



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 267 706**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 31/455 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **01900231 .0**
⑧6 Fecha de presentación : **09.01.2001**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1259240**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2002**

⑤4 Título: **Agentes como la nicotinamida o cARDR para el tratamiento de trastornos de la piel.**

③0 Prioridad: **11.01.2000 IL 133976**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

⑦3 Titular/es: **DERMIPSOR Ltd.**
P.O. Box 12
Katzrin 12 900, IL

⑦2 Inventor/es: **Harel, Avikam y**
Bloch, Olga

⑦4 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Agentes como la nicotinamida o cARDR para el tratamiento de trastornos de la piel.

La presente invención se refiere al uso de un agente y el uso de una combinación.

La presente invención se refiere en general a composiciones para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, así como para el tratamiento del envejecimiento de la epidermis, para utilizar agentes para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas, así como para los métodos de tratamiento de enfermedades hiperproliferativas y el envejecimiento de la epidermis.

El crecimiento normal y la diferenciación de las células epidérmicas requiere un número de factores reguladores que incluye la Vitamina D3, la Vitamina A, un número de citoquinas y factores de crecimiento, así como Ca^{+2} libre intra y extracelular. Los trastornos hiperproliferativos benignos y malignos de la piel aparecen por un fallo en la regulación del crecimiento y la diferenciación de las células epidérmicas. La regulación defectuosa puede estar causada por la falta de respuesta o a la falta de una respuesta apropiada para regular los factores, o debido a los niveles o función anormales de los factores reguladores en sí. Por ejemplo, es bien conocido que una señalización aberrante a través del receptor de factor de crecimiento epidérmico resulta en crecimiento y diferenciación inapropiados. Esta anomalía puede contribuir en el desarrollo de soriasis, carcinomas celulares escamosos y de otros múltiples tumores humanos.

Recientemente, se ha visto que la nicotinamida (NA), un derivado de la vitamina B, niacina, puede inducir la diferenciación de células productoras de insulina⁽¹⁾. En modelos animales se ha demostrado el tratamiento y la prevención exitosos de la diabetes mellitus insulino-dependiente con NA⁽²⁾, y los efectos terapéuticos y profilácticos de la NA sobre la diabetes mellitus están actualmente en fase de ensayos clínicos internacionales⁽³⁾.

La NA es conocida como un depurador de radicales libres débil, inhibidor de la poli-ADP-ribosa sintetasa y la óxido nítrico sintasa inducible en los islotes pancreáticos⁽⁴⁾. Existe un único informe sobre el papel significativo de la NA en la regeneración de NAD celular tras el agotamiento inducido por peróxido⁽⁵⁾. No obstante, todos los efectos enumerados de la NA en las células epidérmicas humanas no se han estudiado.

Existen muchos informes de tratamiento exitoso de la soriasis, y otros trastornos de la piel relacionados, en humanos siguiendo un tratamiento oral o tópico con vitamina D3 y sus análogos⁽⁶⁾.

Se sabe que las rutas de señalización del Ca^{+2} están involucradas en la diferenciación de los queratinocitos. Recientemente, se ha descubierto que la ADP ribosa cíclica (cADPR), que es un derivado cíclico del NAD⁺, es un potente compuesto natural movilizador de Ca^{+2} en diferentes células eucariotas⁽⁷⁾. No obstante, el efecto de la cADPR sobre la señalización del Ca^{+2} en los queratinocitos humanos no ha sido estudiado.

Recientemente se ha visto que el ácido holo-trans-retinoico (atRA), que es un metabolito de la vitamina A, induce la activación de la síntesis de la cADP ribosa en las células renales LLC-PK₁ al aumentar la actividad de la ADPR-ciclase sin afectar la ADPR-hidrolasa⁽⁸⁾. No obstante, el efecto del atRA sobre la síntesis de la cADPR en los queratinocitos humanos no se ha estudiado.

La DE-A-4 335 454 describe una composición de medicina geriátrica en forma de una formulación que contiene extractos de ginseng. Específicamente, la composición contiene aparte del extracto de ginseng siberiano, extracto de ginseng coreano y tartrato de L-carnitina, también una mezcla de vitaminas y elementos traza.

La WO-A-98 52 529 está relacionada con una composición con alto nivel de hidratación, que se caracteriza por comprender:

a) entre el 0,01% y el 50%, preferiblemente entre el 0,1% y el 10%, en peso de un compuesto de vitamina B3;

b) entre el 1% y el 99% de un componente acondicionador con un factor de hidratación mayor de 0, preferiblemente mayor de 1,2, más preferiblemente mayor de 1,5

La EP-A-0 052 705 se refiere a una composición efectiva para la disminución de las lesiones de inflamación del acné común en pacientes humanos que presentan tales lesiones inflamatorias, y que se caracteriza por un transportador que contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de ácido nicotínico o nicotinamida.

La presente invención está basada en el hallazgo sorprendente de que la nicotinamida (NA) así como la adenosina difosfato ribosa cíclica (cADPR) puede promover la diferenciación, e inhibir la proliferación de las células epidérmicas humanas en dos sistemas modelo: un queratinocito humano inmortalizado de forma espontánea, llamado: "*líneas celulares HaCat*", que pueden utilizarse como modelo de la epidermis altamente proliferativa, por ejemplo, la epidermis soriásica⁽⁹⁾; y para los efectos de los moduladores externos en la diferenciación epidérmica⁽¹⁰⁾; y una línea celular de carcinoma epidérmico llamado: "*A431*" portadora de alelos mutados de p53, que sirve como modelo para probar fármacos anticarcinogénicos⁽¹¹⁾.

Los efectos antiproliferativos de los fármacos se demostraron en los queratinocitos humanos de proliferación rápida llamados "*Queratinocitos Epidérmicos Humanos Cultivados*", que se utilizan para detectar el tratamiento antiproliferativo de la soriasis⁽¹²⁾.

La presente invención se basa además en el sorprendente hallazgo de que una composición que comprende una mezcla de NA y un metabolito de Vitamina D3, la 1α , 25-dihidroxi-vitamina D3 (llamada a partir de ahora: " 1α , 25(OH) $_2$ D3"), es más efectiva en promover la diferenciación e inhibiendo la proliferación, que la suma de cada uno de los efectos individuales de la NA y el metabolito de la vitamina D3 cuando se administran por separado. Esto significa que la combinación del metabolito de la vitamina D3 (1α , 25(OH) $_2$ D3) y la NA poseen un efecto sinérgico sobre la diferenciación y la proliferación de las células epidérmicas humanas.

La presente invención se basa además en el sorprendente hallazgo de que una composición que comprende una mezcla del ácido holo-trans-retinoico (atRA), (que es un metabolito de la vitamina A), junto con NA es más efectiva en promover la diferenciación e inhibir la proliferación de las células epidérmicas humanas, que la suma de cada uno de los efectos de cada uno de estos compuestos por separado, es decir, la NA y el atRA poseen un efecto sinérgico en la promoción de la diferenciación y en la inhibición de la proliferación de las células epidérmicas humanas.

La presente invención se basa además en el sorprendente hallazgo de que los queratinocitos humanos tratados a largo plazo con NA son altamente resistentes al estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno, indicando así que la NA puede servir como un fuerte antioxidante y por lo tanto como un potencial protector anti-envejecimiento y anticancerígeno de las células epidérmicas humanas.

Así, un aspecto de la presente invención proporciona una composición para el tratamiento de enfermedades epidérmicas hiperproliferativas y para el envejecimiento de la epidermis, que comprende un transportador y un ingrediente o agente activo seleccionado del grupo que consiste en:

(i) nicotinamida (NA);

(ii) adenosina difosfato ribosa cíclica (cADPR); y

(iii) una combinación de NA y cADPR.

La composición puede ser farmacéutica o cosmética.

La composición de la presente invención está destinada a las administración por vía tópica así como para la administración por vía subcutánea junto con un transportador dermatológicamente o cosméticamente aceptable y puede estar en forma de crema, solución, ungüento, loción, pomada o pomada grasa.

La composición puede utilizarse para aumentar las propiedades antioxidantes de las células epidérmicas, por ejemplo como una composición anticancerígena o anti-envejecimiento.

Cuando se utiliza para el tratamiento del envejecimiento de la epidermis, la composición cosmética de la invención puede administrarse como cualquier otra preparación cosmética de la materia junto con un transportador cosméticamente aceptable.

La concentración de nicotinamida en la composición farmacéutica de la invención debe ser de entre 0,5 mM y 20 mM; preferiblemente entre 1 mM y 10 mM; más preferiblemente entre 2,5 mM y 5 mM.

La concentración del cADPR en la composición de la invención debe ser de entre 1 μ M y 100 μ M; preferiblemente entre 10 μ M y 50 μ M; más preferiblemente entre 25 μ M y 50 μ M.

De acuerdo con la opción (iii) anterior, la composición comprende una combinación de NA y cADPR, cuya proporción debe estar entre 100:1 y 200:1 (p/p), en la que la concentración final de nicotinamida debe ser de entre 2,5 mM y 5 mM, y la concentración final de cADPR debe ser de entre 25 μ M y 50 μ M.

En una realización de la invención, basada en la actividad sinérgica de la NA y un metabolito de la Vitamina D3, la composición de la invención comprende una mezcla de NA y metabolito de la Vitamina D3. Preferiblemente, el metabolito de la Vitamina D3 es 1α , 25-dihidroxi-vitamina D3. La concentración de NA en la mezcla estará en el rango definido antes. La proporción entre NA y D3 debe estar entre 5000:1 y 500.000:1, en la que la concentración final del metabolito de la vitamina D3 debe estar entre 0,01 μ M y 1 μ M. Otros metabolitos adecuados de la vitamina D3 pueden ser el 25-hidroxicolecalciferol (25 OH D3); y 24R, 25-dihidroxicolecalciferol (24R, 25 (OH) $_2$ D3).

En una segunda realización, basada en el sorprendente efecto sinérgico de la NA y del metabolito de la Vitamina A (atRA), la presente invención se refiere a una composición que comprende NA en el rango de las concentraciones como se han definido antes y un metabolito de la vitamina A, preferiblemente atRA. La concentración final de atRA debe estar entre 0,1 nM y 10 nM. La proporción entre NA y atRA debe estar entre 5×10^5 :1 y 25×10^7 :1.

ES 2 267 706 T3

El término “*enfermedades epidérmicas hiperproliferativas*” se refiere a enfermedades que se caracterizan por un nivel superior al normal de proliferación de las células epidérmicas, y como norma, también por una diferenciación anormal.

Las enfermedades epidérmicas hiperproliferativas pueden ser malignas: y los ejemplos de tales enfermedades malignas son el carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma de células basales (CCB) y otros cánceres de piel no-melanoma (CPNM).

Otra opción es que las enfermedades hiperproliferativas pueden ser enfermedades benignas, como por ejemplo: la soriasis, verrugas comunes, queratoacantoma, queratosis seborreica, así como otros trastornos benignos de la piel como la seborrea o ictiosis.

El término “*envejecimiento de la epidermis*” se refiere a todos los síntomas asociados con el envejecimiento fisiológico, como las arrugas, pérdida de elasticidad, disminución del metabolismo, sequedad, aspereza, quemazón y atrofia de la piel, prurito, hiperpilosidad y alopecia.

El término “*tratamiento*” como se ha definido antes, se refiere al alivio de los efectos adversos de la enfermedad, que puede manifestarse, por ejemplo, por un descenso en la tasa de proliferación, mejora de la diferenciación, o una combinación de ambas: por completa eliminación de la proliferación y diferenciación anormales de las células epidérmicas en la persona enferma, o alternativamente por la prevención de la diferenciación anormal y/o proliferación superior a la normal antes de que éstas sucedan. El tratamiento en el aspecto cosmético puede incluir también la prevención de signos del envejecimiento antes de que aparezcan. En particular, los compuestos de la invención pueden utilizarse como composiciones anti-envejecimiento y anticancerosas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un agente seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) nicotinamida (NA);
- (ii) adenosina difosfato ribosa cíclica (cADPR); y
- (iii) una combinación de NA y cADPR

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades epidérmicas hiperproliferativas, o para el tratamiento del envejecimiento de la epidermis.

Otro aspecto de la presente invención concierne a un método para el tratamiento de enfermedades epidérmicas hiperproliferativas o para el tratamiento del envejecimiento de la epidermis que comprende: la aplicación en la piel de un individuo que necesita dicho tratamiento, de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) nicotinamida (NA);
- (ii) adenosina difosfato ribosa cíclica (cADPR); y
- (iii) una combinación de NA y cADPR

El término “*una cantidad terapéuticamente efectiva*” como se ha definido antes, se refiere a una cantidad que mejora, de forma medible, la diferenciación de las células epidérmicas como se determina, por ejemplo, mediante un análisis de inmunofluorescencia indirecta de la expresión de queratina 10 e involucrina; o mediante la determinación del nivel de formación de la cubierta cornificada⁽¹³⁾. Alternativamente la cantidad es una cantidad que puede disminuir, en una cantidad medible, la proliferación de las células como se indica mediante la medición de la actividad de los enzimas deshidrogenasa mitocondriales de las células vivas (ensayo MTT)⁽¹⁴⁾ y mediante el conteo del nivel de células basales⁽¹⁵⁾.

La presente invención se refiere además a un método para inhibir la hiperproliferación de las células epidérmicas que comprende poner en contacto las células con una cantidad efectiva de un agente seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) nicotinamida (NA);
- (ii) adenosina difosfato ribosa cíclica (cADPR); y
- (iii) una combinación de NA y cADPR

Las células pueden ser células epidérmicas malignas como de un carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma de células basales (CCB) y otros cánceres de piel no-melanoma (CPNM), o alternativamente pueden ser células hiperproliferativas benignas como queratinocitos humanos de piel soriásica, y queratinocitos de queratoacantoma,

verrugas comunes o lesiones queratosas seborreicas. Las células pueden también provenir de otros trastornos benignos de la piel como la ictiosis.

Las células pueden también ser células epidérmicas con síntomas de envejecimiento de la piel (sequedad, aspereza, quemazón y atrofia de la piel, picor, intolerancia al frío, arrugas, hiperpilosidad, alopecia), cuando las células epidérmicas están involucradas en un proceso de envejecimiento natural, o inducido por estrés oxidativo. Alternativamente, las células pueden ser células de la piel con una sensibilidad mayor al daño oxidativo (células con predisposición a la iniciación de tumores).

La invención además se refiere a un método para aumentar las propiedades antioxidativas de las células epidérmicas que comprende poner en contacto las células con una cantidad efectiva de NA.

Para poder entender la invención y para ver como se lleva a la práctica, se describe a continuación una realización preferida a modo de ejemplo no limitante, en referencia a los esquemas acompañantes, en los que:

Fig. 1A muestra el efecto de la NA sobre la proliferación celular de HaCat y A431;

Fig. 1B muestra el efecto anti-proliferativo de NA sobre queratinocitos epidérmicos humanos cultivados;

Fig. 2 muestra el efecto del metabolito D3 (1α 25 (OH)₂D3) sobre la proliferación celular de HaCat y A431;

Fig. 3 muestra el efecto de cADPR sobre la proliferación celular de HaCat y A431;

Fig. 4 muestra el efecto del metabolito de la Vitamina A (atRA) sobre la proliferación celular de HaCat y A431;

Fig. 5A muestra el efecto combinado de la NA y el metabolito D3 (1α 25 (OH)₂D3) sobre la proliferación de la línea celular HaCat;

Fig. 5B muestra el efecto combinado de la NA y el metabolito D3 (1α 25 (OH)₂D3) sobre la proliferación de la línea celular HaCat menos el efecto de cada uno de los compuestos por separado (sinergismo);

Fig. 6A muestra el efecto combinado de la NA y el metabolito D3 (1α 25 (OH)₂D3) sobre la proliferación de la línea celular A431;

Fig. 6B muestra el efecto combinado de la NA y el metabolito D3 (1α 25 (OH)₂D3) sobre la proliferación de la línea celular A431 menos el efecto de cada uno de los compuestos por separado (sinergismo);

Fig. 7A muestra el efecto combinado de la NA y cADPR sobre la proliferación de la línea celular HaCat;

Fig. 7B muestra el efecto combinado de la NA y cADPR sobre la proliferación de la línea celular HaCat menos el efecto de cada uno de los compuestos por separado (sinergismo);

Fig. 8A muestra el efecto combinado de la NA y cADPR sobre la proliferación de la línea celular A431;

Fig. 8B muestra el efecto combinado de la NA y cADPR sobre la proliferación de la línea celular A431 menos el efecto de cada uno de los compuestos por separado (sinergismo);

Fig. 9A muestra el efecto combinado de la NA y el metabolito de Vitamina A (atRA) sobre la proliferación de la línea celular HaCat;

Fig. 9B muestra el efecto combinado de la NA y el metabolito de Vitamina A (atRA) sobre la proliferación de la línea celular HaCat menos el efecto de cada uno de los compuestos por separado (sinergismo);

Fig. 10A muestra el efecto combinado de la NA y el metabolito de Vitamina A (atRA) sobre la proliferación de la línea celular A431;

Fig. 10B muestra el efecto combinado de la NA y el metabolito de Vitamina A (atRA) sobre la proliferación de la línea celular A431 menos el efecto de cada uno de los compuestos por separado (sinergismo);

Fig. 11 muestra el efecto de la NA sobre la involucrina y la expresión de la queratina k10 en células HaCat;

Fig. 12 muestra el efecto de la NA sobre la expresión de las células basales y de la cubierta cornificada en la línea celular HaCat;

Fig. 13 muestra el efecto de la NA sobre el nivel de apoptosis en las líneas celulares HaCat y A431; y

Fig. 14 muestra la resistencia de las células HaCat tratadas por un periodo largo con NA al estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Descripción detallada de la invención

Procedimientos experimentales

5 A. Cultivo celular

Las células de queratinocito humano inmortalizadas HaCat se cultivaron de forma rutinaria en frascos de 75 cm² usando medio esencial mínimo Eagle (MED-EAGLE) suplementado con suero fetal bovino al 5% (SFB) y un 1% de antibióticos (penicilina 20 u/ml; estreptomycin 20 µg/ml y nistatina 2,5 u/ml) a 37°C en 95% aire/5% CO₂. El medio se cambió cada 3-4 días. En algunos experimentos se utilizaron células HaCat cultivadas durante 6 meses de forma rutinaria utilizando medio suplementado con NA 10 mM o NA 20 mM (cultivo prolongado de células HaCat con NA).

Los Queratinocitos Epidérmicos Humanos (pases 3-6) obtenidos de cirugía de alisamiento facial "lifting" se cultivaron en medio libre de suero KGM[®] -2 BulletKit[®] CC-3107 (Clonetics, USA) con calcio bajo para acelerar la proliferación de los queratinocitos. La línea celular de carcinoma epidérmico A431 se cultivó en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y antibióticos.

B. Reactivos

Nicotinamida (NA); adenosina difosfato ribosa cíclica (cADPR); calcitriol (1 α , 25-dihidroxi-vitamina D3); ácido holo-trans-retinoico (atRA; ácido de Vitamina A: Tretinoína); bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT); yoduro de propidio; dimetilsulfóxido (DMSO); albúmina de suero bovino (BSA); sacarosa; citrato trisódico; igepal CA-630 (NP-40); Tris-(hidroximetil)-aminometano; tripsina; inhibidor de tripsina; ribonucleasa A; esperminetetrahidrocloreto; dodecilsulfato sódico (SDS); β -mercaptoetanol y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se obtuvieron de Sigma (USA). El Medio Mínimo Esencial Eagle (MEM-EAGLE); antibióticos 2 MEM; suero bovino fetal (SFB); L-glutamina; tampón salino fosfato de Dulbecco (PBS); solución tripsina 0,05%-EDTA (1:1000) se obtuvieron de Biological Industries (Israel). Keratinocyte Growth Medium[®] -2 Bullet Kit[®] CC-3107 (para acelerar la proliferación) se recibió de BioWhittaker, Inc. A Cambrex Company, Clonetics, USA). Anticuerpos monoclonales de ratón anti citoqueratina 10 humana (NCL-CK10) e involucrina (NCL-INV) se obtuvieron de Novocastra Laboratories Ltd. (UK) y las IgG conjugadas con CyTM 2 de cabra anti-ratón de Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. (USA). Las células HaCat y A431 se propagaron en frascos de cultivo de tejidos de 25 cm² o 75 cm² (Corning, USA) y se utilizaron placas de cultivo de tejidos de 24-pocillos y 96-pocillos (Corning, USA) para la incubación de las células con diferentes dosis de NA (1-50 mM/L), cADPR (1-50 microM), Vitamina D3 (1-10000 nM) y atRA (0,1-10000 nM).

35

C. Ensayos de Proliferación

C1 Método MTT

Se determinó la viabilidad/proliferación de las células HaCat y A431, y los Queratinocitos Epidérmicos Humanos Cultivados tras el tratamiento con varias concentraciones de nicotinamida sola y en combinación con cADPR, los metabolitos de las Vitaminas D3 y A, mediante el ensayo MTT (Mosmann, T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol Meth.*, 65:55-63, (1983)) en placas microtituladas de 96 pocillos. Brevemente, se sembró el mismo número de células en cada pocillo y tras 24 h de incubación se añadió NA sólo o en diferentes combinaciones (NA y cADPR; NA con D3; NA con Vitamina A) a las diferentes concentraciones finales. Tras 72 h de incubación, se añadieron a cada pocillo 20 µl de MTT 5 mg/ml en tampón fosfato salino (PBS) sin Ca⁺² ni Mg⁺². Las placas se colocaron entonces en un incubador de CO₂ y el MTT se convirtió en cristales de MTT-formazan insolubles mediante las deshidrogenasas mitocondriales durante 3,5 h. Se retiró el medio y los cristales de formazan se disolvieron en 0,2 ml de DMSO. La cantidad de formazan se cuantificó en un lector de ELISA a 550 nm. Se restaron los valores de ruido de fondo a 650 nm. Los datos son resultado de tres experimentos independientes.

50

D. Ensayos de Diferenciación

55 D1 Formación de la Cubierta Cornificada

La formación de la cubierta cornificada celular se determinó (Sun T-T, Green, H: Differentiation of the epidermal keratinocytes in cell culture: formation of cornified envelope, *Cell* 9: 511-521, 1976) como una medida de los procesos de diferenciación tardíos en las células HaCat tratadas con nicotinamida. Brevemente, las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos y tras la unión (24 h) se expusieron a varias concentraciones de NA (0, 4, 10, 15 y 20 mM) durante 96 h. Las células se despegaron y resuspendieron en el medio. El conteo de las células totales y basales (pequeñas, redondeadas) se realizó utilizando un hemocitómetro en alícuotas por tetraplicado. Las células restantes se centrifugaron con un pulso, se trataron con Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) suplementado con β -mercaptoetanol al 1% y SDS al 1% durante 10 min y las células de la cubierta cornificadas se contaron en alícuotas por tetraplicado utilizando el hemocitómetro. Se presentan los resultados de tres experimentos independientes.

65

D2 *Inmunofluorescencia Indirecta*

Los efectos de la NA sobre los procesos tempranos (expresión de queratina k10) y tardíos (expresión de involucrina) de diferenciación sobre las células HaCat se estimaron mediante inmunofluorescencia indirecta. Brevemente, se sembraron 2×10^4 células/ml sobre cubreobjetos de vidrio en placas de Petri con 0, 5, 10 y 20 mM de NA. Tras 72 h de incubación, se lavaron las células del cubreobjetos de vidrio con PBS, se fijaron mediante metanol enfriado con hielo: acetona (1:1) y se incubaron a -20°C durante 10 minutos. Las células fijadas se lavaron en PBS y se incubaron con tampón de bloqueo (BSA al 1% en PBS) durante 10 minutos para minimizar la absorción no específica de los anticuerpos primarios sobre los cubreobjetos. Para detectar la expresión de queratina 10, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón antihumano en una dilución final de 1/50. La expresión de involucrina se detectó mediante un anticuerpo monoclonal de ratón anti involucrina humana en una dilución final de 1/100. Tras bloquear las células, se incubaron con los anticuerpos mencionados a 37°C durante 1 h en una cámara húmeda. Las células lavadas exhaustivamente con PBS se incubaron con la IgG de cabra conjugada con CyTM 2 anti-ratón en una dilución final de 1/50 durante 30 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se visualizaron en un microscopio Zeiss (Axioskop-2) equipado con lentes de epifluorescencia y los filtros apropiados para evitar la contaminación cruzada. El nivel de expresión de queratina 10 y de involucrina se estimó contando las células positivas en relación al número total de células. En cada portaobjetos se contaron al menos 500-1000 células. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes.

D3 *Marcaje de DNA y análisis por citometría de flujo*

Se sembraron células HaCat y A431 en frascos de cultivo tisular de 25 cm^2 y se incubaron durante 72 h con 0, 5, 10 y 20 mM de NA. Las células se trataron con etanol al 5% que sirvió como control positivo de la apoptosis. Los núcleos para el análisis por citometría de flujo del DNA se prepararon mediante un método de detergente tripsina con yoduro de propidio (Lars L Rindelov: A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for FACS DNA analysis, *Cytometry* 3 (5) 323-327, 1983). Brevemente, las células (10^6 por tubo) se lavaron con PBS. El botón celular se resuspendió en $40\text{ }\mu\text{l}$ de tampón citrato (pH 7,6) suplementado con sacarosa 250 mM, citrato trisódico 40 mM y DMSO al 5%. Luego las células resuspendidas se incubaron en $450\text{ }\mu\text{l}$ de solución de tripsina (0,15 mg/ml, pH 7,6) durante 10 minutos. Tras 10 min más de incubación con el inhibidor de tripsina y la ribonucleasa A, se añadió a los núcleos la solución de fluorocromo que contenía yoduro de propidio $100\text{ }\mu\text{g/ml}$. Los tubos se colocaron en oscuridad antes del análisis por citometría de flujo. El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo en un selector de células activado por fluorescencia (FACScan; Becton Dickinson, CA) y se determinó el nivel de apoptosis utilizando el Programa Cell Quest de Becton Dickinson. Cada experimento se repitió tres veces.

E. *Análisis estadístico*

Los resultados están presentados como la media $\pm$ desviación estándar de la media (media $\pm$ DE). La significación estadística ($P < 0,05$) derivó de la prueba t de Student.

Ejemplo 1

Efecto de la NA sobre la proliferación de células epidérmicas

Se incubaron 2×10^4 células de queratinocito humano inmortalizadas HaCat/ml, 2×10^4 Queratinocitos Epidérmicos Humanos Cultivados/ml, y 5×10^3 células de carcinoma escamoso humano A431/ml con varias cantidades de NA durante un periodo de 72 horas.

La proliferación se estimó mediante el método MTT, como se ha descrito en la Sección C de los Procedimientos Experimentales, y se expresó como el porcentaje control (células sin tratar).

Los resultados se muestran en la Fig. 1A y 1B, e indican que la proliferación celular de HaCat, A431 y de Queratinocitos Epidérmicos Humanos Cultivados se inhibió significativamente por NA.

Ejemplo 2

Efecto de la cADPR, metabolito de Vitamina D3, y metabolito de Vitamina A sobre la proliferación celular

Las células se incubaron, como se ha descrito en el Ejemplo 1, con varias cantidades de cADPR durante 72 horas.

Como se puede ver en la Fig. 3, la cADPR 25 y $50\text{ }\mu\text{M}$ fue efectiva en la inhibición de la proliferación.

Se determinaron los efectos del metabolito de la Vitamina D3 ($1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$), y del metabolito de la Vitamina A (atRA) sobre la proliferación celular. Las células, se incubaron, como se ha descrito antes, con varias cantidades de metabolito de la Vitamina D3 y metabolito de la Vitamina A, y los resultados se muestran en las Figs. 2 y 4, respectivamente.

Como se puede ver, en las concentraciones examinadas, ni el metabolito de la Vitamina D3 ni el metabolito de la Vitamina A, solos, afectaron a la proliferación de la línea celular HaCat y A431.

Ejemplo 3

Efectos sinérgicos de la NA y un metabolito de Vitamina D3

5 Las células HaCat y las células A431 se incubaron con el metabolito D3 de forma separada, y con metabolito D3 junto con NA (Figs. 5A y 6A, respectivamente) durante un periodo de 72 horas.

10 El efecto de cada uno de ellos, metabolito D3 y NA separadamente, se dedujo del efecto combinado de NA junto con el metabolito D3 en las células HaCat (Fig. 5B) y las células A431 (Fig. 6B).

15 Como se puede observar, el efecto combinado de NA y de metabolito D3 fue superior a la suma de cada uno de estos efectos por separado, en una cantidad de alrededor del 12% para una concentración de 100 nM de D3 y 5 mM de NA en las células HaCat, y alrededor de un 20% de sinergismo para 10 nM de metabolito D3 y 5 mM de NA en las células A431.

Ejemplo 4

Efecto sinérgico de cADPR y NA

20 Se incubaron 2×10^4 células HaCat/ml y 5×10^3 células de carcinoma escamoso humano A431/ml con NA a una concentración de 5 mM y 2,5 mM respectivamente, variando la cantidad de cADPR (25-50 μ M), cuyos resultados se muestran en las Figs. 7 y 8 respectivamente.

25 Como se puede observar en la Fig. 7A, 50 μ M de cADPR y 5 mM de NA mostraron un efecto sinérgico de alrededor del 20% en la inhibición de la proliferación en comparación con el efecto de cada uno de estos agentes a esa concentración en las células HaCat, y 25 μ M de cADPR y 2,5 mM de NA mostraron un sinergismo de alrededor del 16% en la inhibición de la proliferación de las células A431, en comparación con la inhibición de cada uno de estos componentes solos.

Ejemplo 5

Efecto sinérgico de una combinación de NA y metabolito de Vitamina A sobre células epidérmicas

35 Se incubaron células HaCat y células A431 con NA en una cantidad de 5 mM y 2,5 mM respectivamente y variando las concentraciones de atRA (0,1 nM-1 μ M), cuyos resultados se muestran en las Figs. 9 y 10, respectivamente.

40 Como se puede observar en las Figs. 9B y 10B, el efecto de la combinación mostró un sinergismo de alrededor del 25% a una concentración de 0,1 μ M de atRA para las células A431 (Fig. 10B) y un sinergismo de alrededor del 20% para una concentración de 10 μ M de atRA (en las células HaCat) (Fig. 9B), por encima del efecto alcanzado para cada uno de los agentes separados, Vitamina A y NA, en las mismas cantidades por separado.

Ejemplo 6

Efecto de NA sobre la diferenciación celular y apoptosis

45 El efecto de la NA sobre la diferenciación se determinó por la formación de la cubierta cornificada como se describe en D1 e mediante inmunofluorescencia indirecta de la queratina K10 y la involucrina como se describe en D2, y los resultados se muestran en las Figs. 11 y 12, respectivamente.

50 Como se puede observar, el tratamiento con NA, simuló la expresión de queratina 10 (K10) e involucrina, que son marcadores de los procesos de diferenciación temprana y tardía de las células epidérmicas.

55 La NA, también cambió la proporción entre la cantidad de células y las células de la cubierta cornificada, por lo que una mayor proporción de las células testadas fueron células de la cubierta cornificada, que son células más diferenciadas, como se puede ver en la Fig. 12.

60 Finalmente, la Fig. 13 muestra que la NA se convierte en citotóxica para la célula, como se determina por el nivel de apoptosis, en cantidades de 30 mM para las células A431 y de 50 mM para las células HaCat. Esto indica que el efecto de la NA sobre la proliferación celular, como por ejemplo, se expresa en la Fig. 1 se manifiesta a una concentración de NA que está por debajo de las concentraciones tóxicas para las células.

Ejemplo 7

65 *Resistencia de las células HaCat cultivadas con NA durante un plazo largo (10 mM) al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno*

Se incubaron 2×10^4 células inmortalizadas de queratinocito humano HaCat cultivadas de forma rutinaria/ml, o la misma cantidad de células HaCat cultivadas con NA 10 mM durante 6 meses, con concentraciones crecientes de

peróxido de hidrógeno durante un periodo de 24 horas. La citotoxicidad se estimó mediante el método MTT, como se describe en la Sección C de “Procedimientos Experimentales”, y se expresó como un porcentaje del control (células sin tratar).

Los resultados se muestran en la Fig. 14, que demuestra que sólo las células HaCat cultivadas de forma rutinaria (sin el suplemento de NA) fueron dañadas significativamente por el peróxido de hidrógeno. Estos datos indicaron que el tratamiento a largo plazo con NA puede aumentar las propiedades antioxidantes de las células epidérmicas humanas.

Referencias

1. **Otonkoski T., Beatie, G.M., Mally, M.I., Ricordi, S., Hayek, A.:** “Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells”, *J. Clin. Invest.*, 92: 1459-1466, (1993).
2. **Yamada, K., Nonaka, K., Hanafusa, T., Miyazaki, A., Toyoshima, H., Tarui, S.:** “Preventive and therapeutic effects of large-dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis: an observation in nonobese diabetic (NOD) mice”, *Diabetes*, 31: 749-753, (1982).
3. **Elliot, R.B., Chase, H.P.:** “Prevention or delay of Type I (insulin-independent) diabetes mellitus in children using nicotinamide”. *Diabetologia*, 34: 362-365, (1991).
4. **Petley, A., Macklin, B., Renwick, A.G., Wilkin, T. J.:** “The Pharmacokinetics of Nicotinamide in Human and Rodents”. *Diabetes*, 44: 152-155, (1995).
5. **Grant, R.S., Kapoor, V.:** “Murine glia cells regenerate NAD, after peroxide-induced depletion, using either nicotinic acid, nicotinamide, or quinolinic acid as substrates”, *J. Neurochem.*, 70: 1759-1763, (1998).
6. **Morimoto, S., Yoshikawa, K., Konzuka, T., et al.** “An open study of vitamin D3 treatment in soriasis vulgaris”, *Br. J. Dermatol.*, 115: 421-429, (1986).
7. **Lee HC.:** Specific binding of cyclic ADP-ribose to calcium-storing microsomes from sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.*, 266: 2276-2281 (1991).
8. **Beers, K.W., Chini, E.N., and Dousa, T.P.:** “All-trans-retinoic acid stimulates synthesis of cyclic ADP-ribose in renal LLG-PK”, *J. Clin. Invest.*, 95: 2385-2390, (1995).
9. **Ockenfels, H.M., Nubbaum, G., Schultewolter, T., Burger, PM., Goos, M.:** “Cyclosporin A, FK506 and dithranol alter tyrosine-specific protein phosphorylation in HaGat keratinocytes”. *Arch. Dermatol. Res.*, 287: 304-309, (1995).
10. **Paramio, J. M., and Jorcano, J.L.:** “Role of protein kinases in the *in vitro* differentiation of human HaGat cells”. *Brit. J. Dermatol.*, 137: 44-50, (1997).
11. **Ahmad, N., Feyes, O.K., Agarwal, R., Mukhtar, H.:** Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/P21 leading to cell cycle arrest and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6977-6982, (1998).
12. **Nikoloff, B.J., Fisher, G.J., Mitra, R.S., Voorhees, J.J.:** “Additive and Synergistic Antiproliferative Effect of Cyclosporin A and Gamma Interferon on Cultured Human Keratinocytes”. *Amer. J. Pharmacol.*, 131: 12-18, (1988).
13. **Sun, T-T, Green, H.:** Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of cornified envelope, *Cell*, 9: 511-521, (1976).
14. **Mosmann, T.:** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 65: 55-63, (1983).
15. **Sun, T-T, Green, H.:** Diferenciación of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of cornified envelope, *Cell*, 9: 511-521 (1976).

REIVINDICACIONES

1. El uso de un agente seleccionado de entre el grupo que consiste en

- (i) nicotinamida (NA);
- (ii) adenosina difosfato ribosa cíclica (cADPR); y
- (iii) una combinación de NA y cADPR

para la preparación de una composición para el tratamiento de soriasis, ictiosis o enfermedades epidérmicas hiperproliferativas malignas.

2. El uso de una combinación de NA y al menos un metabolito de Vitamina D3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de soriasis, ictiosis o enfermedades epidérmicas hiperproliferativas malignas.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el metabolito de la Vitamina D3 es 1α , 25 dihidroxi vitamina D3.

4. El uso de una combinación de NA y metabolito de Vitamina A para la preparación de un medicamento para el tratamiento de soriasis, ictiosis o enfermedades epidérmicas hiperproliferativas malignas.

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el metabolito de la Vitamina D3 es ácido holo-trans-retinoico (atRA).

6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la enfermedad maligna se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma de células basales (CCB) y otros cánceres de piel no-melanoma (CPNM).

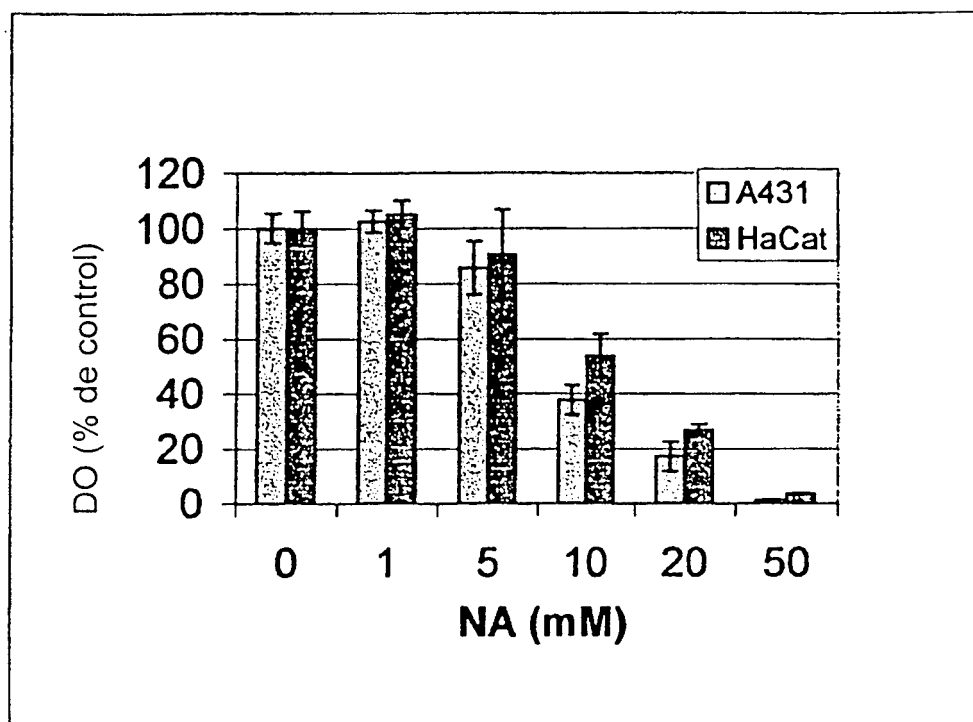


FIG.1A

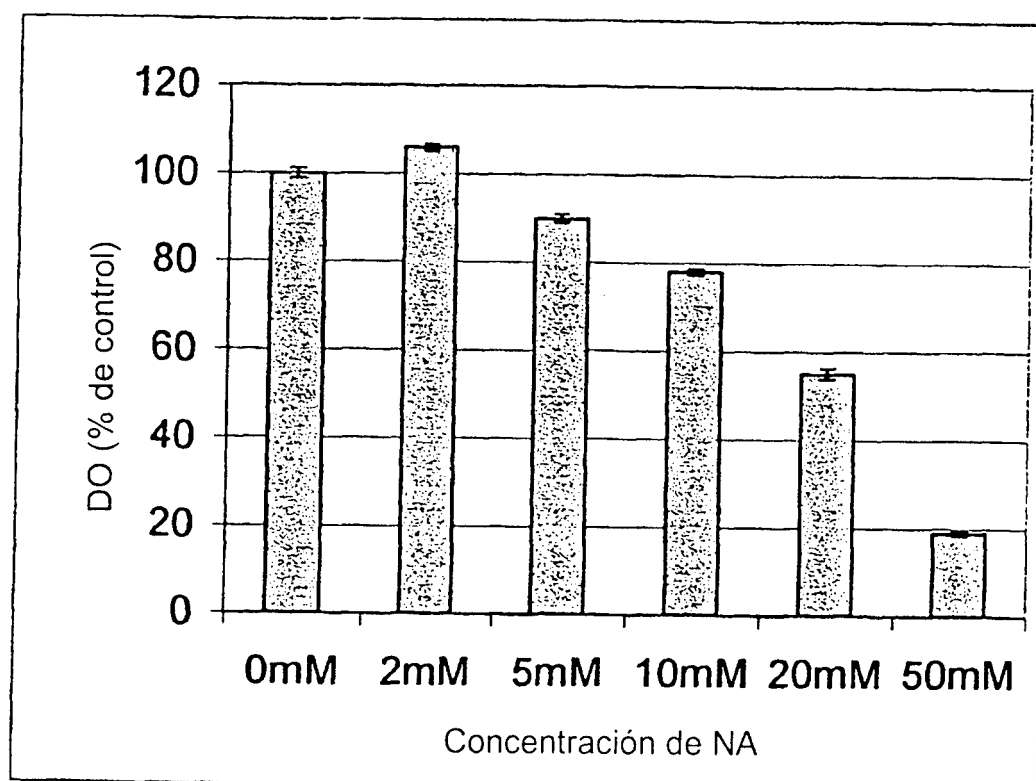


FIG.1B

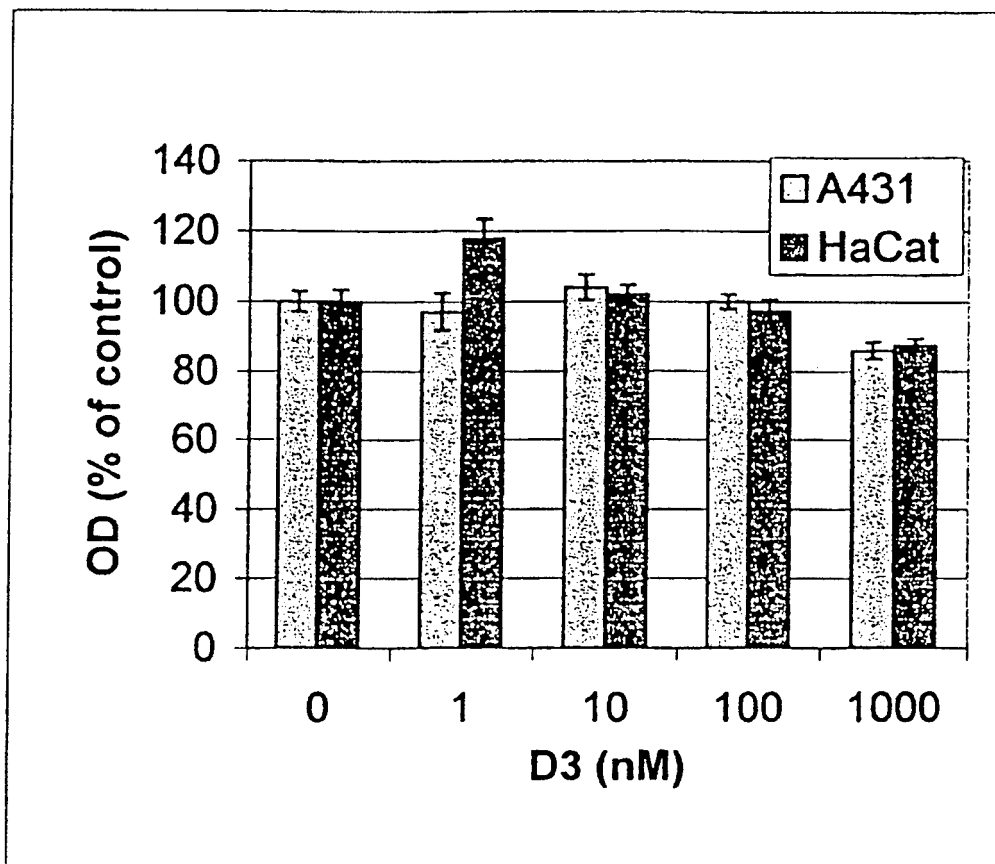


FIG.2

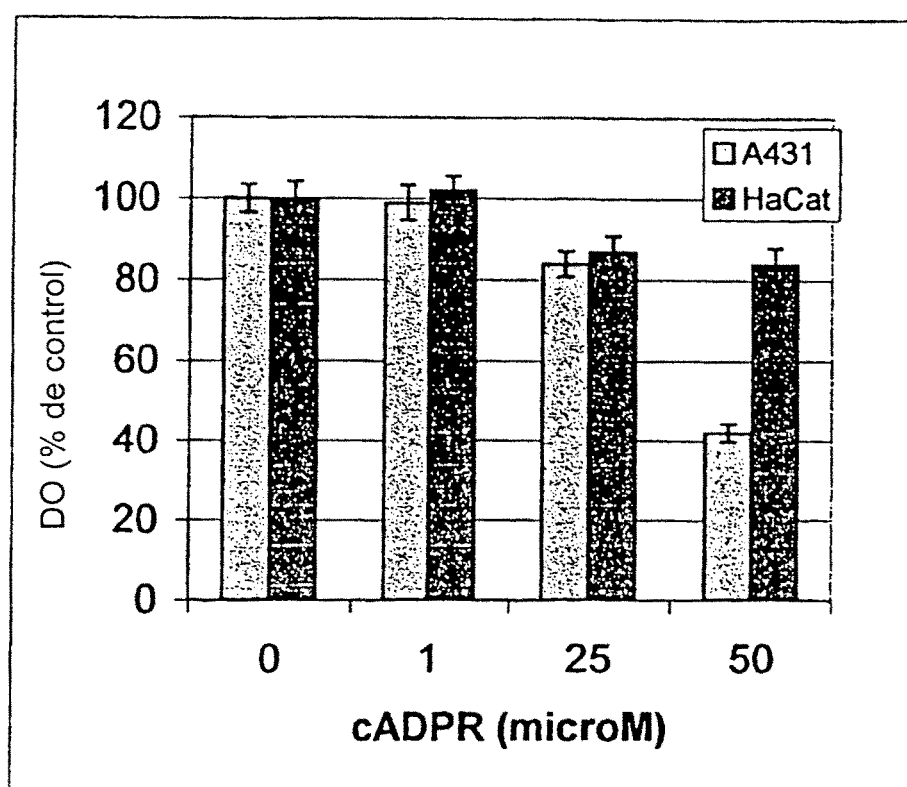


FIG.3

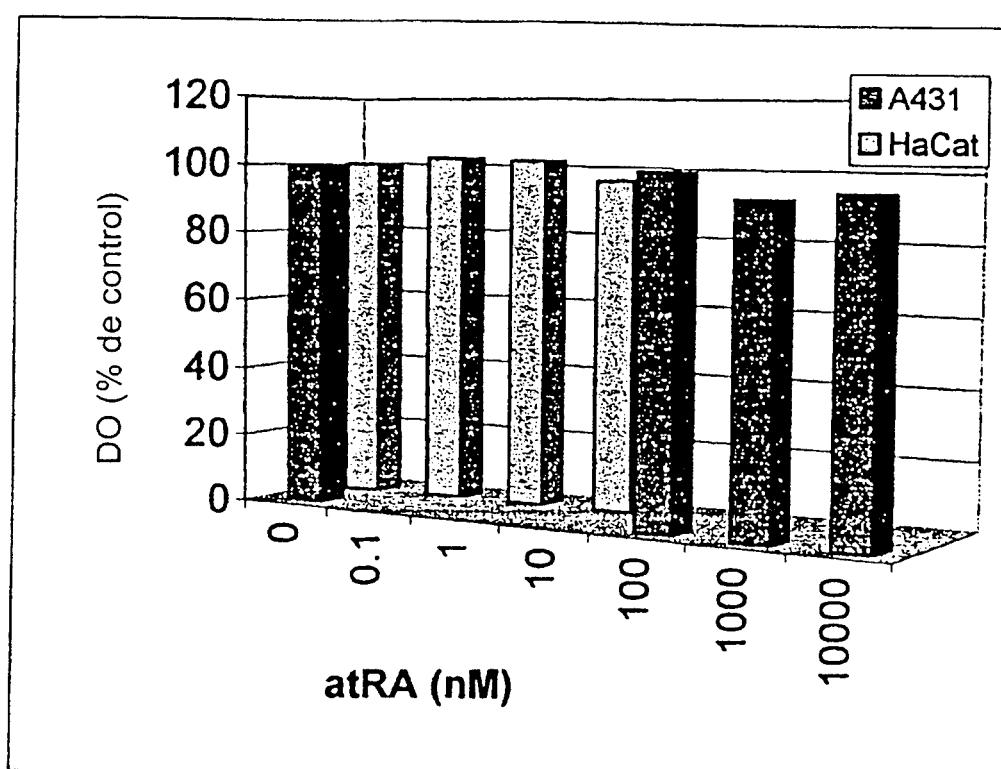


FIG.4

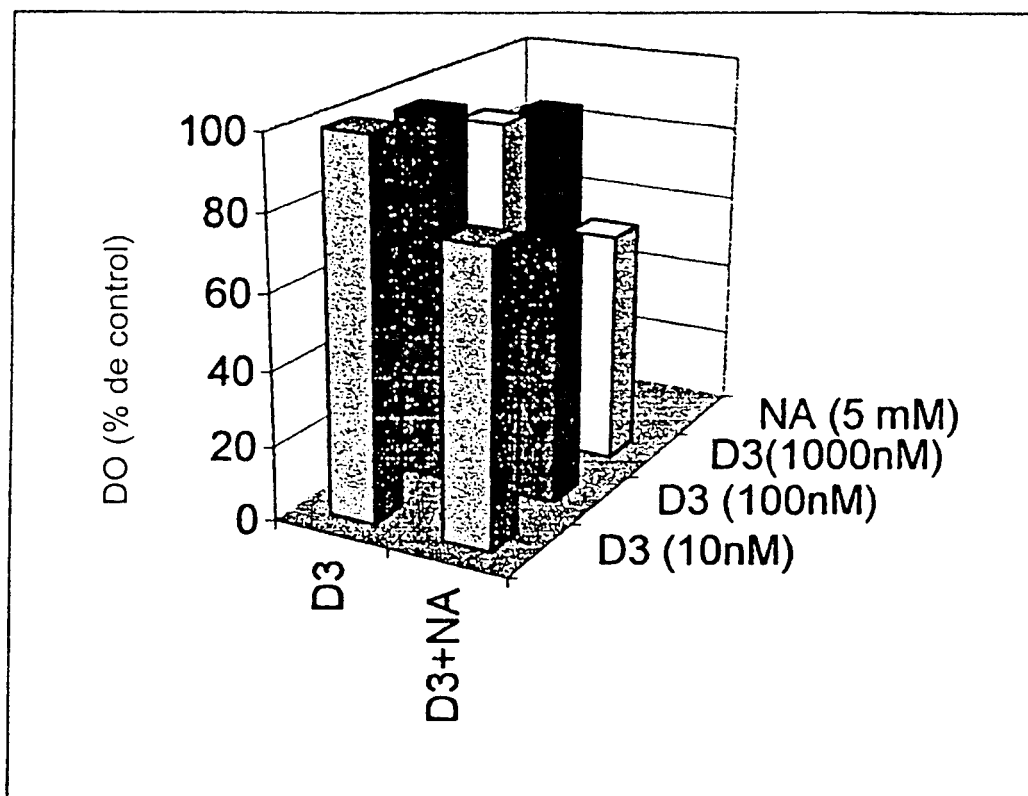


FIG.5A

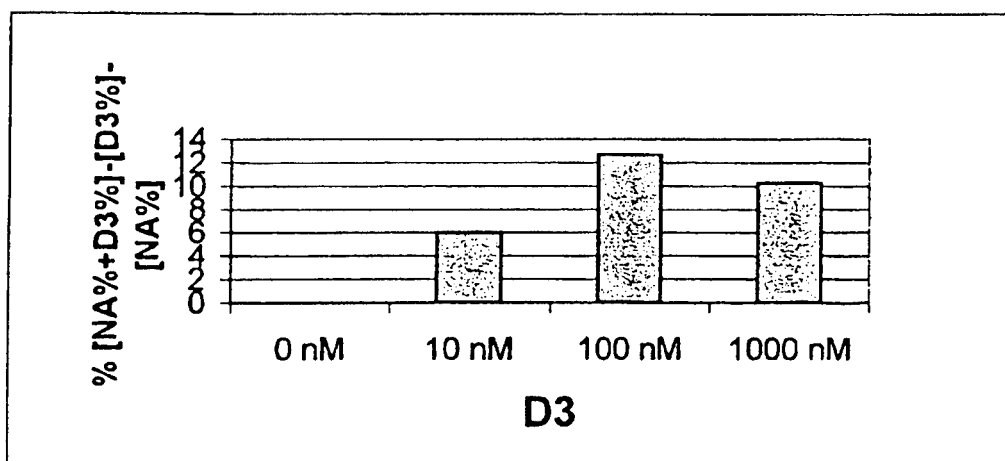


FIG.5B

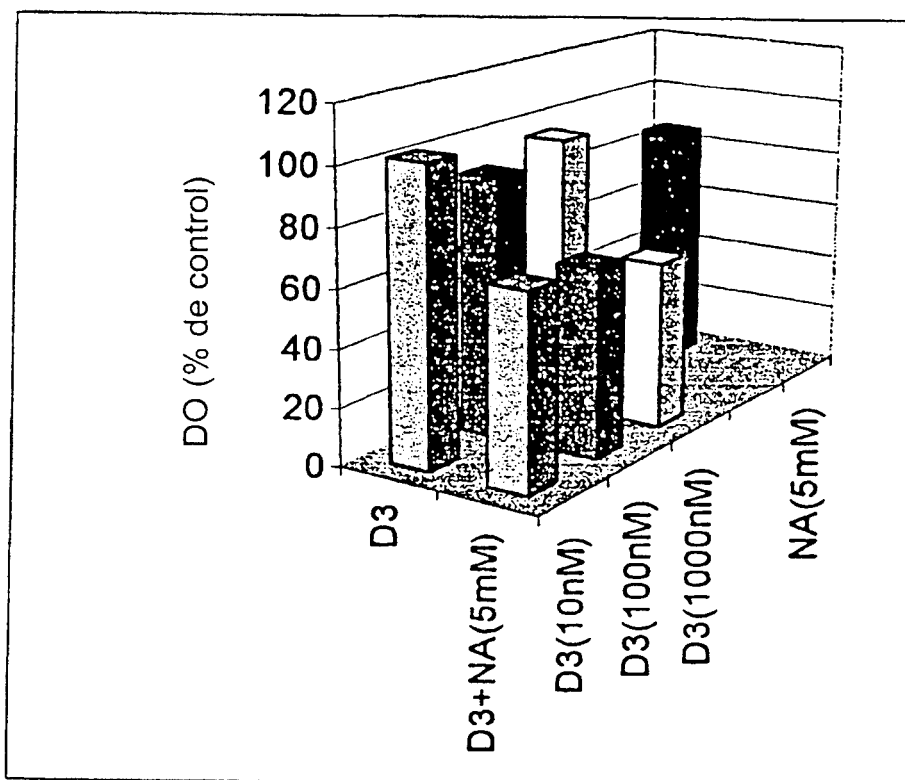


FIG.6A

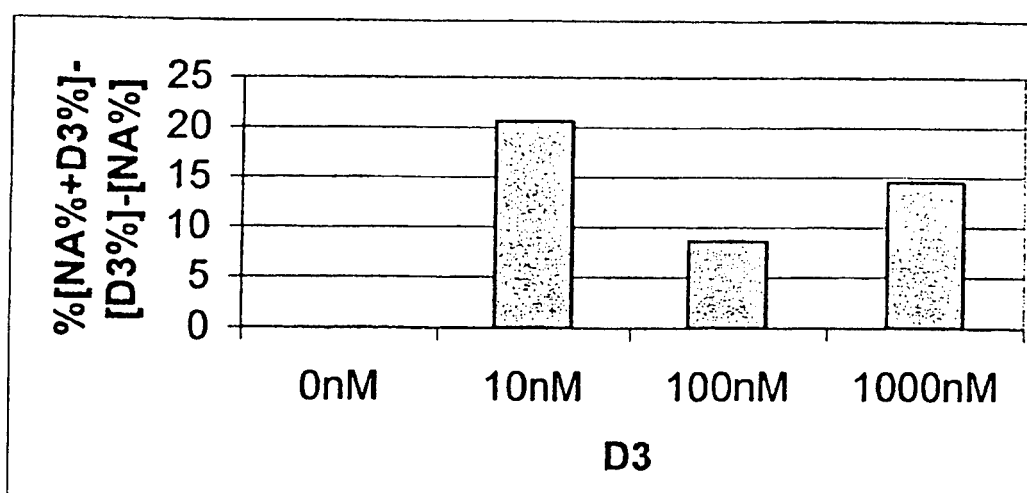


FIG.6B

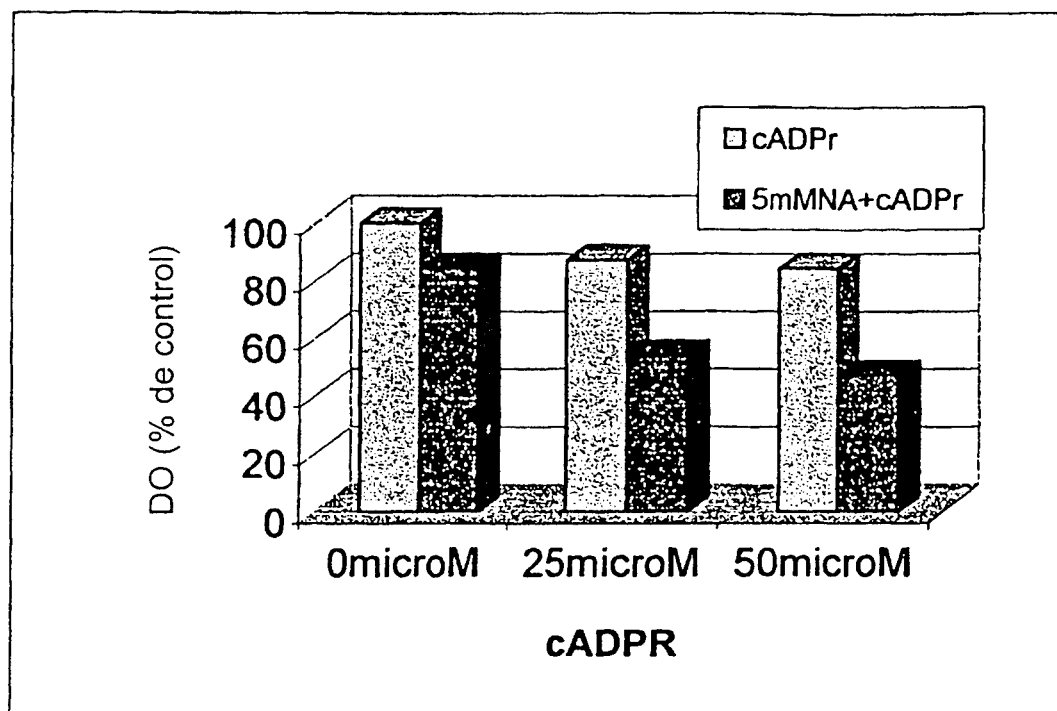


FIG.7A

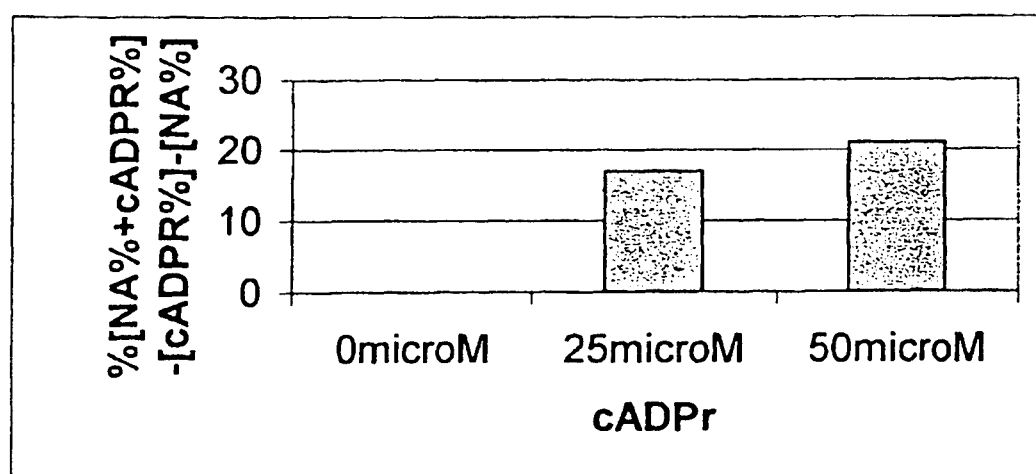


FIG.7B

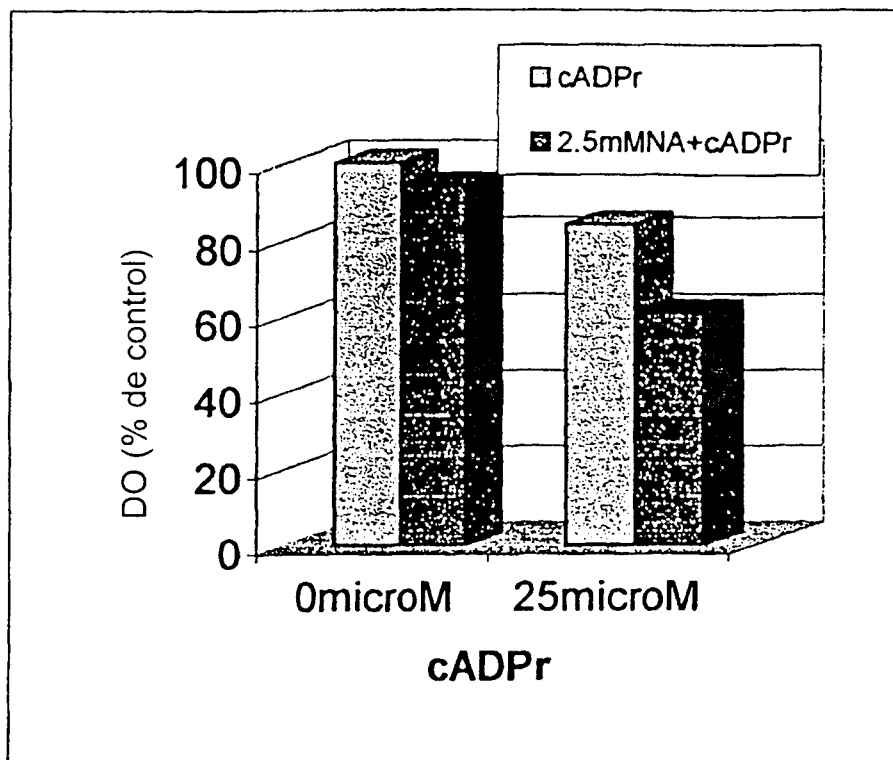


FIG.8A

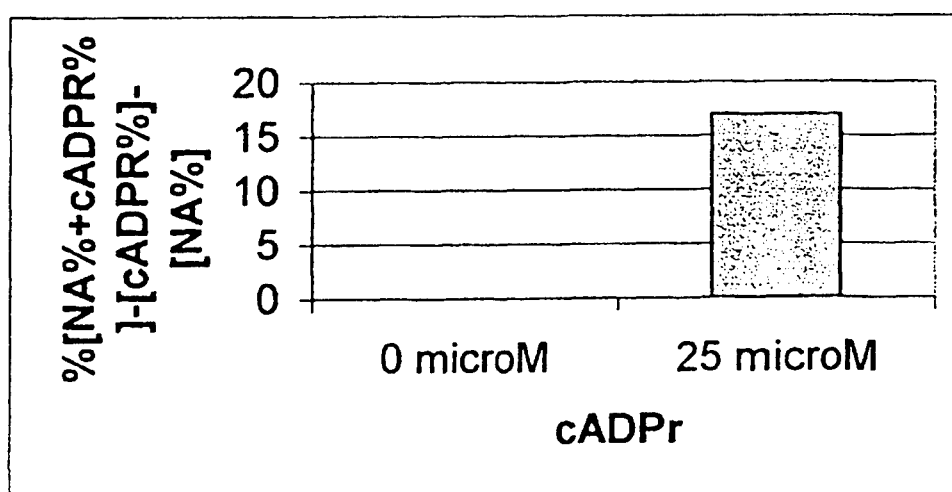


FIG.8B

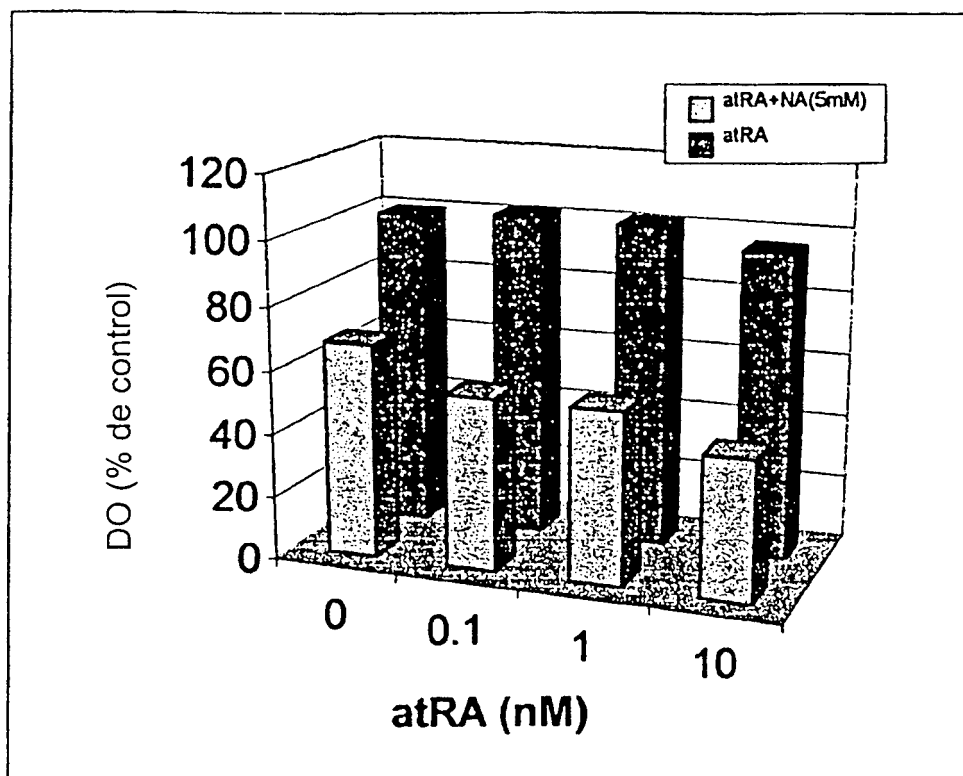


FIG.9A

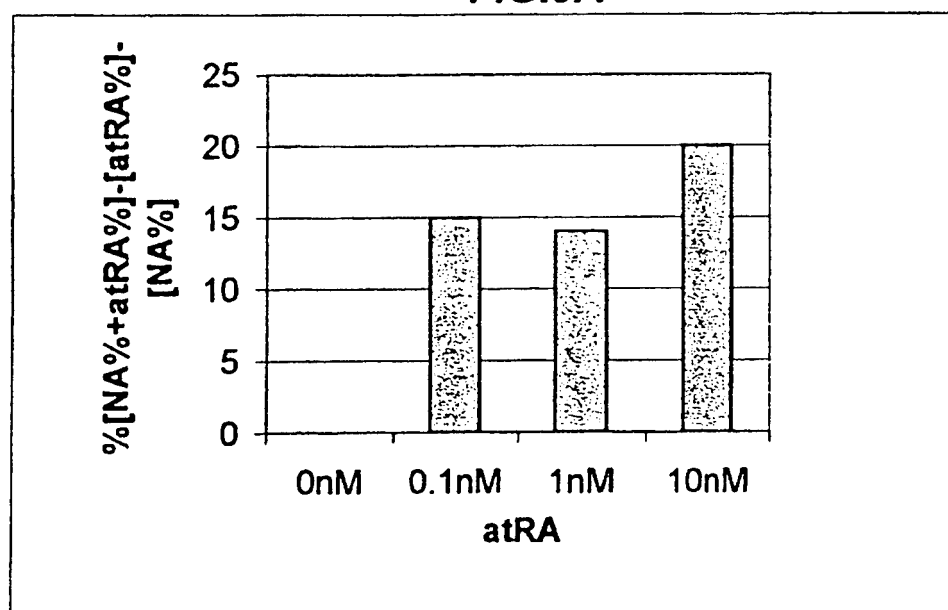


FIG.9B

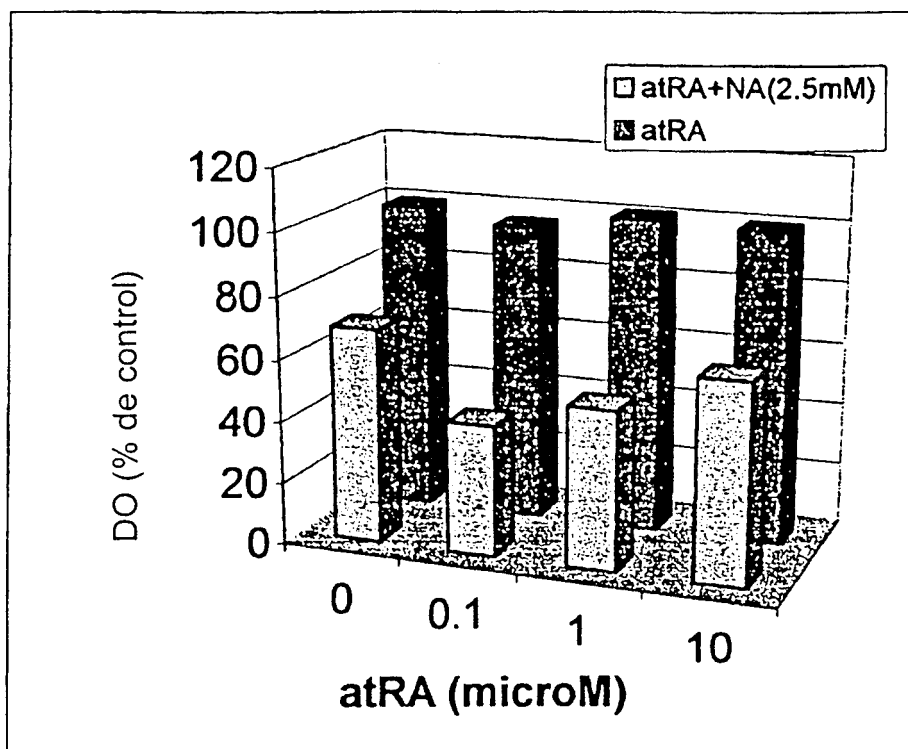


FIG.10A

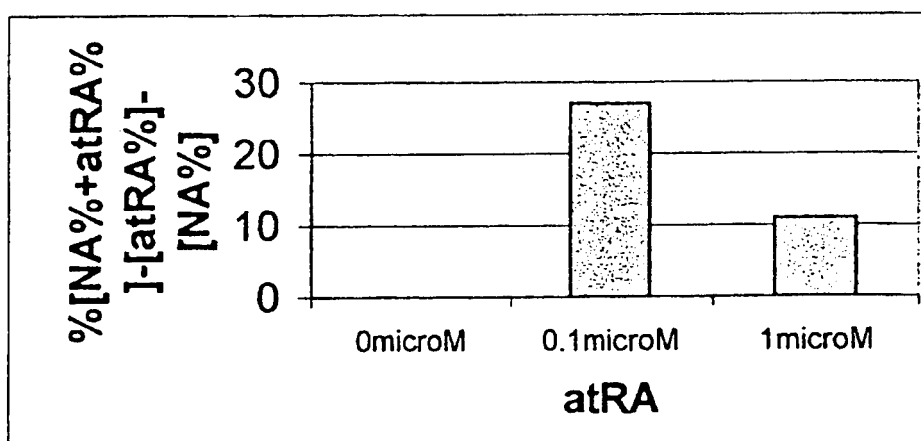


FIG.10B

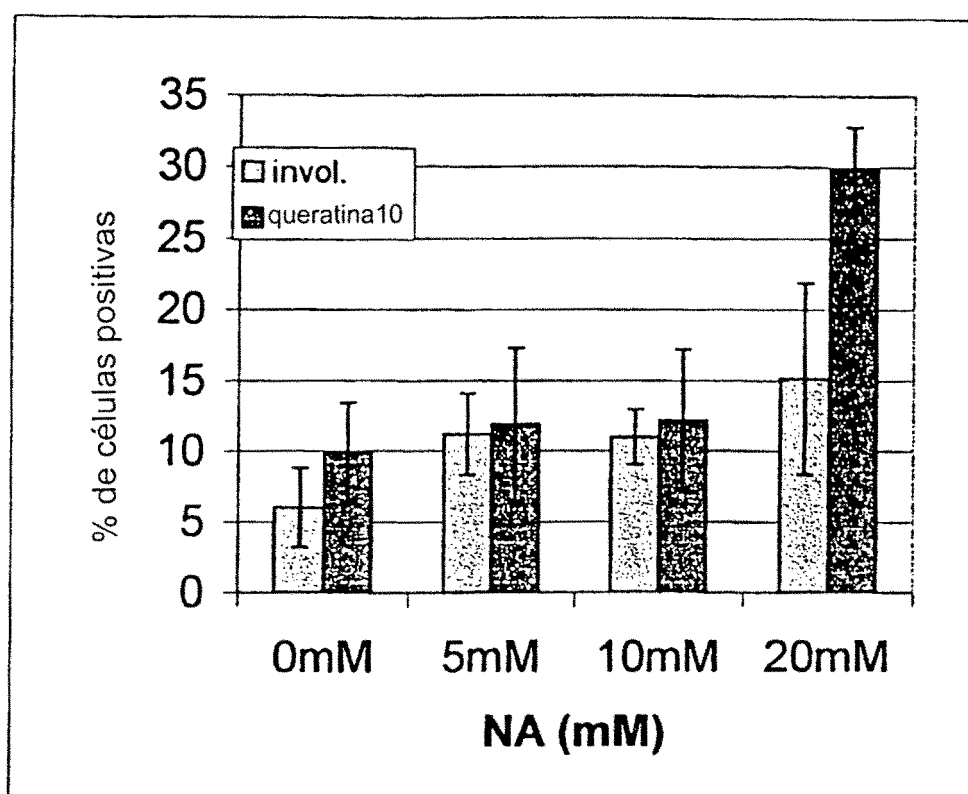


FIG.11

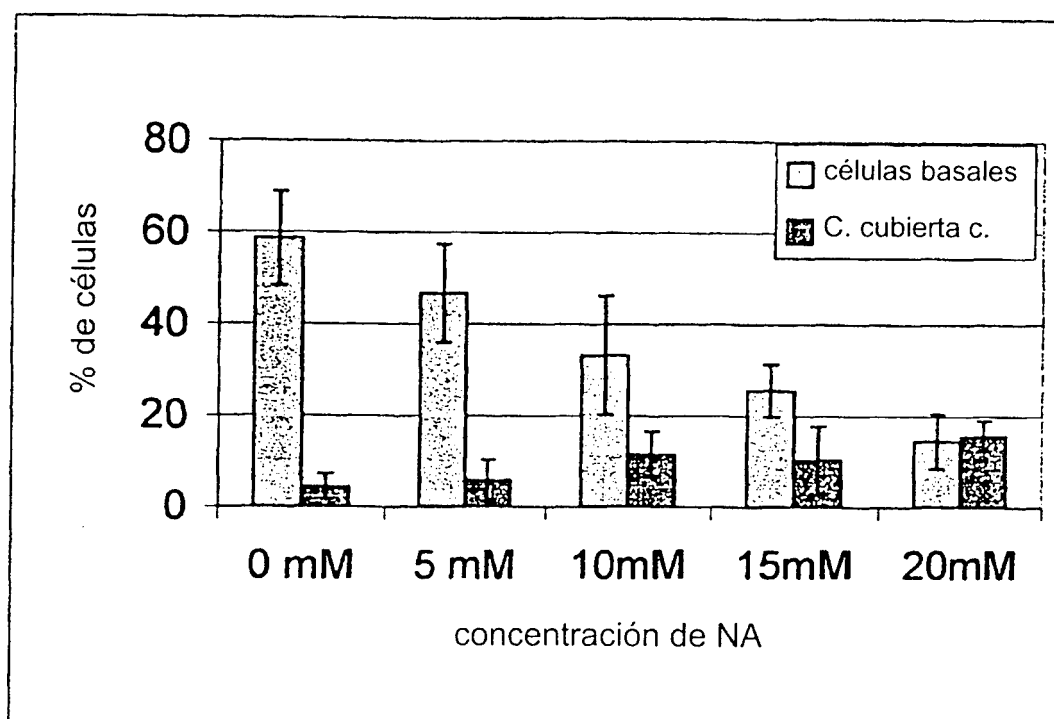


FIG.12

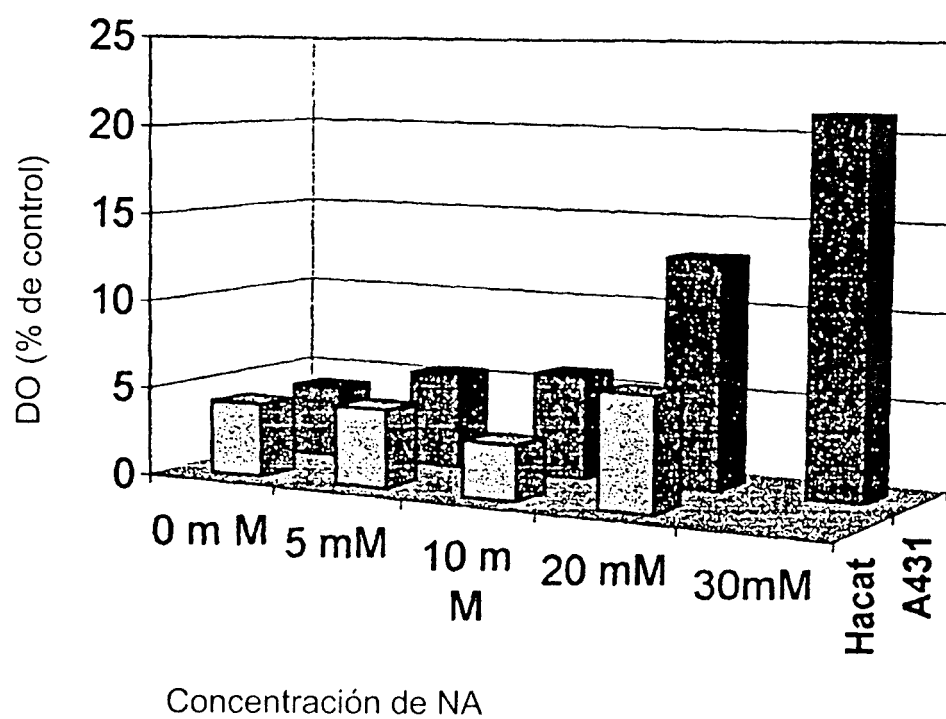


FIG.13

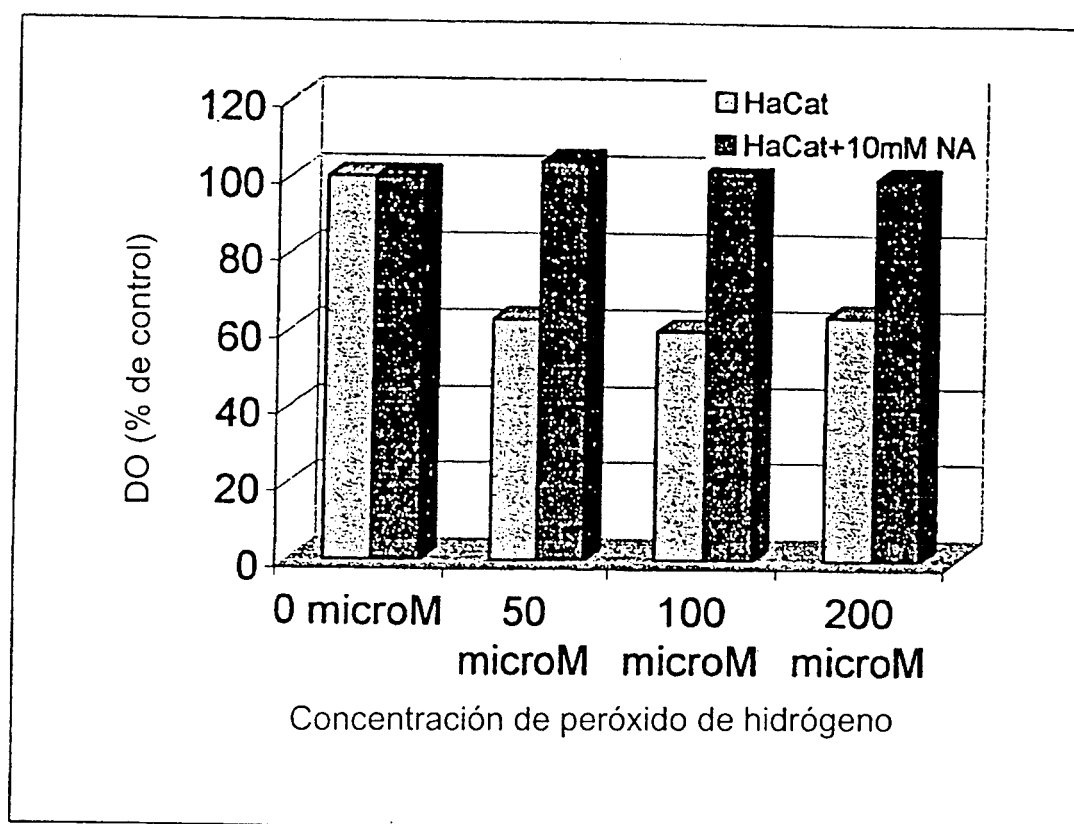


FIG.14