(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 006 940**

(51) Int. CI.:

A61K 31/4172 (2006.01)
A61P 17/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2017 PCT/DK2017/050201**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017 WO17215723**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2017 E 17812796 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024 EP 3471720**

(54) Título: **Formulación para usarse en el tratamiento de prurito urémico**

(30) Prioridad:

17.06.2016 DK 201670438
28.03.2017 DK 201770225

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2025

(73) Titular/es:

DRUG DELIVERY SOLUTIONS APS (100.00%)
Agern Alle 24-26
2970 Hoersholm, DK

(72) Inventor/es:

MENNE, TORKIL;
SELMER, JOHAN;
LANGE, JESPER;
GEORGIOU, MICHELLE;
WHEELER, DEREK y
EVANS, DAVID

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Formulación para usarse en el tratamiento de prurito urémico

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a una formulación tópica que comprende un compuesto nucleófilo, tal como histidina o cualquier otro aminoácido o polipéptido y/o un derivado de la misma, para usarse en el tratamiento de la piel seca con comezón provocada por urea en el prurito urémico, de un sujeto. La presente invención también se refiere a una composición tópica para usarse en la prevención de prurito urémico.

Antecedentes de la invención

El prurito urémico es uno de los síntomas más angustiantes de la insuficiencia renal. Afecta hasta el 50% de los pacientes en diálisis (I). La piel de los pacientes urémicos a menudo es pálida, debido a la anemia, seca y con marcas de arañazos. La condición puede incluir síntomas de la piel tal como eccema, prurigo nodular, eccema numular y licinificación. Los síntomas subjetivos incluyen comezón y ardor intensos que pueden ser localizados o generalizados. Ha habido muchas hipótesis para la etiología de la condición que han conducido a una serie de tratamientos sistémicos y tópicos. En general, estos tratamientos tienen poco o ningún efecto, aunque algunos pueden ayudar en subgrupos de pacientes (I).

Los cambios metabólicos y endocrinos en pacientes dializados urémicos son muchos y complejos (2). La acumulación de urea en el cuerpo es uno de los cambios metabólicos centrales en la enfermedad renal crónica. La urea se excreta tanto mediante el sistema renal como a través del sudor (3). La concentración en el sudor es de 2 a 4 veces mayor que la concentración en suero. Esto implica que pueden estar presentes altas concentraciones de urea en la piel en pacientes urémicos (4). A veces la concentración es tan grande que la urea es visible como escarcha urémica.

El estrato córneo, la parte externa de la piel, está compuesta por capas de epitelios queratinizados, en forma de corneocitos enriquecidos con proteínas, incrustados en una matriz intercelular de lípido compuesta por ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres y mezclados con factores hidratantes naturales (NMF) (5) (6). El cincuenta por ciento del NMF se compone de aminoácidos que resultan de la descomposición enzimática de las proteínas epidérmicas, particularmente la filagrina (6), y su aminoácido fundamental productos de degradación que incluyen histidina, ácido trans-urocánico y ácido pirrolidona carboxílico (7). La parte restante del NMF consta de componentes del sudor que incluyen electrolitos, ácido láctico, urea y, en menor medida, aminoácidos. Además de tener un efecto hidratante (unión al agua), los aminoácidos representan parte de la protección UV natural (ácido transurocánico) y funcionan como un factor estabilizador de pH.

Las personas con mutaciones de truncamiento en el gen que codifica para la filagrina están fuertemente predispuestas a una forma grave de piel seca, ictiosis vulgar, y/o eccema. Se ha demostrado que casi el 50% de todos los casos graves de eccema pueden tener al menos un gen de filagrina mutado. El defecto de barrera observado en los portadores nulos de filagrina también parece conducir a una susceptibilidad y exacerbaciones incrementadas de asma.

La urea se ha utilizado durante mucho tiempo por su capacidad para desnaturalizar proteínas tanto en la investigación bioquímica como en procesos industriales (8). La acción desnaturalizante de la urea sobre las proteínas globulares es debida a la estabilización de la forma desplegada de la molécula de proteína. La urea también tiene un efecto directo dependiente de la concentración de aminoácidos a temperatura ambiente (8). Pequeñas cantidades de cianato que estarán presentes en la urea acuosa se pueden adicionar a los grupos -NH2 de proteínas y aminoácidos, así como a los grupos -SH presentes para producir derivados de carbamilo (9). Se ha demostrado que el logaritmo de la constante de tasa para la reacción entre cianato y aminoácidos están relacionados linealmente con el valor de PKa de los grupos amino de los aminoácidos o polipéptidos (15).

Por lo tanto, se espera que la alta concentración de urea en el estrato córneo en el paciente urémico (urea proveniente del sudor) tenga un profundo impacto en los procesos biológicos enzimáticos en la epidermis y el estrato córneo. Estos efectos no se han investigado como un factor etiológico para el prurito urémico ni se han visto como una nueva vía para el tratamiento de la condición. Se espera que los efectos desnaturalizantes de la urea, en las concentraciones presentes en pacientes urémicos, tengan un efecto profundo en la formación del NMF. Se debe esperar que la desnaturalización de las proteínas (particularmente la filagrina) disminuya los aminoácidos derivados de filagrina que constituyen la mayoría del NMF en el estrato córneo. Además, cualquier histidina disponible no se transformará en ácido trans-urocánico debido a que la enzima necesaria (histidinasa) también se puede desnaturalizar por la alta concentración de urea en la piel de los pacientes urémicos. La histidina en sí misma se cambiará por la acción directa de la urea sobre la molécula. Estas perturbaciones, que se espera que afecten significativamente la cantidad y calidad del NMF, no se han investigado previamente debido a que el conocimiento y la dinámica de la formación y los efectos biológicos del NMF son nuevos.

Con respecto a la técnica anterior, US2016/0008297 divulga una formulación tópica para usarse en el tratamiento o prevención de piel con comezón asociada con enfermedades renales. No hay divulgación de un ataque nucleófilo para secuestrar urea, y los aminoácidos utilizados en la formulación no se incluyen para actuar como nucleófilos.

US20150252035 menciona el tratamiento de la comezón asociada con el prurito urémico entre varios otros trastornos de la piel, pero los inhibidores de TRPV4 divulgados no pueden secuestrar urea al actuar como nucleófilos.

US2009/0186853 describe un derivado de histidina y derivados de N-propanilo de aminoácidos que pueden tratar el prurito. Sin embargo, no hay divulgación de tratamiento de la piel seca con comezón provocada por el secuestro de urea con un nucleófilo. Por el contrario, US2009/0186853 menciona que se puede incluir urea en las formulaciones.

US2011/217277 divulga composiciones que comprenden lodo de mar muerto para usarse en el tratamiento de prurito urémico.

WO2016/086280 se refiere a composiciones dermatológicas que comprenden polihexanida (PHMB) y tratamiento de enfermedades de la piel seleccionadas de psoriasis y dermatitis, y dermatitis atópica y dermatitis alérgica asociada con incontinencia tal como erupción por pañal.

Sumario de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones. Las referencias a métodos de tratamiento en la breve descripción y la descripción detallada de la invención en esta descripción se deben interpretar como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para usarse en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) por terapia (o para diagnóstico).

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una formulación que comprende un compuesto nucleófilo, que comprende aminoácidos o polipéptidos que tienen un bajo PKa de grupo amino para usarse en el tratamiento del prurito urémico. Sin limitarse por ninguna teoría, los presentes inventores han encontrado que los efectos no deseados del exceso de urea que se acumula en la piel de pacientes con prurito urémico se pueden contrarrestar por la presencia de compuestos nucleófilos, tal como aminoácidos o polipéptidos nucleófilos tal como histidina, cisteína, arginina, lisina, glicilglicina, glicilalanina o tri- o tetra-glicina.

De acuerdo con la química analítica realizada por los inventores, parece que estos nucleófilos reaccionan con el cianato derivado de urea y producen productos finales carbamilados y amoníaco. Los aminoácidos nucleófilos restantes que no reaccionan, y especialmente la histidina, ejercen los efectos cutáneos beneficiosos conocidos de estos aminoácidos, por lo que la piel de los pacientes con prurito urémico vuelve a un estado normal sin manchas de comezón. Para obtener más detalles sobre cómo se carbamilan los péptidos y las proteínas, se hace referencia al artículo escrito por G.R. Stark (15).

De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un método para tratar el prurito urémico, método que comprende administrar a este sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto nucleófilo, tal como un aminoácido nucleófilo, preferiblemente histidina.

Una divulgación de la presente invención comprende además el tratamiento de condiciones cutáneas adicionales provocadas por la presencia de urea u orina, que incluyen, pero no se limita a, dermatitis por urostomía, dermatitis por incontinencia, y dermatitis por pañal, por un método que comprende administrar a este sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto nucleófilo, tal como aminoácidos nucleófilos o polipéptidos nucleófilos.

Específicamente, se proporciona una formulación tópica que comprende histidina para usarse en el tratamiento o prevención del prurito urémico de un sujeto, en donde la formulación se aplica a la piel con una concentración de aminoácidos o polipéptidos y/o un derivado de los mismos que varía entre 0,001 mg/cm^2 y 5 mg/cm^2 de superficie de la piel, preferentemente entre 0,003 mg/cm^2 y 1 mg/cm^2 de superficie de la piel, más preferiblemente 0,005 mg/cm^2 y 0,5 mg/cm^2 de superficie de la piel.

Preferentemente, el derivado se selecciona de aminoácidos o polipéptidos y/o un derivado de los mismos que tiene un bajo PKa, uno o más productos de degradación de histidina, tal como ácido trans-urocánico, un péptido de histidina o un péptido de histidina y uno o más aminoácidos adicionales, y una sal farmacéuticamente aceptable de histidina. Se prefiere que la histidina sea L-histidina.

En una realización, la histidina es el único ingrediente activo en la composición farmacéutica.

En otra realización, la formulación comprende además ácido pirrolidoncarboxílico o una sal del mismo, preferentemente la sal de sodio.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un diagrama de las alteraciones bioquímicas asociadas con el prurito urémico.

La figura 2 muestra el examen histológico de muestras de epidermis humana reconstruida expuestas a urea.

La figura 3 muestra el examen histológico de muestras de epidermis humana reconstruida expuestas a urea.

La figura 4 muestra exámenes histológicos de muestras de epidermis humana reconstruida expuestas a urea y una crema aplicada por vía tópica que contiene 2% de aminoácidos.

Descripción detallada de la invención

Como se indica, la presente invención proporciona un método terapéutico para tratar el prurito urémico.

Específicamente, la invención proporciona un método para tratar el prurito urémico de un sujeto, en donde una formulación tópica que comprende histidina y/o un derivado de la misma, tal como ácido trans-urocánico (UCA), se aplica a la piel con una concentración de histidina y/o un derivado de la misma que varía entre 0,001 mg/cm^2 y 5 mg/cm^2 de superficie de la piel, preferentemente entre 0,003 mg/cm^2 y 1 mg/cm^2 de superficie de la piel, más preferentemente 0,005 mg/cm^2 y 0,5 mg/cm^2 de superficie de la piel. Los aminoácidos o polipéptidos pueden ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica. De manera alternativa, la formulación comprende activos adicionales, tal como ácido pirrolidoncarboxílico.

El prurito urémico es una indicación bien definida, que se puede distinguir claramente de las enfermedades inflamatorias de la piel (particularmente una enfermedad inflamatoria crónica de la piel), tal como la dermatitis atópica, todos los tipos de psoriasis (incluyendo placa flexural, guttata, pustulosa, uña, fotosensible, psoriasis eritrodérmica y artritis psoriásica), acné, ictiosis, dermatitis de contacto, eccema, fotodermatosis y trastornos de la piel seca.

La función de barrera de la piel está controlada por muchos factores, incluidas las proteínas presentes y el entorno en el que residen (por ejemplo, el pH). Los inventores se han dado cuenta de que la histidina no se transformará en ácido trans-urocánico debido a que la enzima necesaria (histidinasa) se puede desnaturalizar por la alta concentración de urea en la piel de los pacientes urémicos.

En la piel normal, muchas proteínas implicadas en la formación de barreras dependen del pH y sólo son activas en el entorno ácido creado por UCA de la epidermis/estrato córneo superior (10). Además de mantener esta homeostasis, el pH reducido del estrato córneo inhibe directamente la infección y el crecimiento microbiano (11). Se sabe que la filagrina defectuosa puede dar por resultado un contenido de aminoácidos reducido que incluye niveles reducidos de histidina en el estrato córneo, que a su vez puede conducir a niveles reducidos de trans-UCA y un pH anormalmente alto. Se cree que un pH más alto que el óptimo en el estrato córneo reduce las enzimas de procesamiento de lípidos dependientes del pH (por ejemplo, ß-glucocerebrosidasa) y compromete la función de barrera y la reparación (12). Sin embargo, la presente investigación no se ocupa de resolver la causa fisiológica de los pacientes con filagrina defectuosa que padecen de trastornos de la piel. En cambio, los inventores han descubierto que el uso de aminoácidos que incluyen histidina o polipéptidos como el ingrediente activo en el uso de la presente invención parece compensar la filagrina defectuosa provocada por la alta concentración de urea en la piel de pacientes con prurito urémico. Actualmente no existe ningún medio para prevenir y/o tratar el prurito urémico.

Además, los aminoácidos que incluyen histidina y la mayoría de los polipéptidos exhiben baja o ninguna toxicidad en mamíferos o efectos secundarios reportados a dosis convencionales. Por consiguiente, el uso de aminoácidos que incluyen histidina y polipéptidos como el ingrediente activo proporciona ventajas en el uso, incluyendo un fácil acceso a los pacientes, una mejora en el cumplimiento del paciente que da por resultado un uso incrementado de los ingredientes activos en amplias poblaciones de pacientes y regímenes de tratamiento ininterrumpidos más largos en comparación a los medicamentos alternativos actualmente en uso. Además, se espera que los aminoácidos, incluyendo la histidina y la mayoría de los polipéptidos, sean útiles en el tratamiento de toda la superficie corporal de los pacientes y que sean efectivos contra un amplio intervalo de trastornos de la piel (especialmente enfermedades inflamatorias de la piel). Preferentemente, estas enfermedades de la piel se provocan por la presencia de urea u orina, e incluyen pero no se limitan a dermatitis por urostomía, dermatitis por incontinencia, y dermatitis por pañal, y más preferentemente prurito urémico.

Como se muestra en la figura 1, el prurito urémico se provoca por un gran exceso de urea transportada a la superficie superior de la piel por los conductos sudoríparos. La nueva observación realizada por los presentes inventores es que la alta concentración de urea altera la función normal de las proteínas y los aminoácidos.

Además, la regulación de pH se ve afectada negativamente por la alta concentración de urea.

Los aminoácidos incluida la histidina y la mayoría de los polipéptidos se pueden utilizar como se describe en la presente en cualquier forma adecuada, por ejemplo, como se analiza en la presente.

Los aminoácidos incluida la histidina y la mayoría de los polipéptidos se pueden utilizar como una terapia única o en combinación con una terapia convencional para la prevención y/o tratamiento de prurito urémico. Las terapias convencionales adecuadas incluyen el tratamiento con esteroides (por ejemplo, esteroides para administración tópica) y/o con lípidos adecuados y/o con fototerapia.

La presente divulgación proporciona además la formulación tópica (no reivindicada) descrita anteriormente para usarse en el tratamiento o prevención de prurito en piel envejecida de personas mayores. La divulgación también se refiere al uso (no reivindicado) de la formulación en el tratamiento o prevención de piel seca con comezón en pacientes con deficiencia de filagrina.

Las composiciones farmacéuticas para administración tópica de acuerdo con la presente invención pueden estar, por ejemplo, en la forma de soluciones, cremas, ungüentos, jaleas, geles, pulverizaciones, espumas, polvos, liposomas, o soluciones o suspensiones acuosas u oleosas. Las emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite o poliafrones (emulsiones internas altas, emulsiones de gel, etc.) también se abarcan por la presente invención. Los excipientes y portadores adecuados incluyen, por ejemplo, aceite de maní, agua, cocoato de etilo, cocoato de octilo, aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado, parafina líquida, isopropanol, glicerol, propilenglicol, parafina, celulosas, parabenos, alcohol estearílico, polietilenglicol, miristato de isopropilo y fenoxietanol.

En el caso de la aplicación tópica al cuero cabelludo, la composición farmacéutica se puede formular como un champú o acondicionador. En el caso de aplicación tópica a la piel, la composición farmacéutica se puede formular como un aditivo para productos de lavado y baño (por ejemplo, geles y cremas de baño o ducha). Estas composiciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir diluyentes o portadores que también son adecuados para usarse en cosméticos.

Las composiciones farmacéuticas para administración tópica por aplicación a la piel pueden incluir humectantes, y lociones y cremas bronceadoras.

Se puede proporcionar una composición farmacéutica para administración tópica en cualquier dispensador adecuado.

En el caso de composiciones farmacéuticas para administración tópica por aplicación a la piel, el diluyente o portador se debe seleccionar a fin de ayudar al transporte del ingrediente activo a través de la barrera cutánea y puede ser necesario que sea uno capaz de cruzar la capa queratinosa de la piel. Se conocen muchos métodos para la preparación de composiciones farmacéuticas para aplicación tópica. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede mezclar con materiales portadores conocidos como se analiza en la presente.

De manera alternativa, el experto apreciará que la administración tópica se puede lograr por medio de inyección localizada, por ejemplo, inyección intradérmica.

Habitualmente, las composiciones para administración tópica (tal como una crema) contendrán de aproximadamente 0,05% p/p a 15% p/p, más particularmente de aproximadamente 0,1 a 5% p/p, incluso más particularmente de aproximadamente 0,2 a 2% p/p en peso de la composición total de aminoácidos que incluyen histidina y polipéptidos y/o un derivado de los mismos como el ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden obtener por procedimientos convencionales usando diluyentes o portadores farmacéuticos convencionales, bien conocidos en la técnica.

Ejemplo 1

Una crema habitual para administración tópica puede contener:

Ingrediente	%
Versagel M200 (Aceite mineral (y) copolímero de etileno/propileno/estireno (y) copolímero de butileno/etileno/estireno)	8,58
Isoestearato de isoestearilo (ISIS)	12,87
Ciclometicona	4,29
Dimeticona 350cst	3,96
Glicerol	3,00
Laureth 4	0,30
2 Ácido pirrolidona 5 carboxílico (sal de Na)	0,50
Histidina	0,50

Carbómero (Ultrez 10)	0,80
Ácido cítrico	0,10
Fenoxietanol	1,00
Polisorbato 20	0,075
Hialuronato de sodio	0,05
Hidróxido de sodio (solución al 20%)	c.s (-0,70)
Agua	c.s. (-63,28)
	100,00

La crema se puede preparar como sigue. En un recipiente adecuado (A), combinar el Versagel, isoestearato de isoestearilo, ciclometicona y laureth 4 al 0,26% con una mezcla adecuada. En un segundo recipiente (B), combinar la dimeticona y laureth 4 al 0,04% con una mezcla adecuada. En un tercer recipiente (C) mezclar el polisorbato 20 con 7,425% de agua. Con mezcla moderada, adicionar lentamente primero el contenido del recipiente A y entonces el contenido del recipiente B en el recipiente C. En un cuarto recipiente (D), combinar el glicerol, ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico (sal de sodio), ácido cítrico, histidina, hialuronato de sodio, fenoxietanol y 41,55% de agua. En un quinto recipiente (E), combinar el carbómero y 13,50% de agua. Una vez completamente disperso e hidratado, adicionar con agitación el contenido del recipiente E en el recipiente C, entonces adicionar el contenido del recipiente D. Ajustar el pH (si se requiere) usando el hidróxido de sodio y entonces compensar a la cantidad con el agua restante.

Ejemplo 2

A fin de demostrar cómo se degrada la histidina en la presencia de urea (que es un constituyente inevitable de la piel en individuos que padecen de UP), la crema del ejemplo 1 se sometió a la exposición de 5% p/p y 10% p/p de urea. El proceso de degradación se siguió con el paso del tiempo y después de seis semanas a 40 °C sólo quedó un histidina al 20% en la crema que tenía un 10% p/p de urea.

Puesto que la histidina es un aminoácido esencial, se requiere un suministro continuo de la misma para mantener la función normal de la piel. Además, es importante debido a que este aminoácido es un precursor de UCA, que es un amortiguador importante para la regulación del pH en la piel. Con respecto al prurito urémico, la tasa de degradación de histidina es mucho más alta que en otros trastornos de la piel, tal como la dermatitis atópica. Por consiguiente, los inventores se han dado cuenta de que el suministro de histidina debe ser correspondientemente mayor para compensar la degradación, por lo que se pueden lograr niveles normales de histidina. Con esto en mente, los presentes inventores han formulado histidina en concentraciones tan altas (ver el ejemplo 1).

La función de barrera de la piel está controlada por muchos factores, incluyendo las proteínas presentes y el entorno en el que residen. La función de barrera cutánea deteriorada puede ser debido a una filagrina defectuosa. Además, la filagrina se descompone por proteinasas para liberar una gran cantidad de residuos de histidina constituyentes. A continuación, los residuos de histidina son desaminados por la histidasa para formar, entre otros, ácido trans-urocánico (trans-UCA).

Se cree que la presente invención aborda el problema de la filagrina defectuosa en pacientes que padecen de trastornos de la piel con comezón. La histidina compensa la filagrina defectuosa.

Ejemplo 3

Para investigar además la posible carbamilación en la piel humana en UP (prurito urémico), los inventores realizaron una serie de estudios en el modelo de epidermis humana reconstruida (RHE). Las muestras de piel grandes de 4 cm^2 se administraron de Episkin^{MR} en placas de 6 pocillos cada una con un volumen de 1 ml. Los experimentos se llevaron a cabo en muestras de piel de 18-25 días de edad. RHE es una tecnología estandarizada utilizada para investigar reacciones metabólicas, tóxicas e inflamatorias en la piel (13). Las muestras de piel se desarrollaron a partir de células madre epidérmicas humanas. Se desarrollaron en una red de policarbamato con un medio de crecimiento subyacente. La RHE contiene todas las diferentes capas de células en la epidermis, incluyendo el estrato córneo. Las muestras se mantienen a 37°C en una atmósfera de CO2 al 5%. Se manipulan en condiciones estériles. Diariamente se adiciona nuevo medio de crecimiento. Las muestras de piel grandes de 4 cm^2 estaban listas para usarse después de 18 días de desarrollo; un lapso de tiempo similar al recambio normal de la piel humana.

Se llevaron a cabo 12 experimentos individuales, incluidos 2 controles. Los medios de crecimiento (1 ml) se reemplazaron diariamente de acuerdo con el protocolo estándar. 6 de las muestras se recolectaron en el día 3 y 6 en el día 6 e inmediatamente se congelaron a menos 80 °C hasta el análisis de proteínas. Se enviaron partes de todas las muestras para su examen histológico.

Se realizaron las siguientes exposiciones (experimentos individuales), todas del lado de estrato córneo de la muestra de piel.

1. Controles: No se tratan.

2. Urea en una solución acuosa en la misma cantidad, calculada como mg/cm^2 de piel, como en UP. Esta cantidad calculada corresponde a 0,3 mg/cm^2, con base en el cálculo de la suma de los niveles en suero promedio de urea en pacientes urémicos, urea del sudor, y contribución del transporte activo de urea a las células en la epidermis. La adición de urea se realiza por la adición de 200 µl de una solución de 6 mg de urea/ml) a la superficie de las muestras de piel.

3. Como en el punto 2 anterior, pero en doble cantidad (0,6 mg/cm^2).

4. Como en el punto 3 anterior y se adicionaron 200 µl de una solución de histidina al 1%.

5. Crema de urea al 5% comercialmente disponible dosificada como uso humano previsto

6. Crema de urea al 10% comercialmente disponible dosificada como uso humano previsto

Las muestras de piel recolectadas en el día 3 se expusieron en el día 0 a 2-6 y en el día 1 a 2-4. (tabla 1)

Las muestras de piel se recolectaron en el día 6 y se expusieron como se indicó de manera anterior y posterior en el día 3 a 2-6. De acuerdo con la tabla 1, la solución acuosa de urea se absorbió inmediatamente a través de las muestras de piel. Las dos cremas dejaron un depósito en la parte superior de la piel y, por lo tanto, sólo se aplicaron dos veces; día 0 y día 3 (para el experimento de 6 días). Las exposiciones diarias se abstuvieron para minimizar el riesgo de infección. Por lo tanto, los dos métodos de aplicación diferentes no son directamente comparables, puesto que se debe anticipar una exposición continua a la urea a partir de los efectos de depósito de las cremas. Además, las concentraciones de urea de los experimentos 2, 3 y 4 recolectados el día 6 pueden haber sido relativamente bajas debido a sólo una exposición complementaria el día 3.

Las figuras 2 y 3 muestran las imágenes histológicas para los experimentos recolectados el día 3 y el día 6. En el día 3 se observan cambios significativos en los experimentos 2, 3, 5 y 6. Se observa edema grave y alteraciones en el estrato córneo y muerte celular prematura en el estrato espinoso. El experimento 1 (el control) y 4 son similares e idénticos al aspecto general de muestras de RHS no tratadas de 18 días de edad. Se ven cambios histológicos similares en los experimentos de 6 días. Es obvio que las muestras de piel son más viejas. En los experimentos 2 y 3, la piel se ha recuperado hasta cierto punto, probablemente reflejando la exposición limitada a la urea (sólo el día 3).

Los experimentos ilustran un probable efecto de urea dependiente de la dosis y el tiempo en las muestras de RHS. El edema pronunciado del estrato córneo refleja la capacidad de unión al agua de la urea. Pero la muerte celular también apunta a un efecto tóxico directo del ion cianuro liberado de la urea en una solución acuosa. Es notable que la histidina, un nucleófilo, pueda contrarrestar este efecto como se ilustra en el experimento 4 recolectado tanto el día 3 como el día 6.

El análisis de proteínas se realizó de acuerdo con un método desarrollado previamente (14). Las proteínas carbamoiladas de las muestras de piel se recubrieron en pocillos de ELISA y se cuantificaron usando un anticuerpo anti-homocitrulina policlonal primario y un anticuerpo de detección policlonal marcado secundario. Las lecturas de ELISA (unidades de absorbancia) se proporcionan en la Tabla 2.

Las proteínas de las muestras de piel se procesaron además en una SDS PAGE y se realizó una inmunotransferencia con un anticuerpo policlonal anti-homocitrulina. Los resultados de este experimento confirmaron que la proteína del experimento 6 dio por resultado una banda positiva que demuestra la presencia de proteína carbamoilada en esta muestra. La principal conclusión de estos experimentos es que la carbamilación de proteínas se puede demostrar en un modelo de RHE después de 3 y 6 días de exposición a urea en concentraciones comparables a la urea en pacientes con UP. Los experimentos ilustran el efecto del tiempo y la concentración. De acuerdo con la presente invención, la histidina es por lo tanto capaz de contrarrestar estos efectos.

Tabla 1

Día 3

Día	0	1	2	3
Medio de crecimiento	X	X	X	
Cremas de Urea	X			
Soluciones de Urea	X	X		
Recolección				X

Día 6

Día	0	1	2	3	4	5	6
Medio de crecimiento	X	X	X	X	X	X	
Cremas de Urea	X			X			
Soluciones de Urea	X	X		X			
Recolección							X

Tabla 2

	Día 3	Día 6
Controles	0,318	0,395
Cono de urea, como en UP (moderado) 6mg	0,377	0,368
Cono de urea, como en UP (alta) 12 mg	0,316	0,475
Cono de urea, como en UP (alta) 12 mg + histidina al 0,5%	0,312	0,321
crema de urea al 5%	0,452	0,557
crema de urea al 10%	0,423	0,606

Las lecturas de ELISA se presentan como unidades de absorbancia.

UP: prurito urémico

Ejemplo 4

Se utilizó el mismo método como se describe en el ejemplo 3. Los estudios fueron con base en el uso del modelo de Epidermis Reconstruida Humana (RHE) adquirido de Episkin^{MR}. Se realizaron tres experimentos por duplicado, incluyendo 2 controles. Los medios de crecimiento (1 ml) con y sin adiciones (ver más abajo) se reemplazaron diariamente de acuerdo con el protocolo estándar. En contraste al ejemplo 3, la exposición a urea se realizó por la adición de urea al medio de crecimiento. El experimento 1 corresponde a los dos controles; el experimento 2 fue con medio de crecimiento con 4 mg/ml de urea; el experimento 3 fue con medio de crecimiento con 4 mg/ml de urea y con la adición de 5 mg (500 µl) de crema con 2% de aminoácidos aplicados sobre la superficie de la piel el día 0 y el día 3. Las 6 muestras de piel se veían macroscópicamente sanas cuando se recolectaron después de 6 días. No hubo signos de infección o necrosis. Se congelaron inmediatamente a menos 80 °C hasta el análisis de proteínas. Se enviaron partes de todas las muestras para su examen histológico.

Cambios histológicos

Los cambios más pronunciados fueron edema, particularmente de las muestras de piel expuestas tanto a urea como a los dos aminoácidos porcentuales. Las células se cambiaron tanto en el experimento 2 como en el 3, pero había más células viables en las muestras de piel tratadas con 2% de aminoácidos.

Tabla 3

Las lecturas de ELISA se presentan como unidades de absorbancia. Promedio de dos experimentos.

Controles GM	0,53
GM + 4 mg de urea/ ml	0,68
GM + 4 mg de urea/ml con crema de aminoácidos al 2% en la parte superior aplicada el día 0 y el día 3	0,44

Carbamilación de proteína

La proteína carbamilada se investigó utilizando el mismo método que en el experimento 3. Los datos para la carbamilación de las proteínas totales de las muestras de piel se muestran en la tabla 3. El nivel más alto de carbamilación se encontró en dos muestras de piel incubadas con medio de crecimiento complementado con 4 mg/ml de urea. El nivel más bajo de carmamilación se encontró en las muestras de piel incubadas con medio de crecimiento complementado con urea 4 mg/ml y la crema de aminoácidos al 2%, pero el nivel de carbamilación de estas muestras de piel probablemente no fue estadístico diferente del observado en las muestras de control.

Resultado combinado de los ejemplos 3 y 4

En el ejemplo 3, las muestras de RHE se expusieron a condiciones de la vida real calculadas usando histidina como un ejemplo de un nucleófilo. Todas las exposiciones se realizaron en la parte superior de las muestras de piel. La carbamilación de proteínas se pudo demostrar en un período de 6 días después de la exposición a concentraciones de urea calculadas para estar presentes en pacientes en diálisis. La adición de histidina al 0,5 %, una concentración similar a la presente en NMF, previno esta carbamilación. Las muestras expuestas a las cremas comerciales que contenían 5% y 10% de urea desarrollaron hidratación (como se esperaba) del estrato córneo (figura 2 y 3) y el mayor grado de carbamilación de proteínas (tabla 2).

En el ejemplo 4, se probaron las concentraciones de exposición máximas tolerables, lo que es pertinente para el prurito urémico, así como para la dermatitis por pañal y la dermatitis por urostomía. La prueba se realizó en el sistema de RHE. Además, se probó una crema que contenía 3 nucleófilos (aminoácidos) en una concentración total de 2%. Se adicionó urea en una concentración 8 veces mayor que en el paciente de diálisis promedio.

La aplicación de la crema de aminoácidos al 2% provocó la hidratación esperada de las muestras de piel de RHE (figura 4). El análisis de proteínas mostró que la crema aplicada tópicamente fue capaz de prevenir la carbamilación de proteínas durante las exposiciones a concentraciones exageradas de urea (tabla 3).

Ejemplo 5

En lo siguiente se describe la preparación de formulaciones representativas (I-VII) abarcadas por la presente invención.

I) Fórmula de crema en emulsión de aceite en agua

Fase A	
Agua	c.s.
Histidina	0,50
Ácido cítrico (anhidro)	0,10
Citrato de sodio (dihidratado)	0,17
Fase B	
Metilparabeno	0,15
Glicerina	8,00
Fase C	
Aceite mineral	26,00
Petrolato	12,00
Cera de abejas	3,00
Estearato de sorbitán	3,00
Polisorbato 60	4,00
Propilparabeno	0,15
	100,00

Premezclar el calentamiento de fase A a 70 °C.

Adicionar la fase B a la fase A.

Calentar la fase C a 75°C.

Adicionar la fase C a la fase A usando una mezcla de alto esfuerzo cortante.

Enfriar con mezcla a 25°C.

II) Fórmula de crema en emulsión de agua en aceite

Fase A	
Palmitato de etilo y hexilo	20,0
Cera de abejas	3,00
Aceite de ricino hidrogenado Peg-7	1,00
Poligliceril-3-poliricinoleato	1,00

Fase B	
Sulfato de magnesio	1,00
Histidina	0,50
Ácido cítrico (anhidro)	0,10
Citrato de sodio (dihidratado)	0,17
Agua	73,23
	100,00

Método

Calentar las fases de aceite y agua por separado a 65-70

Adicionar la fase acuosa (B) a la fase oleosa (A) con agitación. Agitar para enfriar.

III) Fórmula de gel

Ingrediente	%
Glicerol	3,00
2 Ácido pirrolidona 5 carboxílico (sal de Na)	0,50
Histidina	0,50
Carbómero (Ultrez 10)	0,80
Ácido cítrico	0,10
Benzoato de sodio	0,20
Hialuronato de sodio	0,05
Hidróxido de sodio (solución al 20%)	c.s (a pH 5,5)
Agua	c.s.
	100,00

Método

En el primer recipiente (A) disolver el hialuronato de sodio en 50% del agua. Una vez disuelto adicionar el glicerol, ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico (sal sódica), ácido cítrico e histidina. En un segundo recipiente (B), dispersar con agitación adecuada el carbómero en 30% del agua. En un tercer recipiente (C) disolver el benzoato de sodio en 5% de agua. Adicionar los contenidos del recipiente A al recipiente B con agitación, entonces adicionar los contenidos del recipiente C. Ajustar el pH con hidróxido de sodio si es necesario y entonces adicionar c.s. de agua

IV) Fórmula de ungüento anhidro basado en PEG

Ácido oleico	5,00
Hidroxianisol butilado	0,10
PEG 4000	25,00
Histidina	0,50
PEG 400	69,40
	100,00

Método

Combinar y calentar ácido oleico y aceite de hidroxianisol butilado a 65-70 °C con agitación adecuada en el recipiente A. Combinar y calentar PEG 4000, histidina y PEG 400 a 65-70 °C con agitación adecuada en el recipiente B. Adicionar los contenidos del recipiente A al recipiente B con mezcla de alto esfuerzo cortante durante cinco minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente con agitación moderada.

V) Fórmula de ungüento anhidro

Palmitato de cetilo	5,00
Sebacato de dietilo	8,00
Escualano	5,00
Propilenglicol	5,00
Histidina	0,50
Vaselina	76,50
	100,00

Método

Combinar y calentar propilenglicol e histidina a 65-70 °C con agitación adecuada en el recipiente A.

Combinar y los componentes restantes a 65-70 °C con agitación adecuada en el recipiente B. Adicionar los contenidos del recipiente A al recipiente B con mezcla de alto esfuerzo cortante durante cinco minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente con agitación moderada.

VI) Fórmula de champú

Lauril éter sulfato de sodio	7,00
EDTA de tetrasodio	0,14
Ácido cítrico (anhidro)	1,11
Cocamida monoetanolamina	1,00
Laurilsulfato de sodio	7,00
Cocoamidopropil betaína	2,00
Cloruro de sodio	0,70
Agua	c.s.
	100,00

Método

Combinar todos los ingredientes con agitación moderada, minimizando la formación de espuma.

VII) Fórmula de crema en emulsión de agua en aceite

Ingrediente %	
Versagel M200 (aceite mineral (y) copolímero de etileno/propileno/estireno (y) copolímero de butileno/etileno/estireno)	8,58
Isoestearato de isoestearilo (ISIS)	12,87
Arlamol HD (isohexadecano)	4,29
Dimeticona 350cst	3,96
Glicerol	3,00
Laureth 4	0,30
2 Ácido pirrolidona 5 carboxílico (sal de Na)	0,50
L-Histidina	0,50
Carbómero (Ultrez 10)	0,80
L-Arginina	0,75
Clorhidrato de L-lisina	0,70
Ácido cítrico	0,10
Fenoxietanol	1,00
Polisorbato 20	0,075
Hialuronato de sodio	0,05
Hidróxido de sodio (solución al 20%)	c.s (-0,70)
Agua	c.s. (-62,33)
	100,00

En un recipiente adecuado (A), combinar el Versagel, isoestearato de isoestearilo, Arlamol HD y laureth 4 al 0,26% con una mezcla adecuada. En un segundo recipiente (B), combinar la dimeticona y laureth 4 al 0,04% con una mezcla adecuada. En un tercer recipiente (C) mezclar el polisorbato 20 con 7,425% de agua. Con mezcla moderada, adicionar lentamente primero el contenido del recipiente A y entonces el contenido del recipiente B en el recipiente C. En un cuarto recipiente (D), combinar el glicerol, ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico (sal de sodio), ácido cítrico, L-histidina, L-arginina, clorhidrato de L-lisina, hialuronato de sodio, fenoxietanol y 37,85% de agua. En un quinto recipiente (E), combinar el carbómero y 13,50% de agua. Una vez completamente disperso e hidratado, adicionar con agitación el contenido del recipiente E en el recipiente C, entonces adicionar el contenido del recipiente D. Ajustar el pH (si se requiere) usando el hidróxido de sodio y entonces compensar a la cantidad con el agua restante.

Referencias

1 Fitzpatricks . Dermatology in general medicine. Eds.Freedberg IM et al. Sixeds 2003,p 400.

2 Harrisons principals of internal medicine. Eds. Kasper et al 16th eds 2005. Chronic renal failure p 1653.

3 Fitzpatricks. Dermatology in general medicine.Eds.Freedberg IM etal six eds.2003,p103.

4 Al -Tamer YY,Hadi EA,al Badrani II.Ural.Res. 1997;25:337-40.

5 Fitzpatricks.Dermatology in general medicine.Eds.Freedberg IM et al. Six eds 2003,p 109.

6 Kezic S. Functions of filaggrin and its metabolites . In Flaggrin. Eds Thyssen JP and Maibach HI. 2014; p3-9.

7 Kezic S,O'Regan GM, YanN et al. Levels of filaggrin degradation products are influenced by both filaggrin genotype and atopic dermatitis severity. Allergy.2011; 66:934-940.

8 Nozaki Y and Tanford C. The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. J.Biol.Chern. 1963;238:4074-4081.

9 Stark G.R y Smyth D.G.The use of cyanate for the determination of NH2 -terminal residues in proteins.J.Biol.Chern.1963,238:214-226

10 Schmid-Wendtner MH y Korting HC, Skin Pharmacol. Physiol. 2006: 19:296-302

11 Rippke et al, Am. J. Clin. Dermatol. 2004; 5:217-23

12 Mauro et al, Arch. Dermatol. Res. 1998; 290: 215-22

13 Moss E et al. In situ metabolism of chinamyl alcohol in reconstructed human epidermis: New insigths into the activation of this fragrance sensitizer. Chern.Res.Toxicol. 2016; 29: 1172-8.

14 Bandier J et al. Quantification of epidermal filaggrin in human skin and its response to skin irritation. J.Invest Dermatol. 2015;136:1519-29.

15 G.R. Stark. Reactions of Cyanate with Functional Groups of Proteins. III. Reactions with Amino and Carboxyl Groups. Biochemistry 1965; 4: 1030-1036

REIVINDICACIONES

1. Formulación tópica que comprende un compuesto nucleófilo, donde el compuesto nucleófilo es un aminoácido nucleófilo, tal como histidina, o un péptido; para usarse en el tratamiento o prevención de la piel seca con comezón provocada por urea en el prurito urémico.

2. Formulación tópica para usarse de acuerdo con la reivindicación 1, donde la formulación se aplica a la piel con una concentración del compuesto nucleófilo que varía entre 0,001 mg/cm^2 y 5 mg/cm^2 de superficie de la piel, preferentemente entre 0,003 mg/cm^2 y 1 mg/cm^2 de superficie de la piel, y más preferentemente 0,005 mg/cm^2 y 0,5 mg/cm^2 de superficie de la piel.

3. Formulación tópica para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el compuesto nucleófilo se selecciona de uno o más de un péptido de histidina y uno o más aminoácidos adicionales, y una sal farmacéuticamente aceptable de histidina.

4. Formulación tópica para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde histidina es L-histidina.

5. Formulación tópica para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la histidina es el único ingrediente activo en la composición farmacéutica.

6. Formulación tópica para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la formulación comprende además ácido pirrolidona carboxílico, tal como la sal de sodio del ácido pirrolidona carboxílico, o uno o más de los aminoácidos glicilglicina, cisteína, arginina, y lisina.

7. Formulación tópica para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la formulación se aplica a la piel con una concentración de histidina que varía entre 0,5 mg/cm^2 y 2,5 mg/cm^2 de superficie de la piel.

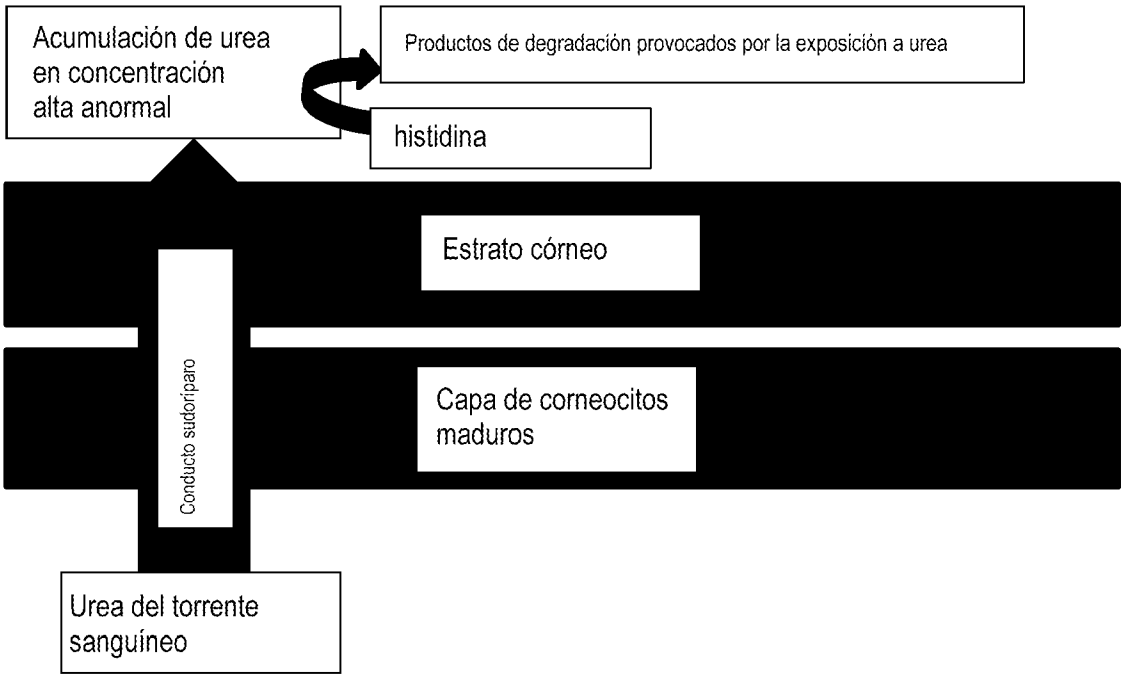

Acumulación de urea en concentración alta anormal
Productos de degradación provocados por la exposición a urea
histidina
Estrato córneo
Capa de corneocitos maduros
Conducto sudoríparo
Urea del torrente sanguíneo

Figura 1

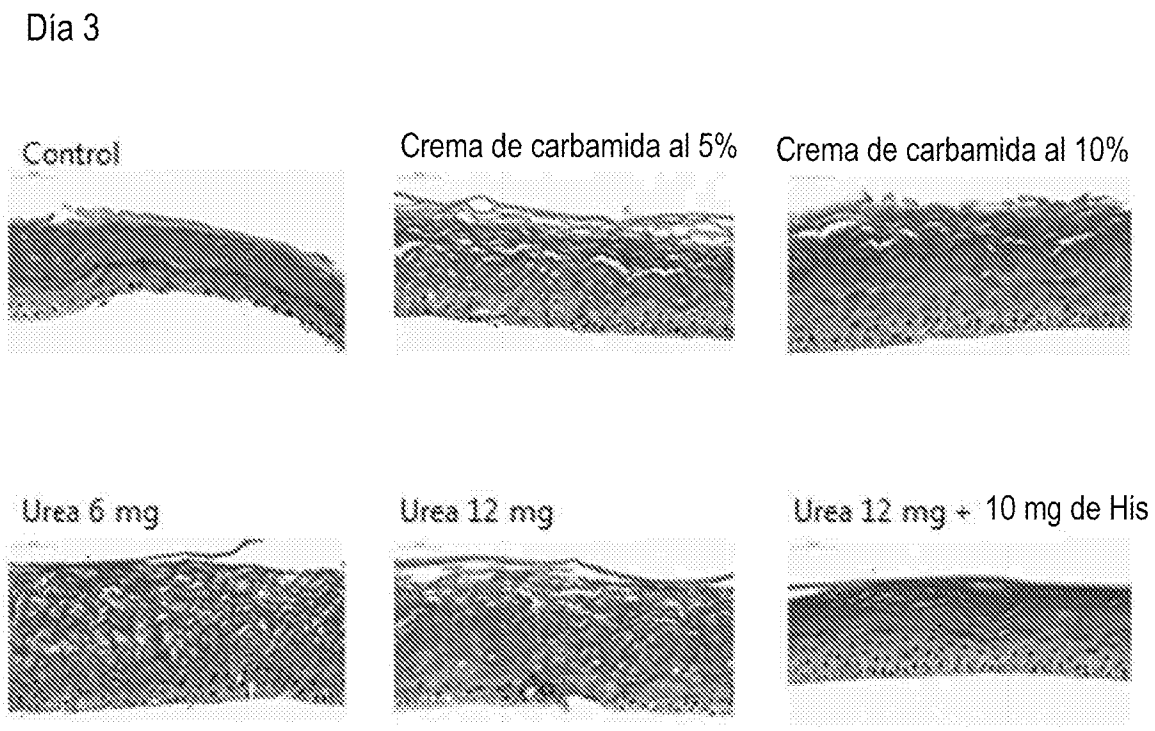

Día 3
Control
Crema de carbamida al 5%
Crema de carbamida al 10%
Urea 6 mg
Urea 12 mg
Urea 12 mg + 10 mg de His

Figura 2

Día 6

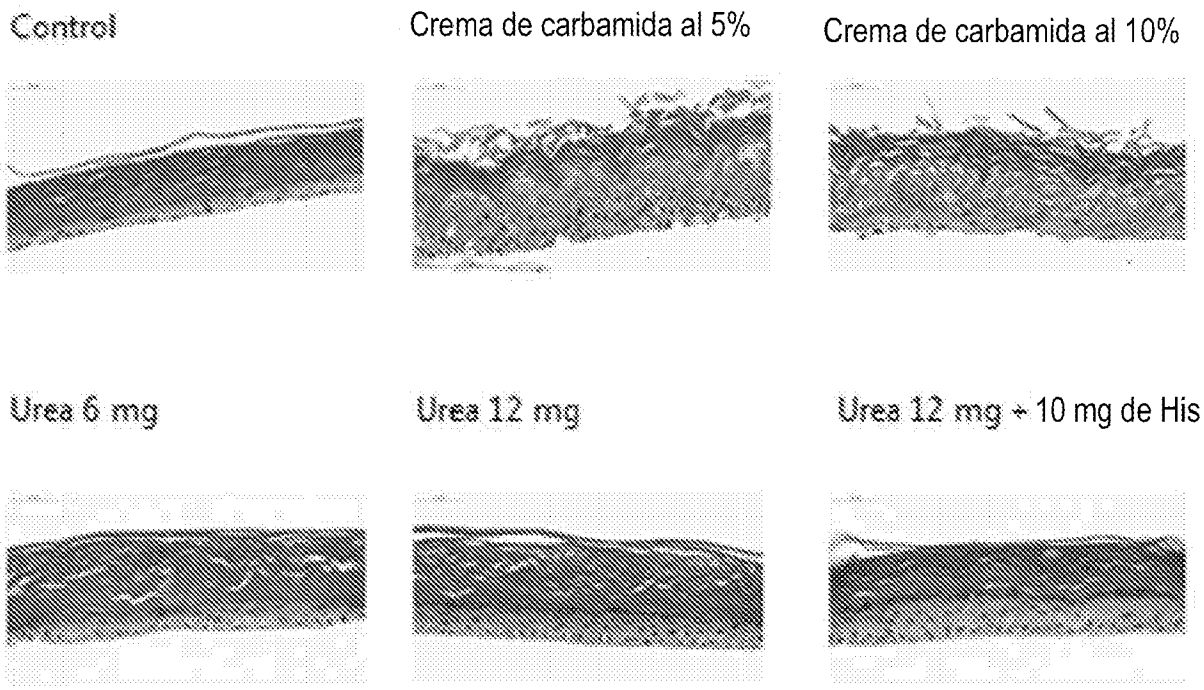
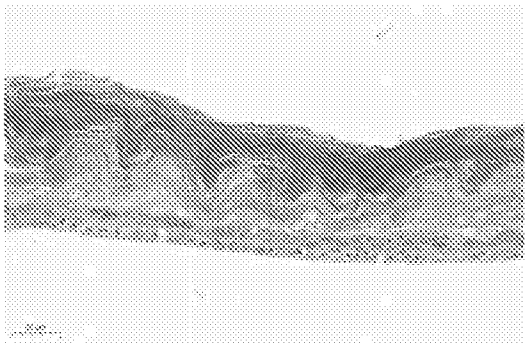


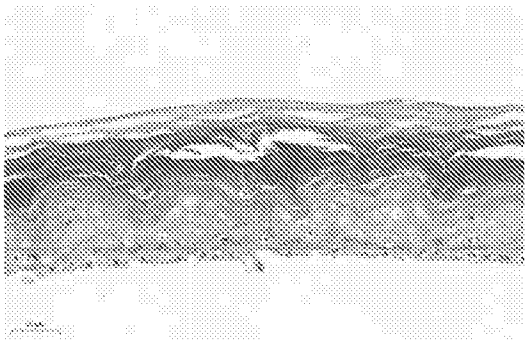
Figura 3

Día 6

GM (control)



GM + 4 mg de urea



GM + 4 mg de urea + crema

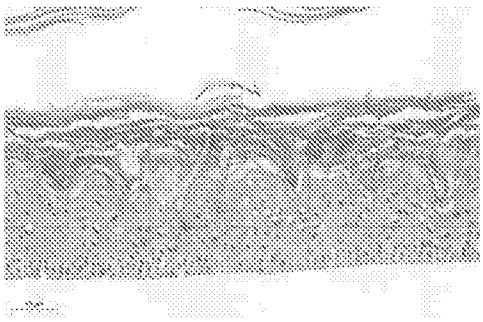


Figura 4