

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 793**

21 Número de solicitud: 201400254

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 33/44 (2006.01)

A61K 35/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.03.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.07.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (100.0%)
Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n
39005 Santander (Cantabria) ES

72 Inventor/es:

LÓPEZ FANARRAGA, Mónica;
VALIENTE BARROSO, Rafael y
GONZÁLEZ GÓMEZ, Jesús Antonio

54 Título: **Composición de nanofilamentos para el tratamiento de tumores**

57 Resumen:

Composición de nanofilamentos para el tratamiento de tumores.

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden nanofilamentos y al menos un excipiente para su empleo en el tratamiento antitumoral, donde los nanofilamentos, que actúan como agentes neoplásicos, están funcionalizados con suero procedente de sangre humana. Asimismo, se contempla el procedimiento de obtención de dichas composiciones.

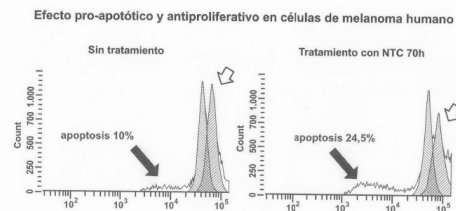


FIG. 7

DESCRIPCIÓN

Composición de nanofilamentos para el tratamiento de tumores

Objeto de la invención

5 La presente invención tiene su campo de aplicación dentro del sector sanitario, principalmente en el sector de la Oncología. En concreto, se refiere a composiciones para el tratamiento de tumores basadas en el empleo de nanofilamentos como agentes antineoplásicos.

Antecedentes de la invención

10 El Cáncer es una enfermedad altamente heterogénea donde algunas células que se dividen rápidamente escapan a todos los mecanismos de control genético resultando en innumerables mutaciones aleatorias (*Navin et al. Tumor evolution inferred by single cell sequencing. Nature 472, 90-94, 2011*). Algunos de estas mutaciones son incompatibles con la supervivencia celular, pero otras proporcionan ventajas genéticas sustanciales que inevitablemente conducen a una resistencia a diferentes fármacos. Como resultado, las terapias dirigidas a genes o proteínas son sólo efectivas de forma transitoria hasta que surgen nuevas adaptaciones o mutaciones celulares que eluden el efecto del fármaco. Por esta razón, la resistencia genética a la quimioterapia es uno de los problemas a los que se enfrenta la farmacología a medio plazo.

15 Los microtúbulos celulares son dianas de numerosos fármacos anticancerosos (*Jordan, M.A. & Wilson, L. Microtubules and actin filaments: Dynamic targets for cancer chemotherapy. Curr. Opin. Cell Biol. 1, 123-130. 1998; Jordan M. Mechanism of Action of Antitumor Drugs that Interact with Microtubules and Tubulin. Curr. Med. Chem. 2, 1-17, 2012*). Estos microtúbulos intracelulares naturales son polímeros ensamblados a partir de subunidades de tubulina que se nuclean y organizan en el centrosoma. Los microtúbulos son polímeros dinámicos que van alternando continuamente entre fases de ensamblaje y desensamblaje en una escala de segundos in vivo (*Mitchison, T. & Kirschner, M. Dynamic instability of microtubules growth. Nature. 312, 237-242, 1984*) (*Matson, D. R. & Stukenberg, P.T. Spindle positions and cell fate: A tale of two pathways. Mol Interv. 11, 141-150, 2011*). Este comportamiento dinámico es crucial para la reorganización del citoesqueleto de la célula durante la proliferación celular (*Mitchison, T et al. 1984*). De hecho, los fármacos anticancerosos que interfieren con la dinámica los microtúbulos son activos contra un amplio rango de tipos de cáncer y son algunos de los tratamientos antineoplásicos más usados. Estos fármacos se comportan como “venenos” o disruptores del huso mitótico, perturbando su ensamblaje, lo que provoca a la parada mitótica y eventualmente desencadena la muerte celular (*Jordan, M.A. et al, 1989; Matson, D.R. et al, 2011; Zhou, J, et al. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents, 5, 65-71, 2011*).

20 Así, los fármacos anticancerosos que interfieren con la dinámica de los microtúbulos son los fármacos más efectivos y más empleados desde hace 50 años. Estos fármacos impiden selectivamente la proliferación celular descontrolada bloqueando la división celular, interfiriendo con la dinámica de los microtúbulos de las células y actuando como agentes proliferativos. Los fármacos de esta familia son la colchicina, la vinblastina y vincristina y los responsables de promover la unión y estabilizar el microtúbulo, como los taxanos (familia del paclitaxel) o las epitolonas. Estos fármacos interaccionan con la molécula de tubulina, en unas regiones muy específicas de la estructura de la beta-tubulina, que el estado de la técnica ha definido claramente (**Figura 1**).

25 En particular, el paclitaxel (taxol®) favorece la estabilización de los microtúbulos y provoca la desorganización del huso mitótico y la consiguiente parada del ciclo celular en la transición metafase/anafase, lo que finalmente mata a las células del cáncer por apoptosis.

30 A pesar de ser uno de los agentes antitumorales más empleados en las últimas décadas, el paclitaxel tiene bastantes desventajas, como su insolubilidad en solventes salinos. Además las células del cáncer han encontrado numerosas formas de escapar de estos fármacos antimitóticos y evadir la muerte celular, por ejemplo (i) modificando mediante mutaciones puntuales el sitio de unión de estas drogas a la tubulina, (ii) mediante modificaciones postraduccionales de las tubulinas, (iii) alterando la composición de isotipos de tubulina en los microtúbulos, (iv) alterando a las proteínas reguladoras de la tubulina o microtúbulos, y finalmente, (v) modificando el propio ciclo celular, acortando o debilitando el SAC o provocando la salida de mitosis por un proceso que se denomina escape o deslizamiento mitótico (del inglés *mitotic slippage*).

35 40 45 50 A nivel sistémico todos estos fármacos tienen además innumerables inconvenientes pues son inhibidores de la proliferación de todas las células del organismo, lo cual tiene importantes efectos secundarios en el paciente

que es tratado.

Por ello, desafortunadamente, el desarrollo de resistencias genéticas a estas drogas y su significativa toxicidad insta a encontrar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer.

5 En este sentido, la nanotecnología proporciona alternativas completamente diferentes a las terapias antineoplásicas tradicionales, empleando estrategias muy distintas a los fármacos, dado que no precisan de genes o proteínas diana para matar las células del cáncer.

De forma particular, los nanotubos de Carbono (NTCs) representan una clase de materiales altamente versátiles que muestran propiedades mecánicas, térmicas y electrónicas muy interesantes. Los NTCs son capaces de atravesar tejidos y penetrar en el interior de las células por diferentes mecanismos, fundamentalmente por endocitosis, donde pueden interactuar con nanoestructuras subcelulares (Shi, X., et al. "Cell entry of one dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. *Nat. Nanotechnol.* 6, 714-719 (2011), (Lacerda, L. et al. "Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials* 33, 3334-3343, 2012). Dependiendo de su longitud y diámetro, los diferentes tipos de NTC se comportan de forma diferente *in vivo*. Se ha descrito ya la interacción de estas fibras con ADN (Li, X., Peng et al. "CNTs selective destabilization of dúplex and triplex DNA, inducing B-A transition in solution. *Nucleic Acids Res.* 34, 3670-3676, 2006), filamentos de actina (Holt, B. et al. *Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and ex vivo. ACS Nano* 4, 4872-4878, 2010) o microtúbulos. En particular, los nanotubos de carbono multipared (MWCNTs) pueden ensamblar polímeros biosintéticos mixtos con tubulina *in vitro* (Figura 2) (Pampaloni, F. et al. *Microtubule architecture: Inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. Trends Biotechnol.* 26, 302-310, 2008) (Dinu et al. "Tubulin encapsulation of CNTs into functional hybrid assemblies. *Small* 5, 310-315, 2009) e *in vivo* (Rodríguez et al, "Multiwalled Carbon Nanotubes Display Microtubule Biomimetic Properties in Vivo, *Enhancing Microtubule Assembly and Stabilization*". 2012 *ACS Nano*, vol.6, nº 8, 6614-6625), siendo esta interacción biomimética favorecida por muchos factores. Ambos, microtúbulos y MWCNTs, son polímeros unidimensionales que comparten propiedades como su ratio longitud/diámetro, flexibilidad, autoensamblaje y su tendencia a formar racimos para aumentar su resistencia.

Una vez en el citosol, los MWCNTs interactúan con la tubulina ensamblando polímeros biosintéticos que interfieren significativamente con la dinámica microtubular, favoreciendo la nucleación ectópica de microtúbulos y desensamblando el centrosoma. Esto da lugar a la desorganización del huso mitótico (Figura 3), bloqueando a las células en metafase y desencadenando la apoptosis. Así, los MWCNTs se comportan como los tradicionales fármacos disruptores del huso mitótico (Matson D.R. et al. 2011) pero con la gran ventaja de que no requieren sitios específicos (dianas moleculares) de unión molecular en la molécula de la tubulina (Figura 1).

Los nanofilamentos en general, y los NTC en particular, al no ser fármacos tradicionales y ser bastante estables químicamente, proporcionan grandes mejoras en la inhibición de la dinámica microtubular. La unión microtúbulo-nanofilamentos no depende de dianas específicas en proteínas sino que funciona por cuestiones morfológicas siendo de esta manera mucho más difícil que las células desarrollen un sistema de resistencia a estos nanomedicamentos (Figura 1). Existen en el estado de la técnica trabajos que confirman los efectos antiproliferativos y propapóticos de los NTCs en la línea celular HeLa derivada de un cáncer humano (Rodríguez et al, 2012).

Pero para que este fenómeno ocurra los nanofilamentos deben de estar bien dispersados, de forma individual, para así poder interactuar con los microtúbulos longitudinalmente. Si los nanofilamentos entran en las células agregados en forma de ovillos o racimos, no tienen ningún efecto anticanceroso, pues, aunque podrían matar a las células no lo harían de forma específica. Serían fagocitados fundamentalmente por macrófagos y quedarían almacenados intracelularmente, pero sin unirse a los microtúbulos y sin impedir la proliferación celular.

Ante la necesidad existente de terapias antineoplásicas alternativas, los autores de la presente invención, tras un importante trabajo de experimentación, han desarrollado una composición a base de nanofilamentos efectiva en el tratamiento de numerosos tipos de células tumorales.

Los autores de la presente invención han conseguido la dispersión total de los nanofilamentos en la composición de forma individualizada, o casi individualizada, recubiertos por proteínas procedentes de suero obtenido de la sangre del propio paciente, lo que evita reacciones inmunológicas no deseadas, y permite obtener de este modo una separación de los nanofilamentos satisfactoria en suspensión para su aplicación y adecuada para lograr la actividad antitumoral reivindicada en la invención (Figura 4).

La composición de la invención puede aplicarse de forma tópica o parenteral, por ejemplo por inyección intratumoral, o bien por depósito, tras una resección tumoral.

El tratamiento a nivel tópico permite disminuir de forma ventajosa los posibles efectos citotóxicos sistémicos.

Entre los tumores accesibles tópicamente, el de piel es el más común dentro de la población caucasiana. Tiene una tasa de incidencia muy alta, excediendo la suma de todos los demás tipos de cáncer combinados (Simonette et al, 2009). De forma más destacada, existen tres formas de tumores de la piel: melanoma maligno cutáneo, carcinoma de las células basales (BCC) y el carcinoma de células escamosas (SCC).

BCC y SCC se clasifican como cáncer de piel no-melanoma, siendo BCC el más común y constituyendo un 75% de los casos (Anthony M.L., *Surgical Treatment of nonmelanoma skin cancer. AORN, vol.71, nº3 (March 2000), pp.550-564, ISSN 0001-2092*). La incidencia del cáncer de piel no melanoma ha ido aumentando de manera constante, suponiendo un desafío en términos de gestión de la sanidad pública. Además, este tipo de cáncer tiene un gran impacto en los costes de atención sanitaria. Este tipo de cáncer no es mortal pero puede destruir órganos sensoriales faciales como oídos, nariz y labios (Alam, M. et al. *Delayed treatment and continued growth of nonmelanoma skin cancer. Journal of American Academy Dermatology, vol.64, nº 5, (May 2011) pp. 839-848, ISSN 0190-9622*). Por ello, estas lesiones se tratan preferiblemente mediante técnicas no invasivas.

Por el contrario, los cánceres de piel tipo melanoma son un tipo agresivo que puede producir metástasis y puede causar la muerte. Este tipo de cáncer se origina a partir de melanocitos, células productoras de pigmentos, y está asociado con la exposición crónica al sol (Einspahr et al. *Chemoprevention of human skin cancer. Critical Reviews in Oncology/Hematology, vol. 41, nº3 (March 2002), pp. 269-285, ISSN 1040-8428*). Puesto que los melanomas presentan una mortalidad mucho más alta que los no-melanomas, se requieren diferentes tratamientos, incluyendo intervenciones invasivas (Martinez & Otley, *The mandament of melanoma and nonmelanoma skin cancer: a review for the primary care physician. Mayo Clinic Proceedings, vol. 76, (december 2001), pp. 1253-1265, ISSN 0025-6196*).

Hay algunos tratamientos ampliamente empleados para cáncer de piel no melanoma como legrado, cirugía, crioterapia y quimioterapia. Sin embargo, estos tratamientos conducen a inflamaciones severas, dolor y cicatrices poco atractivas (Lopez et al, *Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. Advanced Drug Delivery Reviews, vol.56, nº 1 (january 2004), pp. 77-94, ISSN 0169-409X*). Por su parte, los tratamientos para melanoma son principalmente cirugías ya que estos tumores pueden ser resistentes a los tradicionales tratamientos con quimio y radioterapia (Davids & Kleeman, *Combatin5-7372, doi 10.1016/j.ctrv.2010.11.007 melanoma: the use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. Cancer Treatment Reviews (december 2010) ISSN 0302010*). Los tratamientos no quirúrgicos para melanomas están limitados a terapias adyuvantes, como inmunoterapia, bioquimioterapia, terapia génica y terapia fotodinámica (Martinez & Otley, 2001; Davids & Kleeman 2010).

Por tanto, la administración tópica de los medicamentos contra este tipo de cáncer en concreto, es una alternativa interesante para reducir los efectos secundarios y para incrementar las dianas de los fármacos y los beneficios terapéuticos.

En el cáncer de piel, las investigaciones actuales llevadas a cabo en el estado de la técnica persiguen el desafío de poder aumentar la penetración del fármaco a unos niveles que permitan matar las células tumorales. Así, se han desarrollado diversas técnicas y formulaciones para atravesar con éxito las barreras de la piel y alcanzar las células tumorales, favoreciendo de este modo la penetración del fármaco en las capas profundas de la epidermis. El empleo de potenciadores químicos de la penetración es la estrategia más sencilla, causando una disrupción temporal y reversible del estrato córneo incrementando la penetración del fármaco en el tumor.

Los tratamientos antitumorales tópicos se pueden aplicar en forma de cremas o emulsiones, por ejemplo en cánceres de piel muy accesibles, o en forma de inyecciones o depósitos de fármacos intra/peri-tumorales, o tras las extirpación del tumor. En todos estos casos se persigue un mayor efecto a nivel local minimizando el efecto citotóxico sistémico. De hecho existen ya tratamientos tópicos contra la queratosis actínica, así como de los cánceres de piel de células basales y de células escamosas, generalmente cremas que contienen 5-fluorouracilo o 5-FU (Efudex®, Carac®, otros) o Imiquimod (Aldara™). Este mismo tratamiento también se ha empleado para el cáncer de vagina. En ambos casos su aplicación tópica no es suficientemente eficaz, eliminando únicamente las células cancerosas cercanas a la superficie de la piel.

Pero además de los carcinomas superficiales, otros tumores son también objeto de esta nanoterapia tópica. Un ejemplo son los carcinomas de vejiga o de colon, e incluso los glioblastomas, cuyo tratamiento de elección es la resección quirúrgica, y donde existen ya dispositivos de liberación de fármacos in situ pos-exéresis, como los

implantes de carmustina (GLIADEL® Wafer (polifeprosan carmustine implant)).

Dentro de esta aplicación tópica, en el estado de la técnica, existe además gran interés por los sistemas de liberación de nanopartículas que protejan los fármacos de la degradación y que, combinados con métodos físicos, incrementen de forma significativa la penetración del fármaco en el tumor, actuando como vehículos del mismo (Stephany FLeury et al. *Topical administration of anticancer drugs for skin cancer treatment. Skin Cancers, Risk Factors, prevention and therapy*).

La composición de la presente invención, supone un importante avance en el estado de la técnica, ya que, a diferencia de lo divulgado hasta el momento, los nanofilamentos actúan por sus propiedades como agentes neoplásicos en la composición y no como vehículos de otros fármacos o de material genético, por ejemplo de ARN de interferencia.

La composición de la invención además presenta efectos antimigratorios (antimetastáticos) en una gran variedad de líneas celulares de diferentes orígenes (tumores epiteliales, neurales, cáncer de mama, etc), reduciendo así el riesgo de diseminación tumoral.

La composición de la invención presenta por tanto importantes aplicaciones clínicas, pudiéndose emplear en el tratamiento adyuvante o neo-adyuvante de muchos tipos de cánceres o tumores, a través de diferentes vías de aplicación.

Descripción de las figuras

Figura 1: Izquierda: Estructura del dímero de tubulina y su interacción con los diferentes fármacos anticancerosos (Números ID del banco de datos del NCBI: tubulina unida a colchicina, 3E22; tubulina unida a vimblastina, 4I4T; tubulina unida a paclitaxel, 1JFF; y tubulina unida a epotilona, 1TVK por el orden de la figura). Derecha: modelo propuesto de la interacción de un nanofilamento (NTC) con un protofilamento del microtúbulo. Como se aprecia en la figura la superficie de interacción entre ambos es muy superior a la que presentan los fármacos tradicionales.

Figura 2: Modelo de interacción de los nanofilamentos con los microtúbulos para bloquear su dinámica.

Figura 3: (A-C) Efecto “disruptor del huso mitótico” inducido por el tratamiento con nanotubos en células de cáncer humano (HeLa). Alteraciones observables en la disposición de los microtúbulos (filamentos) del huso mitótico durante la división celular en presencia de nanofilamentos. Se observa la disposición de los cromosomas (en blanco). **(D-E)** Núcleos celulares (masas de color blanco) en apoptosis como resultado del tratamiento celular con NTC.

Figura 4: (A) Resuspensión de NTC en diferentes medios. Los medios de la izquierda y centro muestran cómo la composición objeto de la invención es eficiente resuspendiendo los NTC. En el fondo del tubo no se observan depósitos de NTC precipitados y se observa una solución ennegrecida resultado de la gran cantidad de NTC que contiene en suspensión. **(B,C)** Diagrama de un nanofilamento, antes y después de su recubrimiento con proteínas procedente del suero humano a escala (Albúmina). **(D, E)** Imágenes de microscopía electrónica de nanotubos de carbono sin funcionalizar y **(derecha)** y funcionalizados con el recubrimiento de proteínas séricas (a diferente escala, ver la barra de escala indicada).

Figura 5: a) (izquierda) Diagrama del eje núcleo-centrosomal (flecha discontinua) desde el centro del núcleo **(N)** al centrosoma **(derecha)**. Reorganización del citoesqueleto microtubular durante la metafase para formar el huso mitótico (como se ve en la **Figura 4**). **b)** Diagrama de la disposición del núcleo **(N)**, centrosoma **(C)** y citoesqueleto microtubular **(filamentos)** en células control y en las tratadas con los nanotubos objetos de la invención durante la migración. Las fuerzas de tracción microtubulares están representadas por pequeñas flechas. La polaridad celular y la dirección de migración relativa al eje núcleo-centrosomal se indican por una flecha gruesa.

Figura 6: Inhibición de la migración en células tumorales de diferentes naturalezas, todas ellas humanas tratadas con nanotubos de carbono **(arriba)**. Células de glioblastoma humano obtenidas de tumores procedentes de especímenes quirúrgicos **(centro y abajo)** trayectorias de otras líneas de células tumorales humanas (indicadas). Las trayectorias corresponden al total de la distancia migratoria recorrida por las células en 5 h (control a la izquierda y las tratadas a la derecha). Los resultados muestran cómo los NTC son inhibidores potentes de la migración celular tumoral.

Figura 7. Gráfico de citometría de flujo que muestra los resultados obtenidos en células SK-Mel-2, establecidas a partir de melanomas humanos primarios, tras el tratamiento de las células con NTC funcionalizados con suero humano. Se observa una clara disminución de las células en G2 (indicado por flechas blancas), lo que indica un bloqueo de las células en G1, es decir una clara inhibición de la división celular.

- 5 **Figura 8.** Histograma que representa las velocidades medias de las células SKMEL-2 tratadas con NTC funcionalizados con suero animal (suero tipo 1) y suero humano (suero tipo 2).

Descripción de la invención

10 En una realización principal, la presente invención se refiere a una composición que comprende nanofilamentos y al menos un excipiente para su empleo en el tratamiento antitumoral, donde los nanofilamentos, que actúan como agentes neoplásicos, están funcionalizados con suero humano (a partir de ahora composición de la invención).

15 En la presente invención, el término nanofilamentos abarca tanto nanofibras como nanotubos o nanohilos, y en general, cualquier nanomaterial que presente dos dimensiones, una de ellas con tamaño inferior a 80 nanómetros de diámetro. En adelante hablaremos genéricamente de nanofilamentos.

20 Los nanofilamentos, por su condición, tienen una gran relación de peso/superficie y por ello tienden a formar agregados en forma de racimos (*bundles*). Los nanofilamentos, al entrar a las células, si lo hacen en forma de ovillos o racimos, no pueden interactuar con los microtúbulos y, por tanto, no pueden llevar a cabo su efecto antitumoral. La funcionalización de los nanofilamentos permite su dispersión e individualización en solventes, en este caso biocompatibles (tipo suero salino ó similar), pudiendo así penetrar por endocitosis en la célula de forma individualizada y ejercer su efecto.

25 La funcionalización de los nanofilamentos con suero permite modificar las propiedades físicas de la superficie de estos nanomateriales, como son la solubilidad y dispersabilidad, que son fundamentales para que puedan ejercer sus propiedades biológicas, permitiéndoles tener una mejor interacción con los receptores (moléculas biológicas) de las membranas de las células del cáncer.

En la presente invención la funcionalización se lleva a cabo con suero procedente de sangre humana, preferiblemente del propio paciente, lo que de forma muy ventajosa evita complicaciones de tipo inmunológico en sus aplicaciones terapéuticas.

30 El empleo de suero del paciente permite la dispersión total de los nanofilamentos de forma individualizada, o casi individualizada al quedar los nanofilamentos recubiertos por proteínas todas procedentes del suero del propio paciente, evitando reacciones inmunológicas no deseadas y obteniendo de este modo una separación de los nanofilamentos satisfactoria y adecuada (**Figura 4**). Estas proteínas hacen que las células reconozcan específicamente a los nanotubos que las rodean como algo propio, endocitándolos activamente, y una vez en el citosol celular éstos pueden actuar interfiriendo con los procesos dinámicos de los microtúbulos formando haces. Cuando esto ocurre, las células en división que precisan de una dinámica microtubular muy activa se quedan bloqueadas en metafase y terminan por morir (**Figuras 3D, 3E, 7**).

40 En la **Figura 4** se puede observar la dispersión de nanotubos en medios fisiológicos tras su funcionalización con suero bovino, suero equino y suero humano respectivamente (**Figura 4A** de izda. a dcha.) y los modelos de interacción de las proteínas séricas (en el caso del diagrama, sero-álbumina) con la superficie del nanotubo (a escala) (**Figura 4B, 4C** respectivamente), así como micrografías electrónicas que muestran los NTC antes (**Figura 4 D**) y después de la funcionalización con estas proteínas (**Figura 4E**).

En una realización particular, los nanofilamentos empleados en la composición de la invención presentan un diámetro externo comprendido entre 5 y 50 nm y una longitud comprendida entre 200 y 20.000 nm

45 De forma particular, los nanofilamentos empleados en la composición de la invención pueden ser nanotubos de carbono (NTC) ultrapuros, de una o varias paredes (multipared). De forma preferida, los nanotubos de carbono presentan 3-12 paredes de grafeno.

Los NTC se pueden sintetizar u obtener comercialmente (por ejemplo marca Nanocyl). Se deben caracterizar a nivel de impurezas mediante espectroscopía Raman, como se muestra en el estado de la técnica (*Rodríguez et al. 2012*).

50 En una realización preferida, la concentración de nanofilamentos resuspendidos en la composición final para su

aplicación está comprendida entre 0,1 y 100 µg/ml de excipiente.

La composición de la invención es adecuada para su aplicación por vía tópica o parenteral. Además, la composición de la invención también se puede aplicar mediante su depósito (por ejemplo mediante una jeringa) en una zona tras la resección quirúrgica de cualquier tipo de tumor sólido, por ejemplo un glioblastoma o un sarcoma, para evitar la migración de las células tumorales o peritumorales.

En el caso de la administración vía tópica, la composición de la invención puede emplearse en el tratamiento de tumores accesibles tópicamente (como por ejemplo melanomas malignos, carcinomas basocelulares, cánceres de cabeza cuello, queratosis actínicas y nevos displásicos). Los tratamientos antitumorales tópicos se pueden aplicar en forma de cremas o emulsiones, en cánceres de piel muy accesibles, o en forma de inyecciones o depósitos de fármacos intra/peri-tumorales, o tras la extirpación del tumor.

En el caso de la administración por vía parenteral, la composición puede emplearse en el tratamiento de tumores accesibles mediante endoscopia (como los digestivos, tipo cáncer de colon, ginecológicos, de vejiga, páncreas e incluso de cerebro), accesibles mediante inyección intratumoral directa (cualquier tipo de tumor sólido), micro-inyección (como por ejemplo en los tumores accesibles desde la piel) o en tumores accesibles tópicamente (inyectando a través de la piel o de forma subcutánea).

El excipiente empleado en la composición de la invención puede ser cualquiera empleado en un producto de uso tópico o parenteral. De forma particular, el excipiente puede ser un medio salino, como solución salina, suero fisiológico o similar.

En el caso de la aplicación por vía tópica, la composición puede presentarse en forma de cremas, pomadas, etc, donde el excipiente comprende un medio no acuoso a base de ácidos grasos, geles de hidrocarburos, vaselinas y/o polímeros biodegradables.

La composición de la invención puede emplearse como terapia adyuvante o neoadyuvante. Así, puede emplearse como coadyuvante en terapias antitumorales o anti-cancerosas.

Asimismo, se contempla la composición de la invención para su empleo en el tratamiento de tumores con riesgo de metástasis. El trabajo de experimentación desarrollado por los autores de la invención ha permitido mostrar cómo además los nanofilamentos son capaces de desorganizar el citoesqueleto microtubular de las células tratadas cuando se encuentran en interfase. Este hecho resulta en la pérdida del eje núcleo-centrosomal y una pérdida del control de las fuerzas de tracción durante la migración celular, lo que resulta en una velocidad de migración menor (Figura 5) (Tabla 1) y unas trayectorias celulares aleatorias (Figura 6). Por ello, la aplicación de la composición de la invención por depósito en la zona tras la exéresis del tumor, o en la periferia del tumor o en los bordes de una herida quirúrgica tras la extirpación del tumor, permite inhibir o disminuir significativamente la probabilidad de metástasis de las células del cáncer residuales en la zona.

Finalmente, en otro aspecto principal de la invención se contempla un procedimiento para la obtención de la composición de la invención que comprende los siguientes pasos:

- a) Lavado de las impurezas de los nanofilamentos con HCl,
- b) Reajuste del pH de los nanofilamentos obtenidos en a) mediante lavado con un buffer fosfato por centrifugación hasta alcanzar un pH fisiológico,
- c) Resuspensión de los nanofilamentos obtenidos en b) en una mezcla formada por suero procedente de sangre humana y un excipiente mediante agitación por vórtex,
- d) Dispersión de los nanofilamentos mediante la aplicación de ciclos de sonicación a la solución obtenida en c) y eliminación de los agregados micrométricos mediante la aplicación de centrifugación tras cada ciclo de sonicación a una velocidad comprendida entre 10.000-13.000 rpm, y
- e) Recogida de los nanofilamentos dispersados en d) libres de agregados micrométricos.

El paso d) puede repetirse las veces necesarias hasta que se considere óptima la resuspensión.

De forma preferida, la mezcla del paso c) está formada por el suero y solución salina en una relación 1:10-1:20.

Tras este tratamiento los nanofilamentos pueden permanecer en suspensión durante días, e incluso semanas. Para su re-uso se deben de incluir antibióticos en la solución. No obstante para su reutilización posterior conviene centrifugar de nuevo y eliminar los agregados.

EJEMPLOS

5 **Ejemplo 1**

Estudio del efecto anti-proliferativo de los NTC en células de cáncer humano.

10 Se emplearon nanofilamentos (NTC) comerciales (marca Nanocyl) de 3-12 paredes de grafeno de aproximadamente 4-12 nm de diámetro y longitudes diferentes (del orden de 1.5 μm) y de altísima pureza. Se lavaron con HCl 37% y se reajustó el pH mediante centrifugación a 13.000 r.p.m. con buffer fosfato hasta alcanzar un pH fisiológico. Para su resuspensión se añadió suero bovino en medio de cultivo celular a una concentración final de 1:10 (v/v) (10%). Los NTC se dispersaron mediante sonicación durante 2 min, frecuencia de 20 kHz, 130 W en un SONICS Vibracell VCX130 y posteriormente fueron sometidos a centrifugación a 13.000 rpm en una microfuga estándar para eliminar la impurezas y agregados de nanotubos no dispersos en suspensión (**figura 4, (A)** (tubo de la derecha) y (E)).

15 En la **figura 4A** se observa el color oscuro de las soluciones que contienen monofilamentos (en este caso nanotubos de carbono) caracterizados por su color negro (por el carbón de su composición). Se observa como estos al ser recubiertos con proteínas séricas presentan una gran estabilidad y excelente dispersión en el solvente.

20 Las diferentes líneas celulares objeto del estudio (HeLa, MCF7, SH-SY5Y, U87MG y GBM) fueron sometidas a una solución de 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de los NTC funcionalizados con el suero bovino como se indica más arriba. El tratamiento duró 70 horas. Tras el tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con 1% tritón X100 en PBS y se tiñeron con Hoechst 33342. Para determinar la fracción G0 (células apoptóticas) y el ciclo celular se realizó una citometría de flujo. El resultado de este estudio muestra como estas condiciones de exposición a los NTC muestran un claro efecto pro-apoptótico y anti-proliferativo (Figura 2) y confirma que el recubrimiento con proteínas séricas de los NTC favorece su internalización por las células produciendo un efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico en modelos celulares.

30 **Ejemplo 2**

Efecto inhibitorio de los NTC en la migración de diferentes modelos de células de cáncer humano.

Se emplearon nanofilamentos (NTC) preparados del mismo modo que en el ejemplo anterior. Las diferentes líneas celulares objeto del estudio (HeLa, MCF7, SH-SY5Y, U87MG y GBM) fueron sometidas una solución de 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de NTC funcionalizados con el suero bovino como se indica arriba. El tratamiento duró 70 horas.

35 El efecto anti-migratorio se determinó mediante observación de las células tratadas durante 5 horas en una estación de célula viva NikonTi. Se realizó una microscopía de time-lapse obteniéndose una imagen cada 15 minutos en la película para poder así realizar un rastreo celular (cell tracking) y determinar las velocidades medias indicadas en la tabla 1 y las trayectorias (algunas se muestran en la figura 6). Este estudio demuestra que el efecto del recubrimiento con proteínas séricas, favorece la internalización de los NTC por las células del cáncer y, tras la internalización, la interacción con los microtúbulos resultando en una clara inhibición de la migración celular en casi todos los modelos de cáncer humano testados (Tabla 1).

40 *Tabla 1. Efecto inhibitorio en la migración de los NTC en diferentes modelos de células de cáncer humano (DF = Grados de libertad; t = test t de Student y p= probabilidad). Velocidad en nm/s.*

Cell type	Control Velocidad media	MWCNT velocidad media	Disminución de la velocidad	de	DF	t/p	Nivel de significancia (%)
HeLa	12.7 ± 0.6	7.4 ± 0.4	41 %		245	7.2/<10 ⁻¹⁰	>99.99
MCF7	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	6 %		130	0.4/0.64	NS
SH-SY5Y	8.7 ± 0.7	6.8 ± 0.4	22 %		114	2.3/0.02	95-98
U87MG	8.5 ± 0.2	6.1 ± 0.2	28 %		249	7.1/<10 ⁻¹⁰	>99.99
GBM	9.2 ± 0.2	7.5 ± 0.1	18.5 %		408	6.5/<10 ⁻⁹	>99.99

Ejemplo 3

5 Efecto de NTC funcionalizados con suero humano en la proliferación y migración de células de melanoma humano.

Se llevó a cabo un ensayo para el estudio del efecto de los NTC funcionalizados del mismo modo que los anteriores pero comprobando si el efecto observado con suero bovino era similar al suero humano. En el ensayo se emplearon células SK-Mel-2, establecidas a partir de melanomas humanos primarios. Las células fueron sometidas a una solución de 0.25 µg/ml de NTC funcionalizados con suero bovino (como control de los resultados esperables) y suero humano de voluntarios informados. La resuspensión de los NTC y el tratamiento de las células se realizaron igual que se describe en los dos ejemplos anteriores. Para caracterizar el ciclo y muerte celular por apoptosis se realizó un estudio de citometría de flujo (**Figura 7**).

15 Este ejemplo muestra como el tratamiento con NTC funcionalizados con suero humano en células de melanoma maligno humano produce un efecto citotóxico superior en más de un 14,5% al control (células sin tratar con nanotubos y crecidas en el mismo suero empleado para funcionalizar los NTC). También se observa un claro efecto de bloqueo proliferativo con una clara disminución de las células en G2 (flecha blanca), lo que indica un bloqueo de las células en G1, es decir, una clara inhibición de la división celular.

20 Asimismo, se comprobó que los NTC funcionalizados con suero humano inhibían significativamente la migración de las células procedentes de melanomas humanos. El procedimiento de incubación y toma de datos se realizó como en los ejemplos anteriores.

En el histograma de la **Figura 8** se presentan las velocidades medias de las células anteriores (SK Mel-2). Se observó cómo las células de melanoma eran también sensibles al tratamiento con NTC funcionalizados con dos tipos diferentes de suero. En el primer caso (tipo 1) se empleó suero animal y en el segundo (tipo 2) suero humano. En ambos casos se apreció una caída significativa en la velocidad de migración.

25 En base a los resultados obtenidos en los ensayos realizados in vitro se puede concluir que los NTC funcionalizados con proteínas séricas procedentes de suero humano favorece la resuspensión y endocitosis de los NTC por células del melanoma maligno humano, ejerciendo un efecto antiproliferativo, propapoptótico y antimigratorio.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Composición que comprende nanofilamentos y al menos un excipiente para su empleo en el tratamiento antitumoral, donde los nanofilamentos están funcionalizados con suero procedente de sangre humana.
2. Composición según la reivindicación 1 donde el suero es del propio paciente.
3. Composición, según la reivindicación 1, donde los nanofilamentos presentan un diámetro externo comprendido entre 5 y 50 nm y una longitud comprendida entre 200 y 20.000 nm.
- 10
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los nanofilamentos son nanotubos de carbono.
5. Composición según la reivindicación 4 donde los nanotubos de carbono son multipared.
6. Composición, según la reivindicación 5 donde los nanotubos de carbono presentan de 3-12 paredes de grafeno.
- 15
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde la concentración de nanofilamentos está comprendida entre 0,1-100 µg/ml de excipiente.
8. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su empleo en el tratamiento antitumoral por vía tópica, parenteral o por depósito tras resección quirúrgica.
9. Composición, según la reivindicación 8, para su empleo en el tratamiento de tumores de la piel.
- 20
10. Composición, según las reivindicaciones 1-9 para su empleo en el tratamiento de tumores con riesgo de metástasis.
11. Procedimiento para la obtención de la composición de las reivindicaciones 1-10 que comprende los siguientes pasos:
- 25
- a) Lavado de los nanofilamentos con HCl,
- b) Reajuste del pH de los nanofilamentos obtenidos en a) mediante lavado con buffer fosfato por centrifugación hasta alcanzar un pH fisiológico,
- c) Resuspensión de los nanofilamentos obtenidos en b) en una mezcla formada por suero y un excipiente mediante agitación por vórtex,
- 30
- d) Dispersión de los nanofilamentos mediante la aplicación de ciclos de sonicación a la solución obtenida en c) y eliminación de agregados micrométricos mediante la aplicación de centrifugación tras cada ciclo de sonicación a una velocidad comprendida entre 10.000-13.000 r.p.m, y
- e) Recogida de los nanofilamentos dispersados en d) libres de agregados micrométricos.
12. Procedimiento según la reivindicación 11 donde la mezcla del paso c) está formada por el suero y solución salina en una relación 1:10-1:20.
- 35

40

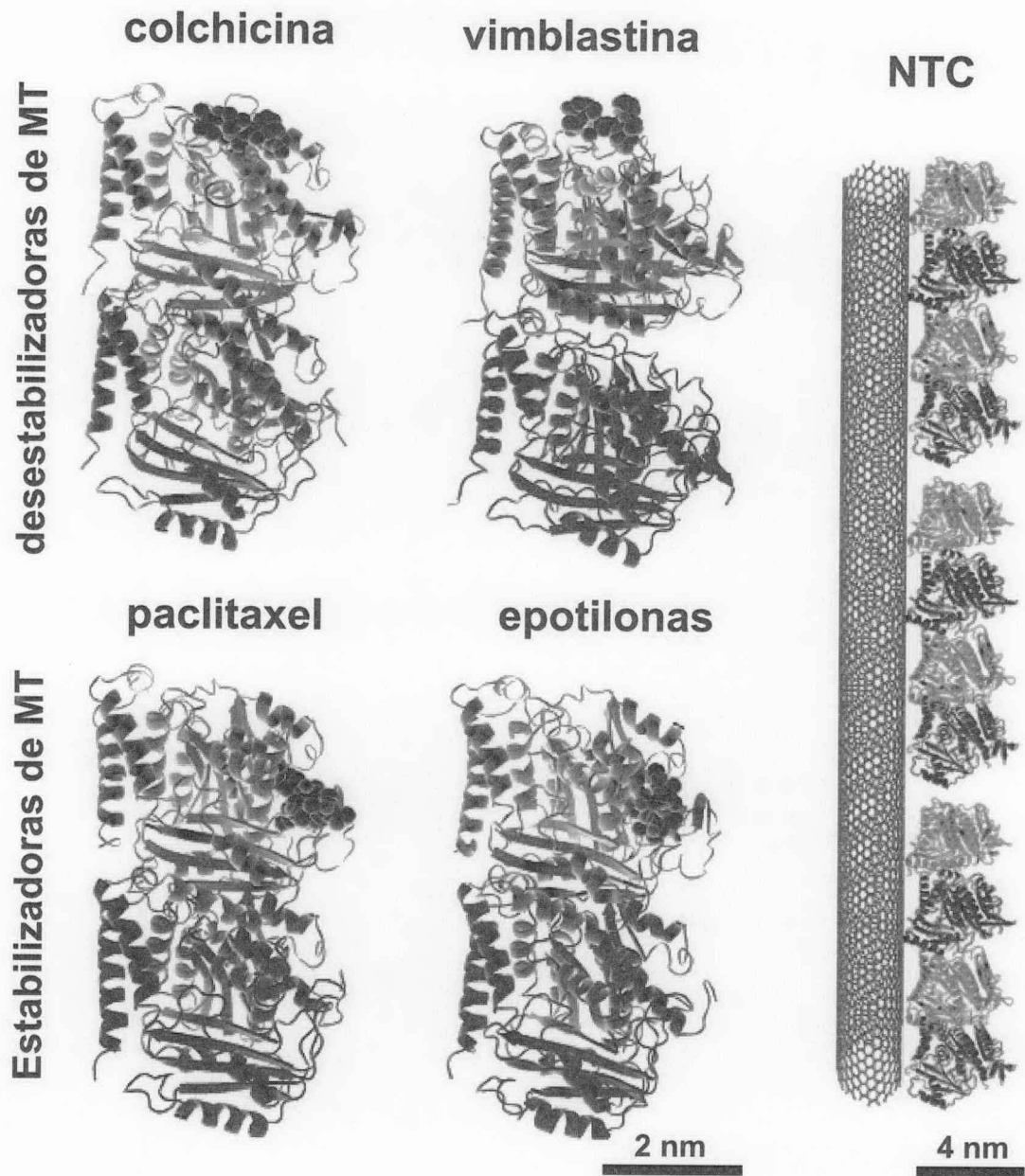


FIG. 1

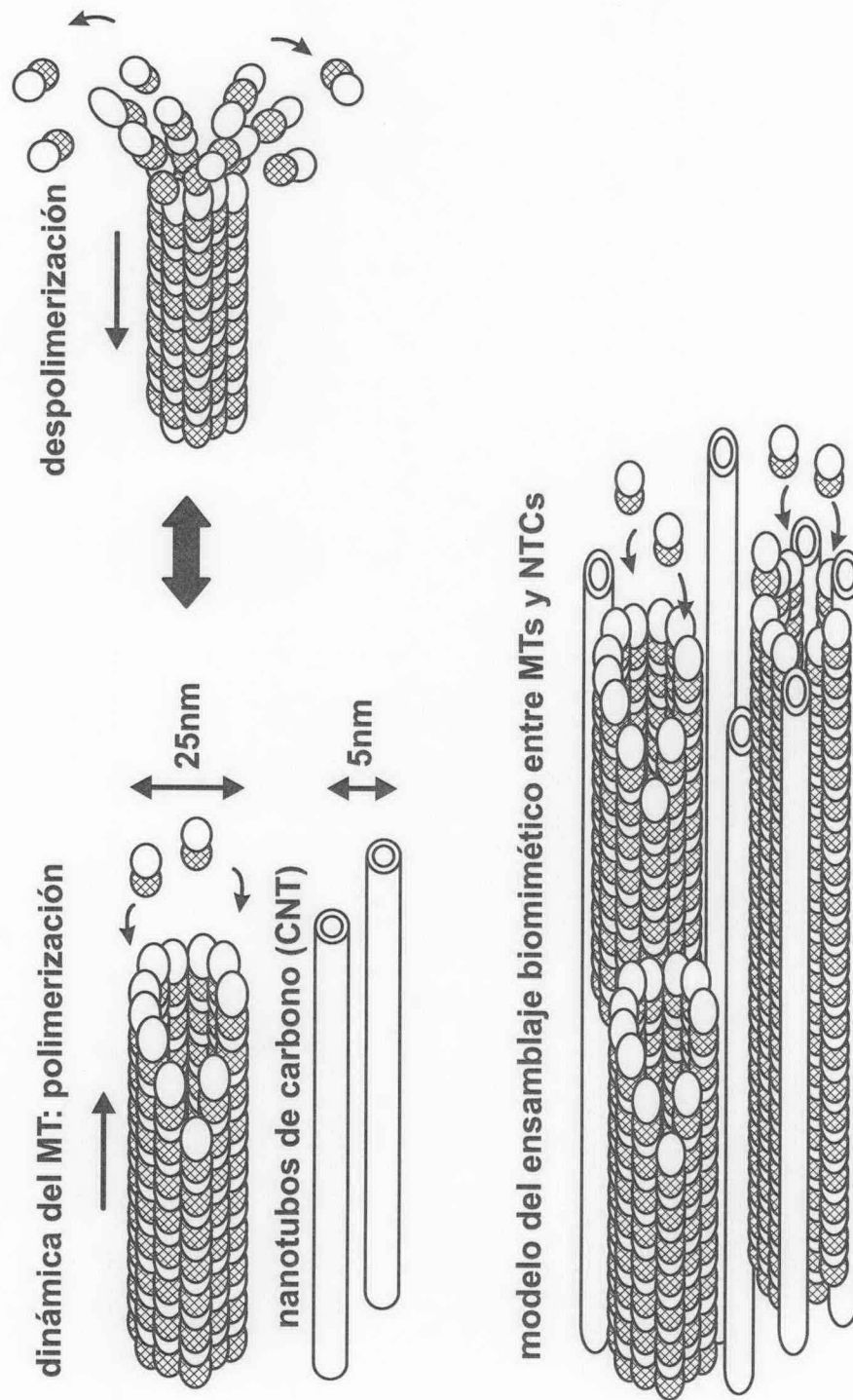


FIG. 2

ADN-Microtúbulos

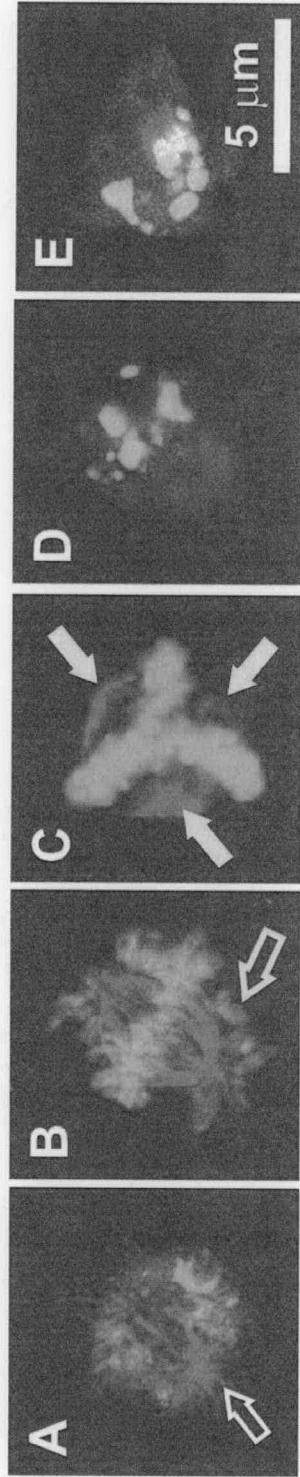


FIG. 3

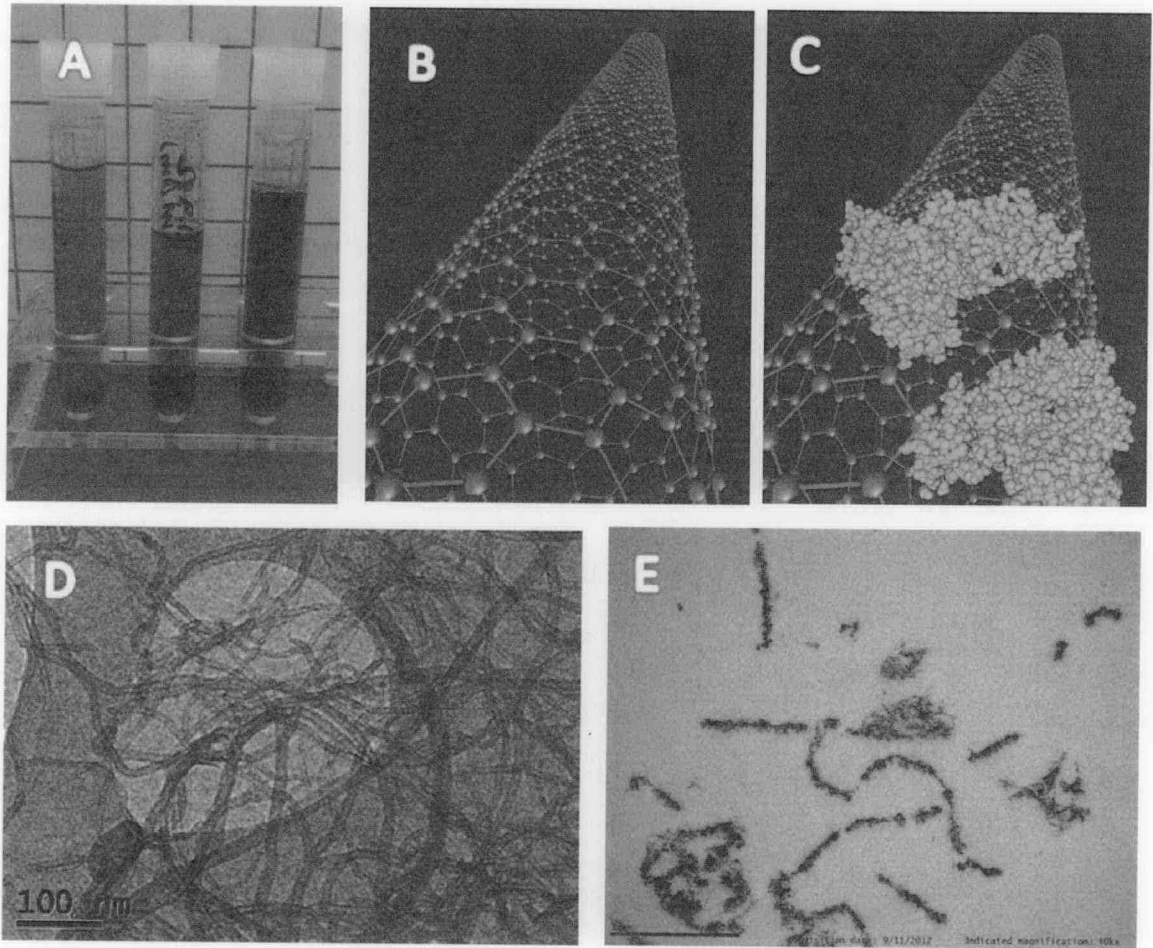
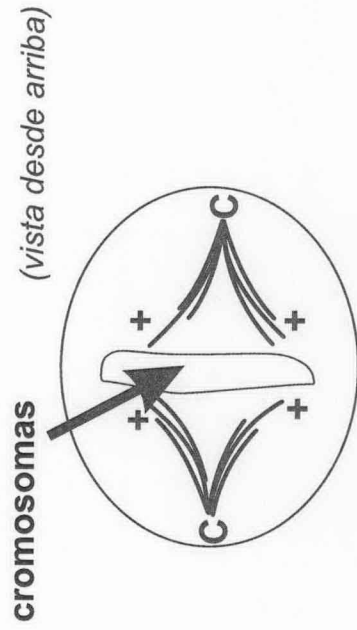
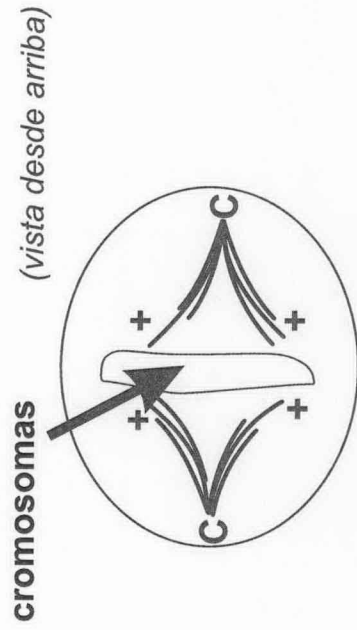


FIG. 4



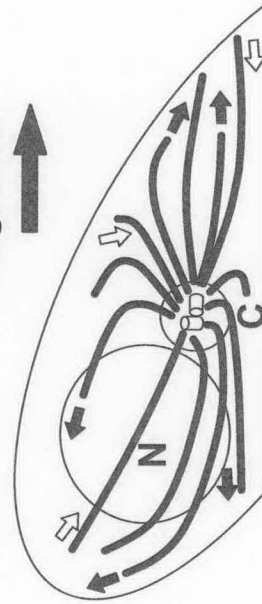
Célula en interfase



Célula en metafase

Célula control (no tratada)

migración



Célula tratada con NTC 70h

(vista lateral)

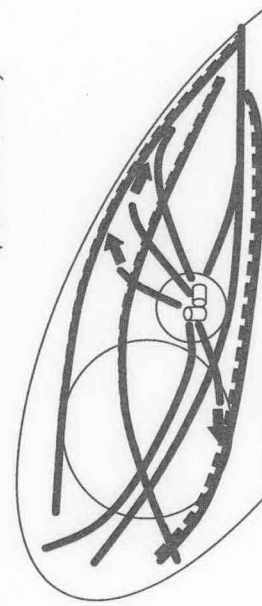


FIG. 5

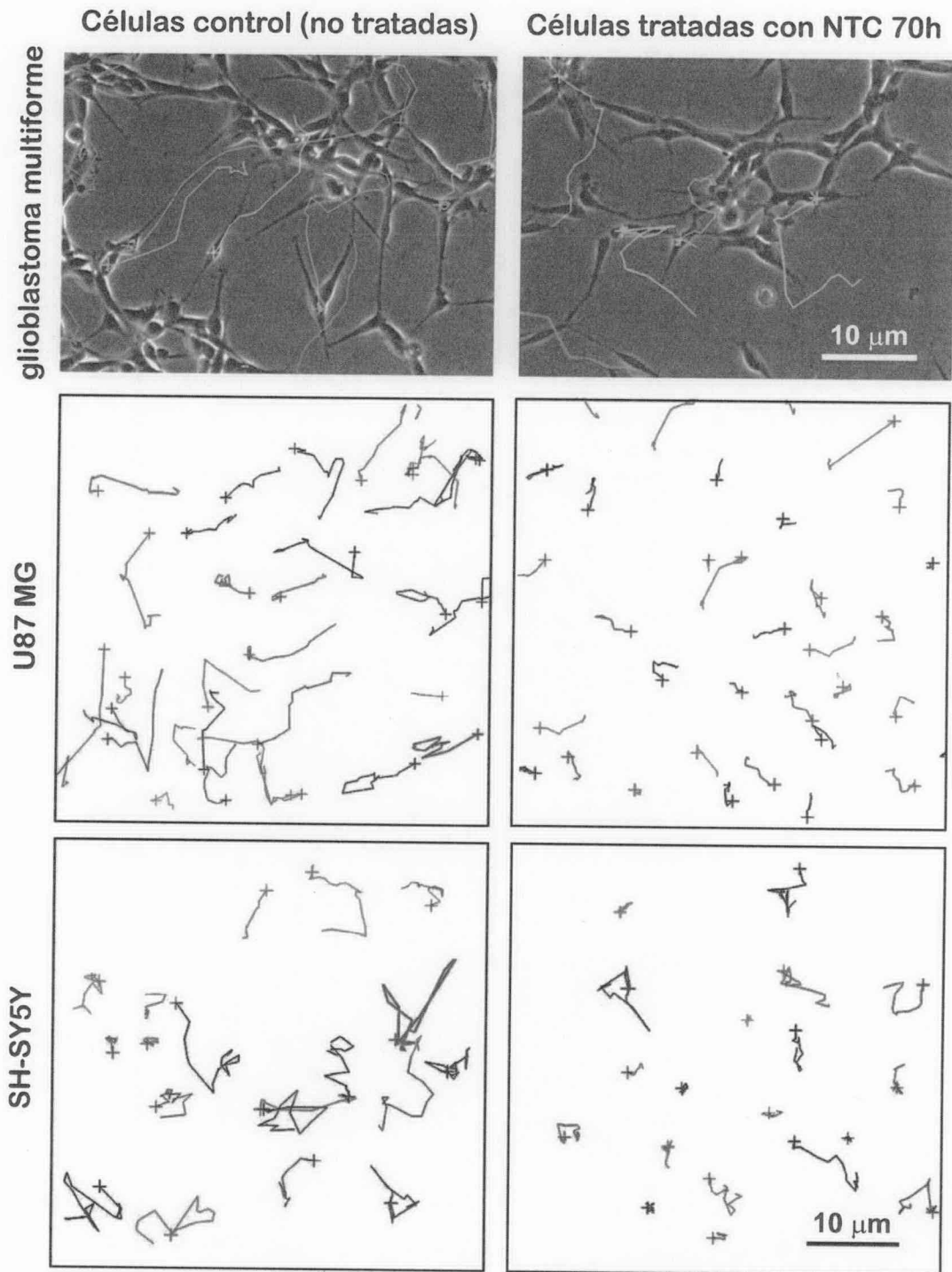


FIG. 6

Efecto pro-apotótico y antiproliferativo en células de melanoma humano

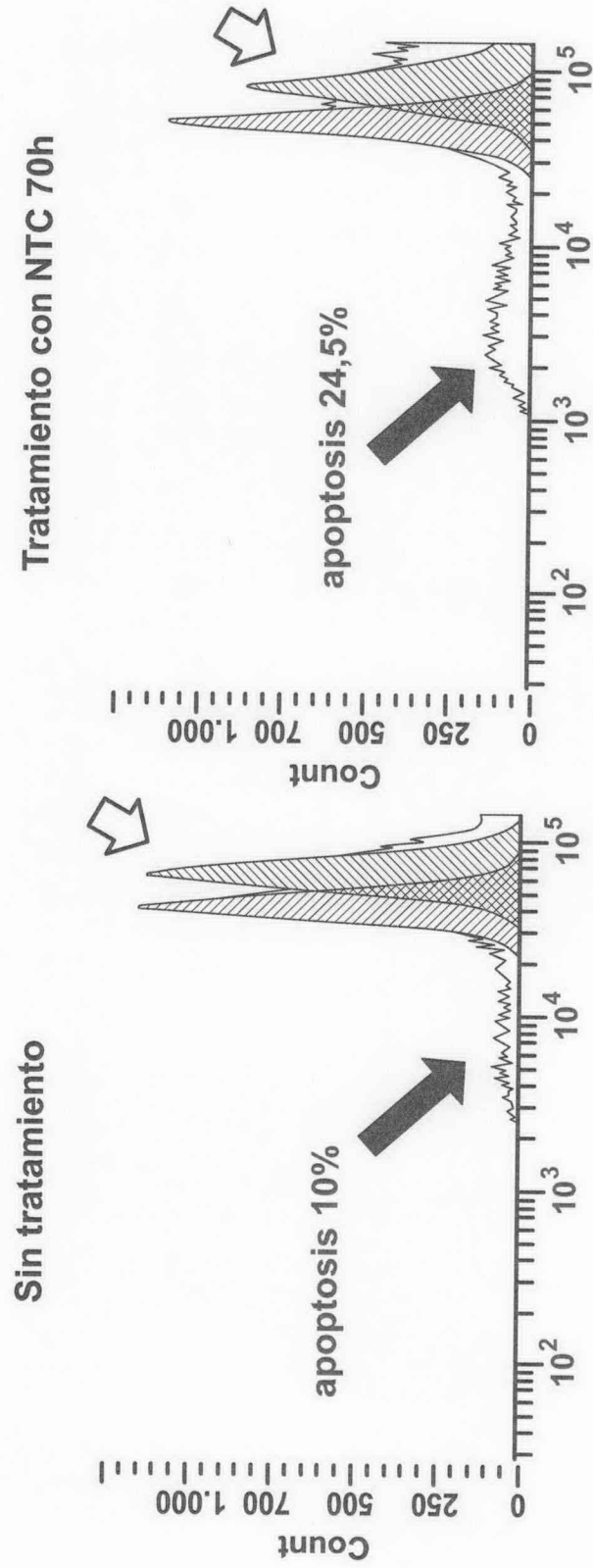


FIG. 7

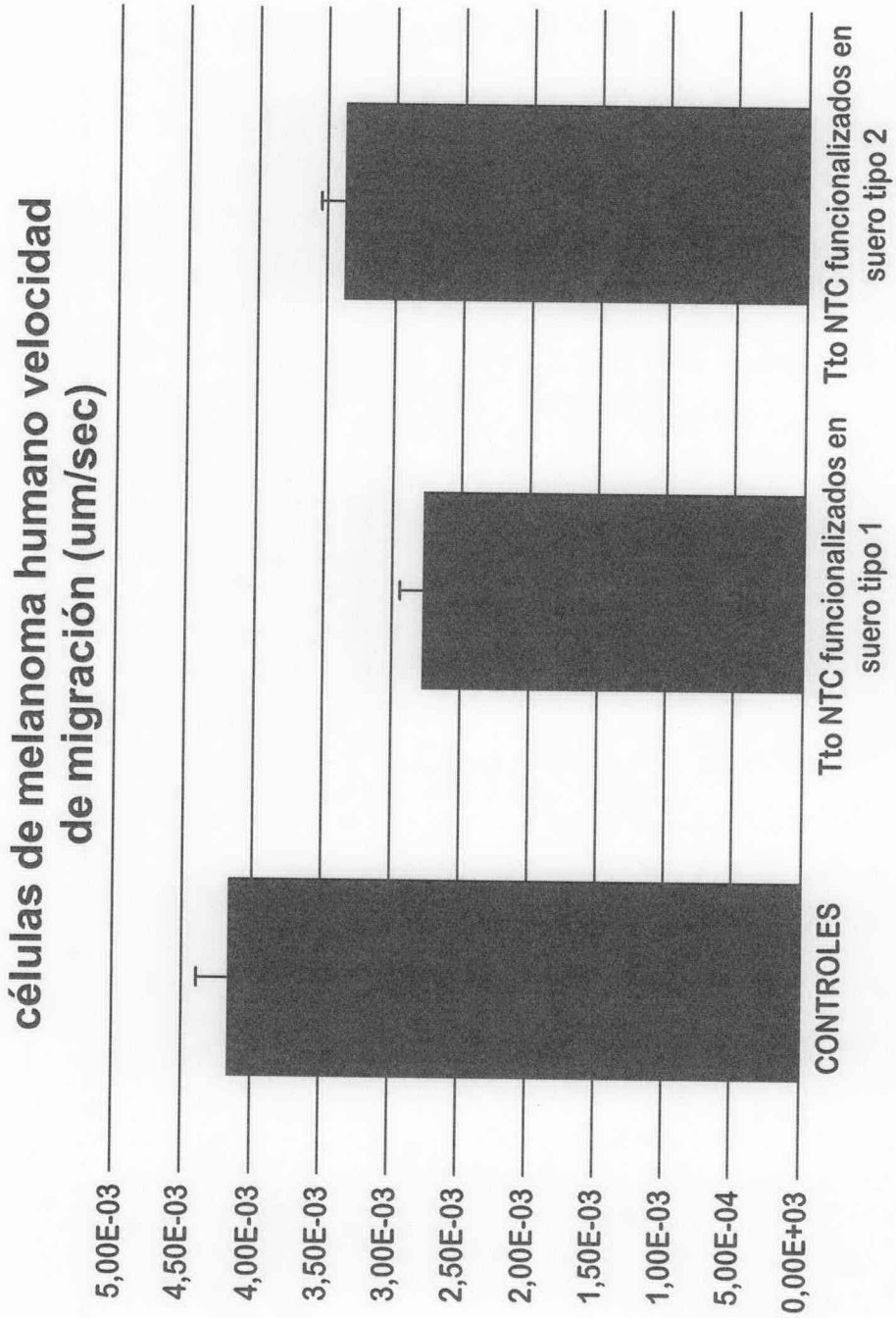


FIG. 8



②① N.º solicitud: 201400254

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.03.2014

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	IANCU, C. et al. "Enhanced laser thermal ablation for the in vitro treatment of liver cancer by specific delivery of multiwalled carbon nanotubes functionalized with human serum albumin". International Journal of Nanomedicine 2011, Volumen 6, páginas 129-141. Ver página 129, resumen; página 139, conclusión.	1-12
A	MOCAN, L. et al. "Selective ex-vivo photothermal ablation of human pancreatic cancer with albumin functionalized multiwalled carbon nanotubes". International Journal of Nanomedicine 2011, Volumen 6, páginas 915-928. Ver página 129, resumen; página 139, conclusión.	1-12
A	US 20130183354 A1 (HARRISON, R.G. et al.) 18.07.2013, párrafos [0058],[0094]-[0096],[0297].	1-12
A	HEISTER, E. et al. "Higher Dispersion Efficacy of Functionalized Carbon Nanotubes in Chemical and Biological Environments". ACS NANO 2010, Volumen 4, Número 5, páginas 2615-2626. [Disponible en línea el 09.04.2010]. Ver página 2615, resumen.	1-12
A	VILLEGAS, J.C. et al. "Multiwalled Carbon Nanotubes Hinder Microglia Function Interfering with Cell Migration and Phagocytosis". Advanced Healthcare Materials 2013, Volumen 3, Número 3, páginas 424-432. [Disponible en línea el 15.08.2013]. Ver página 1, resumen; página 2, apartado 2.1.	1-12
A	KIRKPATRICK, D.L. et al. "Carbon Nanotubes: Solution for the Therapeutic Delivery of siRNA?". Materials 2012, Volumen 65, páginas 278-301. [Publicado el 13.02.2012]. Ver página 278, resumen; página 279, introducción.	1-12
A	RYBAK-SMITH, M.J. "Complement activation by carbon nanotubes". Advanced Drug Delivery Reviews 2011, Volumen 63, páginas 1031-1041. [Disponible en línea el 12.06.2011]. Ver página 1031, resumen; página 1036, párrafos 1-2.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
14.07.2014

Examinador
G. Esteban García

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/14 (2006.01)

A61K33/44 (2006.01)

A61K35/16 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P35/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC,WPI,TXTE,HCAPLUS,BIOSIS,MEDLINE,NPL,XPESP,XPESP2,EMBASE,PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.07.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	IANCU, C. et al. International Journal of Nanomedicine 2011, Vol. 6, pp. 129-141.	2011
D02	MOCAN, L. et al. International Journal of Nanomedicine 2011, Vol. 6, pp. 915-928	2011
D03	US 20130183354 A1 (HARRISON, R.G. et al.)	18.07.2013
D04	HEISTER, E. et al. ACS NANO 2010, Vol. 4, Nº 5, pp. 2615-2626	09.04.2010
D05	VILLEGAS, J.C. et al. Advanced Healthcare Materials 2013, Vol. 3, Nº 3, pp. 424-432	15.08.2013

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es una composición que comprende nanofilamentos funcionalizados con suero procedente de sangre humana para su empleo en el tratamiento antitumoral y un procedimiento para la obtención de la misma.

El documento D01 divulga un sistema transportador o carrier para nanotubos de carbono multipared (MWCNT), que se unen a albúmina de suero humano (HSA), y su uso para el tratamiento del carcinoma hepatocelular humano, ya que el conjunto HSA-MWCNT favorece la ablación térmica de las células HepG2 (línea celular del carcinoma de hígado hepatocelular humano), presentando eficacia terapéutica selectiva respecto a los hepatocitos normales (ver página 129, resumen). Los ensayos demuestran que los nanotubos de carbono funcionalizados con albúmina de suero humano se unen selectivamente al receptor albodina (aka Gp60) localizado en la membrana de las células HepG2, seguido de la absorción a través de un proceso de endocitosis dependiente de cavolina (página 139, conclusión).

Del mismo modo, el documento D02 divulga un método de ablación mediada por láser de células cancerígenas marcadas con nanotubos de carbono funcionalizados (nanofototermolisis). Así, se describe el uso de nanotubos de carbono multipared (MWCNT) funcionalizados con albúmina de suero humano (HSA) para la nanofototermolisis selectiva de células pancreáticas cancerígenas. La irradiación externa con láser de muestras extraídas quirúrgicamente de pacientes con cáncer de páncreas, después de haber administrado intra-arterialmente HSA-MWCNT, provoca la necrosis extensiva del tejido maligno, sin que haya efectos dañinos para la parénquima sana que lo rodea (ver página 915, resumen).

El documento D03 divulga una composición útil para la detección y destrucción de tumores o células cancerosas que comprende una proteína o péptido ligante, que puede ser anexina V, unido o asociado fisiológicamente a un nanotubo de carbono, que puede ser de pared sencilla, doble o múltiple (párrafo [0058]), que puede contener además una entidad macromolecular sustancialmente inerte, como puede ser albúmina de suero humano (ver párrafo [0297]). El documento divulga también diversos procedimientos de obtención de los complejos nanotubos-proteína, basados en diálisis, adsorción por desplazamiento o sonicación (ver párrafos [0094]-[0096]).

La diferencia existente entre la composición de la invención y las composiciones divulgadas en los documentos D01-D03 es que los nanotubos de éstas comprenden albúmina de suero humano, mientras que en la composición de la invención la funcionalización se realiza con suero procedente de sangre humana, en concreto, del propio paciente.

La sustitución de albúmina por suero de sangre humana del propio paciente presenta un efecto técnico asociado, como es la dispersión total de los nanofilamentos de forma individualizada, evitando reacciones inmunológicas no deseadas. Además, se considera que el experto en la materia no sería capaz de llegar a la composición de la invención sin el desarrollo de la experimentación adecuada, por lo que dicha composición, además de ser nuevo, posee actividad inventiva.

El documento D04 divulga un estudio sobre la estabilidad de nanotubos de carbono funcionalizados en diferentes medios *in vivo* e *in vitro*, que incluye el análisis de la dispersión de nanotubos oxidados en fluidos biológicos, como medios de cultivo celular y plasma humano, y su toxicidad hacia células cancerígenas. De este estudio se desprende que la funcionalización de los nanotubos influye en la capacidad de dispersión y biocompatibilidad de los mismos (ver página 2615, resumen).

El documento D05 divulga el uso de nanotubos de carbono multipared (MWCNTs) para la terapia del cáncer de cerebro, debido a su capacidad para atravesar las barreras celulares y a su habilidad intrínseca para bloquear la proliferación de las células cancerosas promoviendo la apoptosis de las mismas (ver página 1, resumen). Dentro de este estudio se divulgan dispersiones estables de MWCNTs en suero de caballo, que contiene proteínas y lípidos que interaccionan con la superficie de los nanotubos y evitan la agregación o precipitación de éstos durante los experimentos (ver página 2, apartado 2.1).

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, divulga ni contiene sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia una composición que comprende nanofilamentos funcionalizados con suero procedente de sangre humana (reivindicación 1) y, por tanto, tampoco hacia un procedimiento para la obtención de la misma (reivindicación 11).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-12** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.