron diversos experimentos *in vitro* adecuados para evaluar la actividad proliferativa de la línea celular inmortalizada de queratinocitos NCTC-2544 y queratinocitos humanos primarios.

Diseño experimental

En particular, los ensayos se dirigieron hacia la identificación de concentraciones del conjugado AH/paclitaxel en las que los queratinocitos primarios sanos y los queratinocitos de una línea celular inmortalizada NCTC-2544:

- mueren;
- disminuyen su actividad proliferativa;
- sobreviven

En primer lugar, se determinaron las condiciones óptimas de siembra de las células para garantizar que se alcanzaba la confluencia celular al 5º día del cultivo.

Después, las células se cultivaron en una monocapa a diferentes concentraciones de conjugado AH/paclitaxel previamente disuelto en el medio de cultivo.

Tras el tratamiento, la proliferación celular se evaluó a tiempos previamente establecidos de 1, 3 y 5 días, mediante un ensayo de incorporación de bromodesoxiuridina y un ensayo con MTT.

5 Materiales y procedimientos

Materiales:

Conjugado AH/paclitaxel: el éster conjugado AH/paclitaxel tiene un grado de sustitución igual al 20% p/p

Líneas celulares:

- línea celular inmortalizada de queratinocitos NCTC-2544
- 10 - queratinocitos humanos primarios

Procedimientos:

- 15 Aislamiento de queratinocitos sanos de biopsias de piel humana: tras diversos lavados en PBS que contenía antibiótico, la biopsia de piel se limpió de tejido subcutáneo adiposo y se cortó en tiras pequeñas. Estas tiras se sometieron a digestión con dispasa durante 30 minutos. Al final del tratamiento la piel se separó de la dermis subyacente y se sometió a digestión con tripsina durante 10 minutos.

Cultivo de NCTC-2544: las células se cultivaron *in vitro* en medio DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) complementado con suero bovino fetal al 20%; P/S (penicilina/estreptomicina) al 1%; Glutamina al 1%.

Ensayo de incorporación de bromodesoxiuridina (BRDU):

- 20 Después de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU, análogo a timina), las células se sometieron a marcado con anticuerpo anti-BrdU y posteriormente se analizaron con una placa. El marcado con BrdU se usó como un índice de proliferación celular.

Ensayo con MTT: las células se incubaron durante 3 horas con una solución de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) 0,5 mg/ml. Al final de la incubación, el colorante de MTT se extrajo de las células usando una solución extractora (isopropanol al 90%, DMSO al 10%). La lectura del colorante se realizó a 540 nm/660 nm.

- 25 Ensayos de siembra celular: las líneas celulares (NCTC) y de queratinocitos sanos se sembraron en placas que tenían 24 pocillos a tres concentraciones diferentes, 3.000-6.000-12.000 células por pocillo. Después, se evaluó la confluencia celular por análisis microscópico.

Preparación de la solución del conjugado AH/paclitaxel: el conjugado AH/paclitaxel se disolvió en una solución de glucosato al 5% en peso. Posteriormente, la solución del conjugado AH/paclitaxel se filtró con filtros fabricados de Celulosa-Acetato Cod. Albet que tenían un diámetro de 25 mm y un límite de 0,20 micrómetros.

- 30 Preparación de la solución de glucosato al 5% en peso: se pesaron 5 g de glucosa anhidra y se disolvieron en 100 ml de agua destilada. La solución se esterilizó con un filtro de 0,22 micrómetros.

Tratamiento con el conjugado AH/paclitaxel: se realizaron 6 series de experimentos a diferentes concentraciones de conjugado AH/paclitaxel.

- 35 a) 10 mg/ml; 6 mg/ml, 2 mg/ml,
b) 2 mg/ml; 1 mg/ml, 0,5 mg/ml,
c) 0,125 mg/ml; 0,050 mg/ml, 0,025 mg/ml,
d) 0,025 mg/ml; 0,0125 mg/ml y 0,005 mg/ml,
e) 0,001 mg/ml y 0,0005 mg/ml,
40 f) 500 ng/ml, 50 ng/ml y 5 ng/ml 3.

Resultados

- 45 Como se indica en la sección Materiales y Procedimientos, las células se sembraron en placas que tenían 24 pocillos a tres concentraciones diferentes, 3.000-6.000-12.000 células por pocillo. Después, la confluencia celular se evaluó por análisis microscópico. Después de esta evaluación, se estableció que la concentración de siembra inicial igual a 6.000 células por pocillo, permitía alcanzar la confluencia 5 días después de la siembra.

Actividad del conjugado AH/paclitaxel

1ª serie de concentraciones seleccionadas:

- 10 mg/ml, 6 mg/ml y 2 mg/ml;

2ª serie de concentraciones seleccionadas:

- 50 - 2 mg/ml, 1 mg/ml y 0,5 mg/ml.

A las concentraciones anteriores, 24 horas después de la administración del fármaco, tras observar las células al microscopio, se demostró que las células estaban muertas a todas las concentraciones del tratamiento. El ensayo de proliferación celular se realizó, en cualquier caso, usando, como control positivo, células tratadas con una solución de SDS (dodecil sulfato sódico) al 0,4%. Los resultados de este análisis confirmaron la muerte celular de todas las muestras tratadas.

3ª serie de concentraciones seleccionas:

- 0,125 ml/ml, 0,050 mg/ml y 0.025 mg/ml;

4ª serie de concentraciones seleccionas:

- 0,025 mg/ml, 0,0125 mg/ml y 0,005 mg/ml;

5ª serie de concentraciones seleccionas:

- 0,001 mg/ml y 0,0005 mg/ml.

En todos estos ensayos, el conjugado AH-antitumoral se administró a las 10:00 horas de la mañana después de la siembra en placa de las células; a las 15:00 horas, por lo tanto 5 horas más tarde, en el momento de la administración de BrdU para la incorporación en la parte de las células, estas ya parecían haberse redondeado; incluso aún adheridas al sustrato, a pesar de esto, se realizaron los ensayos decididos.

El ensayo que evalúa la proliferación celular mediante la incorporación de BrdU proporcionó valores comparables a los de los pocillos de control positivo (con las células muertas) a todas las concentraciones ensayadas; por consiguiente no se encontró actividad de proliferación celular en presencia del conjugado AH/paclitaxel.

En el ensayo con MTT se obtuvo el mismo resultado.

6ª serie de concentraciones seleccionas

- 500 ng/ml, 50 ng/ml y 5 ng/ml.

Como puede observarse a partir de los gráficos indicados en las figuras 1 y 2, estas concentraciones influyen sobre la actividad proliferativa tanto de los queratinocitos de la línea como de los queratinocitos primarios sanos. En particular, la concentración de 500 ng/ml produce una reducción masiva en la proliferación celular con el tiempo. De hecho, los valores relacionados con la proliferación se reducen drásticamente de 1^{er} al 5º día.

La concentración de 50 ng/ml produce una reducción de la proliferación celular, comenzando en particular desde el día 5. Esta situación se manifiesta en la línea de queratinocitos mientras que en los queratinocitos primarios, ya se observa una disminución en la proliferación celular que comienza desde el 3^{er} día de tratamiento.

La concentración de 5 ng/ml no parece producir ningún efecto significativo sobre la actividad proliferativa en los queratinocitos de la línea (NCTC-2544): las células sobreviven y conservan su actividad proliferativa hasta el 5º día, mientras que en el caso de los queratinocitos primarios sanos, se observa una disminución en la proliferación celular comenzando desde el 3^{er} día.

Conclusiones

A la luz de los resultados previamente indicados, se puede llegar a la conclusión de que mayores concentraciones de 500 ng/ml son altamente tóxicas para las células ya que producen su muerte a las 24 horas de la administración; concentraciones inferiores a 5 ng/ml no producen ningún efecto antiproliferativo sobre las células de la línea, mientras que concentraciones mucho más bajas de 5 ng/ml no producen ningún efecto antiproliferativo sobre los queratinocitos sanos.

Para evaluar la actividad antiproliferativa del éster del conjugado AH/5-fluorouracilo que tiene un grado de sustitución igual al 15% p/p, también se realizaron ensayos análogos a los efectuados en el ejemplo 1 sobre la línea celular inmortalizada de queratinocitos NCTC-2544 y queratinocitos humanos primarios. Estos ensayos preliminares proporcionaron resultados que confirmaban una tendencia comparable a la del conjugado AH/paclitaxel.

Ejemplo 2: Evaluación de la actividad del conjugado AH/Paclitaxel en un modelo in vivo de queratosis actínica

Para evaluar la actividad del bioconjugado AH/Paclitaxel en el tratamiento de patologías dermatológicas hiperproliferativas, y más específicamente, en el tratamiento de queratosis actínica, se preparó un modelo de Queratosis Actínica (QA), que en periodos de tiempo relativamente cortos inevitablemente degenera en Carcinoma de Células Escamosas (CCE), en ratones lampiños SHK-R1', considerados en la bibliografía como adecuados para este tipo de experimentación (De Gruijl FR y Forbes PD. BioEssays 1995; 17:651-60; Kligman LH y Kligman AM. JNCI 1981; 67: 1289-97). De hecho, como ya se ha especificado, la queratosis actínica se considera una forma precancerosa, degenerativa en carcinoma de células escamosas, también conocido como carcinoma espinocelular.

Materiales y procedimientos

Protocolo experimental

Se usaron 20 ratones SHK-R1' de 6-7 semanas de vida, divididos en cuatro grupos de cinco:

- grupo A: control.
- grupo B: animales tratados con la crema del conjugado AH/paclitaxel al 1%, preparada como formulación 1.a
- 5 - grupo C: animales tratados con Pomada Efudex® (5-Fluorouracilo)
- grupo D: animales tratados con Crema Connettivina® (AH al 0,2%).

El último grupo permite evaluar si el efecto positivo de la preparación a ensayar se debe exclusivamente a la presencia del ácido hialurónico, cuyas propiedades de curación son bien conocidas.

- 10 El uso tópico de Paclitaxel en solitario no fue posible debido a una acción irritante excesiva del principio activo, completamente inadecuado para esta forma de administración ya que este debe solubilizarse en Cremofor (Beri R, Rosen FR, Pacini Mj, Desai SR. Severe dermatologic reactions at multiple sites after paclitaxel administration. Ann. Pharmacother 2004; 38, 238-41; Baycal C, Erkel E, Tutar E, Yuce K, Ayhan A. Cutaneous fixed drug eruption to paclitaxel; a case report. Eur. J. Gynaecol. Oncol. 2000; 21, 190-1).

- 15 El dorso de todos los animales se sometió a radiación 3 veces a la semana durante 30 minutos con la fuente de radiación UVB Jelolamp FS40_(Jelosil Skin UVS 311 nm; Jelosil srl, Vimodrone - Italy) con banda ancha situada a 30 cm de los ratones. Calculando la distancia de cada ratón de la fuente, que es variable ya que los animales se colocan en diferentes posiciones bajo la fuente de radiación, se evaluó que la radiación era igual a $540 \div 1080$ mJ/cm². Después de un periodo de aproximadamente 2 semanas, los ratones presentaban síntomas claros de eritema en la piel de su dorso.

- 20 En todos los animales, después de 8-9 semanas, se desarrolló una lesión en sus dorso y cabeza, que clínicamente apareció como una placa hiperqueratótica (con dimensiones de 2,5 cm x 1 cm), que tenía una superficie irregular, casi verrugosa. Un examen histológico de estas lesiones reveló (Figuras 3 y 4):

- Epidermis hiperplásica, con hipergranulosis, acantosis e hiperqueratosis
- Ausencia de capas citológicas atípicas y síntomas de invasión dérmica
- 25 • Presencia de quistes de gran tamaño, con abundante materia queratínica, en algunos casos con extroversión en la parte externa de la epidermis.

Después de 15-16 semanas, en el dorso y cabeza de los ratones, aparecieron lesiones cupuliformes, papulares, que tenían un aspecto translúcido y dimensiones de 1-2 mm.

- 30 Después de 15-18 semanas de radiación UVB, todos los animales habían desarrollado placas hiperqueratóticas en la superficie de la piel, lo que podría atribuirse a la manifestación de la patología en cuestión: en este momento, los grupos B, C y D se trataron con las formulaciones indicadas anteriormente.

Las preparaciones se aplicaron en la piel lesionada durante 14 días consecutivos.

- 35 Durante el periodo de tratamiento, se verificó la muerte de todos los animales del grupo C, tratados con Pomada Efudex®, en el intervalo entre el 10^{er} y 13^{er} día, demostrando adicionalmente la alta toxicidad de 5-FU que se absorbe sistémicamente de manera masiva; por el contrario, ningún animal del resto de grupos, mostró ningún síntoma de intolerancia a las formulaciones y no hubo muertes espontáneas.

El tratamiento con el conjugado AH/paclitaxel al 1% no produjo ninguna reacción visible en la piel de los animales, a diferencia de lo que habría ocurrido solo con Paclitaxel.

- 40 Desde un punto de vista histológico, en la preparación mencionada anteriormente, se observó la presencia de diversos polimorfonucleares eosinófilos, lo que indica un proceso inflamatorio en curso, prodrómico de la fase reparadora de la piel (Figura 5). Por otro lado, tanto en el grupo de animales tratados con Crema Connettivina® como en el grupo no tratado, se observó una progresión de lesiones en la piel.

Resultados

- 45 A partir de un análisis histológico efectuado sobre las biopsias extraídas de los grupos de tratamiento anteriores, se pudo llegar a las siguientes conclusiones:

- con respecto al grupo de referencia no tratado, no se observa superioridad de la Crema Connettivina® en cuanto a retrasar la degeneración de la QA en CCE.
- con respecto al grupo tratado con Crema Connettivina® y grupo de referencia no tratado, se observa superioridad clara del conjugado AH/paclitaxel al 1%, retrasando significativamente dicha degeneración. La presencia de polimorfonucleares eosinófilos precede a, y es una parte integrante de, la fase de formación del tejido de granulación, re-epitelización y re-modelación, esencial para la curación de la placa hiperqueratótica de la QA.
- 50

Por lo tanto puede afirmarse que:

- el tratamiento con el conjugado AH/Paclitaxel al 1% en un vehículo crema retrasa significativamente la degeneración de placas hiperqueratóticas a CCE en el modelo animal seleccionado;
- adicionalmente, el tratamiento con el conjugado AH/Paclitaxel al 1% en un vehículo crema induce la presencia de polimorfonucleares eosinófilos, necesarios para la granulación, re-epitelización y re-modelación del tejido de la piel con placas;
- la formulación presentada no crea ningún problema de irritación en la piel después de la aplicación tópica;
- dado que no muere ningún animal, ni muestra signos de sufrir, puede deducirse que el paclitaxel se libera sustancialmente en el acto y no es objeto de absorción sistémica significativa.

10 Conclusiones

Para concluir, el conjugado AH/Paclitaxel al 1% en un vehículo crema, descrito en el presente documento, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la QA, ya que restablece lesiones hiperqueratóticas y retrasa al mismo tiempo significativamente la degeneración de la patología hacia su forma neoplásica.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un conjugado entre el ácido hialurónico, o un derivado del mismo, y fármacos antitumorales seleccionados de paclitaxel o 5-fluorouracilo, en el que el derivado del ácido hialurónico se selecciona de sales con bases orgánicas y/o inorgánicas, ésteres del ácido hialurónico con alcoholes de la serie alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, amidas del ácido hialurónico con aminas de la serie alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, derivados O-sulfatados, ésteres internos del ácido hialurónico con un porcentaje de esterificación no mayor del 20%, desacetilados del ácido hialurónico, percarboxilatos del ácido hialurónico obtenidos por la oxidación de grupos hidroxilo primarios de la fracción N-acetilglucosamina con un grado de percarboxilación que varía del 0,1 al 100%, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento tópico de la queratosis actínica.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el fármaco antitumoral es paclitaxel.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la composición farmacéutica es en forma de crema, hidrogel, pomada o en forma de tiritas o películas medicinales que contienen el conjugado.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el conjugado entre el AH, o un derivado del mismo, y el fármaco antitumoral varía del 0,05 al 10% en peso, con respecto al peso total de la composición.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el conjugado entre el AH, o un derivado del mismo, y el fármaco antitumoral varía del 0,2 al 5% en peso, con respecto al peso total de la composición.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el conjugado AH-paclitaxel corresponde al éster conjugado con un grado de sustitución igual al 20% p/p.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el conjugado AH-5-fluorouracilo corresponde al éster conjugado con un grado de sustitución igual al 15% p/p.

Recuentos EU

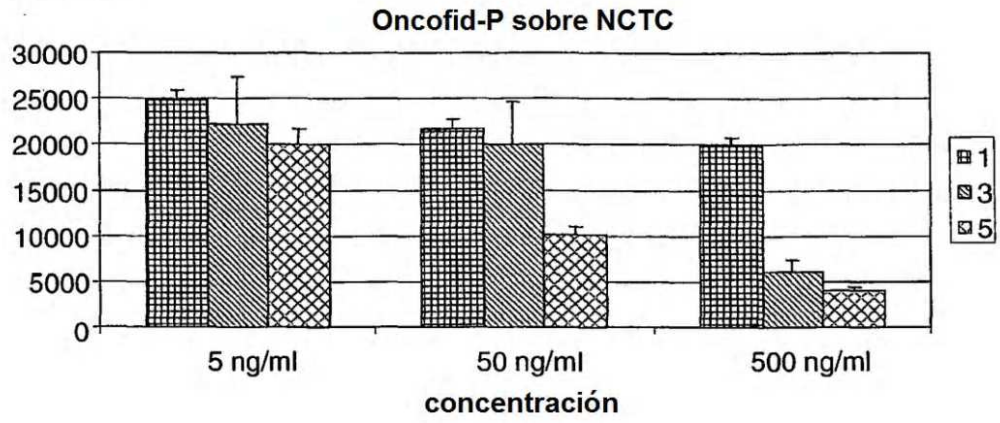


Fig. 1

Recuentos EU

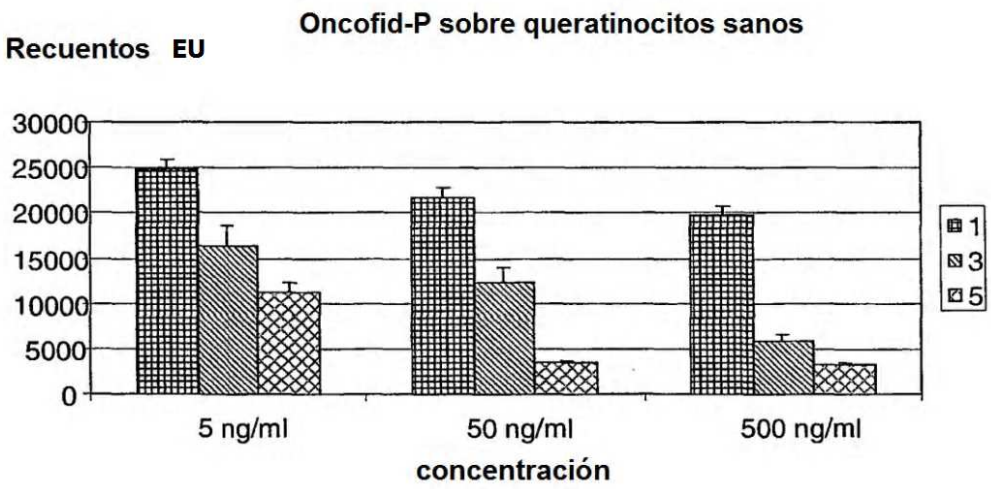


Fig. 2

Fig. 3

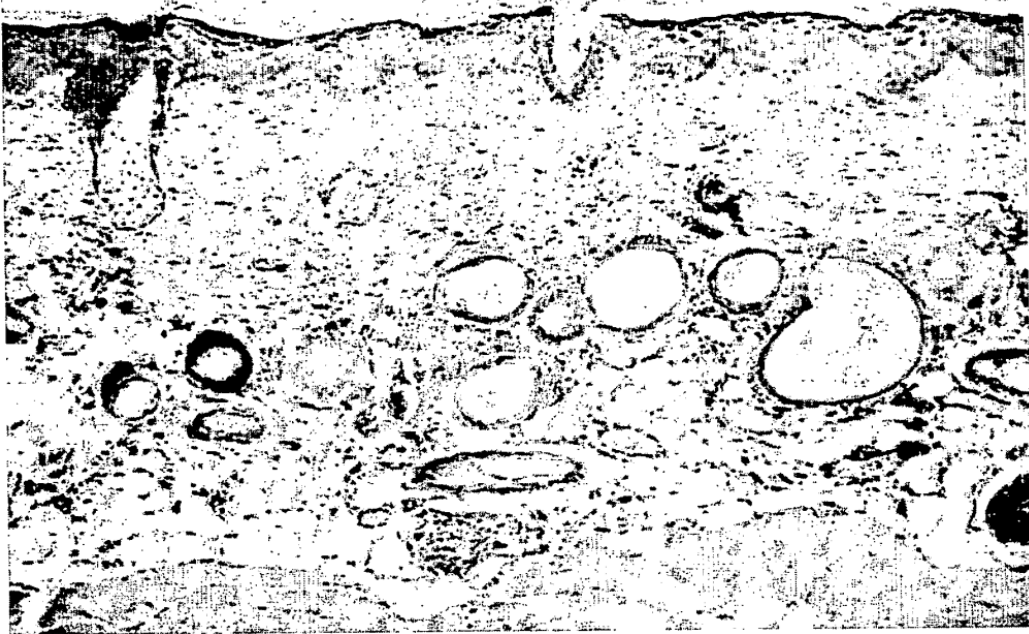


Fig. 4



Fig. 5

