

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 750**

51 Int. Cl.:

A61K 31/593	(2006.01)
A61K 31/592	(2006.01)
A61K 31/59	(2006.01)
A61K 8/67	(2006.01)
A61P 17/14	(2006.01)
A61Q 9/04	(2006.01)
A61Q 7/00	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2010 PCT/US2010/044765**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO11019617**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2010 E 10808565 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2464357**

54 Título: **Vitamina D3 y análogos de la misma para tratar la alopecia**

30 Prioridad:

14.08.2009 US 234178 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2020

73 Titular/es:

**BERG LLC (100.0%)
500 Old Connecticut Path, Building B
Framingham, MA 01701, US**

72 Inventor/es:

**JIMENEZ, JOAQUIN, J. ;
NARAIN, NIVEN, RAJIN y
MCCOOK, JOHN, PATRICK**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 742 750 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vitamina D3 y análogos de la misma para tratar la alopecia

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/234.178, presentada el 14 de agosto de 2009. El contenido de la solicitud anterior se incorpora al presente documento en su totalidad.

10 **Antecedentes de la invención**

La alopecia es un efecto secundario habitual y angustiante de muchos agentes quimioterápicos y para el que actualmente existen pocas medidas preventivas eficaces. En un estudio reciente, treinta y cinco de cuarenta y seis pacientes que recibieron quimioterapia clasificaron la alopecia como un efecto secundario más perturbador que los vómitos (Tierney *et al.*, B. J. Cancer, 62: 527-528, 1990).

Actualmente, aquellos que padecen alopecia sólo pueden intentar regenerar el cabello caído mediante aplicaciones repetidas de esteroides tópicos o pueden intentar mantener el crecimiento del cabello mediante la aplicación tópica de minoxidil. Además, actualmente no hay agentes terapéuticos sometidos a prueba con la capacidad de prevenir la alopecia como efecto secundario durante el tratamiento con quimioterapia, aunque se han realizado algunos estudios prometedores. Por ejemplo, usando un modelo de rata joven, se ha demostrado que ImuVert, un modificador de respuesta biológica preparado a partir de la bacteria *Serratia marcescens*, protegió a los animales de la alopecia inducida por el arabinósido de citosina o la adriamicina (Hussein *et al.*, Science 249: 1564-1566, 1990) En estudios posteriores, se observó una protección similar frente a la alopecia inducida por ARA-C de la interleucina-1 (IL-1) beta recombinante (Jiménez *et al.*, FASEB J. 1991) A pesar de estos resultados prometedores, sigue existiendo la necesidad de un agente terapéutico seguro y eficaz que trate la alopecia en quienes padecen este trastorno y, además, prevenga la alopecia inducida por quimioterapia en quienes reciben tratamiento contra el cáncer.

30 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para administración tópica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de vitamina D, para su uso en un método de prevención o tratamiento de la alopecia inducida por quimioterapia, tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas.

Debe tenerse en cuenta que se contempla que todas las realizaciones descritas en el presente documento (anteriormente y a continuación) puedan combinarse con cualquier otra realización cuando corresponda, incluidas las realizaciones descritas sólo según uno de los aspectos de la invención, y las realizaciones descritas según diferentes aspectos de la invención.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra resultados de absorción total y balance de masas en los tres donantes de piel, y la distribución de calcitriol de piel cadavérica humana intacta durante 48 horas a partir de una aplicación única. Los resultados se muestran en la escala logarítmica como media \pm E.E. como masa total (ng/cm²).

La figura 2 muestra una curva de crecimiento a modo de ejemplo de células HEKa a lo largo de diferentes concentraciones de calcitriol presentes en los medios de crecimiento. Obsérvese la escala logarítmica de la concentración de calcitriol.

La figura 3 muestra una curva de crecimiento a modo de ejemplo de la línea celular de carcinoma de páncreas PaCa2, curva de crecimiento que no responde a la presencia de 0,1 μ g/ml de calcitriol.

Las figuras 4A y 4B muestran el crecimiento de células Hep-G2 y células MCF-7, respectivamente, en presencia de concentraciones crecientes de calcitriol.

La figura 5 muestra curvas de dosificación de erlotinib (Tarceva), un inhibidor de la Tyr cinasa de EGFR, en ausencia (\blacklozenge) o en presencia de 0,1 μ g/ml de calcitriol (\times).

La figura 6 muestra curvas de dosificación de gefinitib (Iressa), otro inhibidor de la Tyr cinasa de EGFR, en ausencia (\blacklozenge) o en presencia de 0,1 μ g/ml de calcitriol (\times).

La figura 7 muestra curvas de dosificación de sorafinib en ausencia (\blacklozenge) o en presencia de 0,1 μ g/ml de calcitriol (\times). Se sabe que el sorafenib inhibe varias cinasas (Raf, VEGF-R2, c-kit, PDGR-R).

65

- La figura 8 muestra curvas de dosificación de dasatinib en ausencia (♦) o en presencia de 0,1 µg/ml de calcitriol (×). El dasatinib inhibe las Tyr cinasas de BCR/ABL.
- 5 La figura 9 muestra curvas de dosificación de estaurosporina en ausencia (♦) o en presencia de 0,1 µg/ml de calcitriol (×). La estaurosporina es un inhibidor de cinasa relativamente inespecífico.
- La figura 10 muestra curvas de dosificación de cisplatino en ausencia (♦) o en presencia de 0,1 µg/ml de calcitriol (×). El cisplatino es un agente alquilante de ADN.
- 10 La figura 11 muestra curvas de dosificación de carboplatino en ausencia (♦) o en presencia de 0,1 µg/ml de calcitriol (×). El carboplatino también es un agente alquilante de ADN.
- La figura 12 muestra curvas de dosificación de irinotecán en ausencia (♦) o en presencia de 0,1 µg/ml de calcitriol (×).
- 15 La figura 13 muestra curvas de dosificación de paclitaxel en ausencia (♦) o en presencia de 0,1 µg/ml de calcitriol (×).
- La figura 14 muestra curvas de dosificación de 5-FU en ausencia (♦) o en presencia de 0,1 µg/ml de calcitriol (×).
- 20 La figura 15 muestra curvas de dosificación de gemcitabina en ausencia (♦) o en presencia de 0,1 µg/ml de calcitriol (×).
- La figura 16 muestra curvas de dosificación de doxorubicina en ausencia (♦) o en presencia de 0,1 µg/ml de calcitriol (×).
- 25 La figura 17 muestra curvas de dosificación de tamoxifeno en ausencia (♦) o en presencia de 0,1 µg/ml de calcitriol (×).
- 30 La figura 18 muestra que calcitriol 0,1 µg/ml protege los queratinocitos normales HEKa frente a 5-FU, mientras que no afecta apreciablemente a los valores de DE₅₀ de 5-FU frente a células cancerosas.
- La figura 19 muestra que el calcitriol no altera apreciablemente el efecto citotóxico de la doxorubicina frente a la línea celular de cáncer SkBr-3.
- 35 La figura 20A muestra que, en ratas Sprague Dawley que reciben etopósido, una formulación tópica de calcitriol protege frente a la alopecia inducida por quimioterapia (AIQ) de una manera dependiente de la dosis. Panel izquierdo: ratas que reciben sólo etopósido; panel central: ratas que reciben etopósido y aplicación tópica de 0,1 µg de calcitriol en una formulación tópica; panel derecho: ratas que reciben etopósido y aplicación tópica de 0,3 mg de calcitriol en una formulación tópica. La figura 20B muestra resultados similares en las ratas Long Evans con pelaje con color.
- 40 La figura 21 muestra que una formulación tópica de calcitriol (dosis total de 0,2 µg) protege a las ratas Long Evans frente a la alopecia inducida por ciclofosfamida (CTX).
- 45 La figura 22A muestra que una formulación tópica de calcitriol (dosis total de 0,2 µg) protege a las ratas Long Evans frente a la alopecia inducida por quimioterapia de combinación de CTX-doxorubicina. La figura 22B muestra un resultado protector similar con el calcitriol de la formulación tópica de calcitriol en ratas tratadas por alopecia inducida por quimioterapia de combinación de citarabina-doxorubicina. El efecto protector de una formulación tópica de calcitriol en ratas tratadas sólo con citarabina se muestra en la figura 22C.
- 50 La figura 23 muestra que una formulación tópica de calcitriol (dosis total de 0,2 µg) protege a las ratas Long Evans a las que se les inyectó MIAC51 (células de cloroleucemia) frente a la alopecia inducida por CTX.
- 55 La figura 24 muestra que, en experimentos *in vivo* realizados en ratas Long Evans a las que se les inyectó MIAC51 (células de cloroleucemia), una formulación tópica de calcitriol no protege a las células cancerosas frente a la quimioterapia.
- 60 Las figuras 25A y 25B muestran el nivel estimado de calcitriol recuperado (ng/mg) del estrato córneo de la epidermis de minicerdos y el resto de la epidermis. La cantidad se expresa como la media ± D.E. de calcitriol recuperado. nd = ninguno detectado, na = no disponible.
- La figura 26 muestra la correlación casi lineal entre la dosis de calcitriol aplicada al nivel en tejido de calcitriol recuperado en la epidermis, con un intervalo de concentraciones de calcitriol de 3 a 100 µg/ml.
- 65

La figura 27 ilustra el efecto del calcitriol sobre el primer ciclo anágeno de ratas con cloroleucemia que reciben ciclofosfamida. La figura 27A representa ratas que reciben ciclofosfamida sola, la figura 27B. representa ratas que reciben ciclofosfamida y vehículo, mientras que la figura 27C representa ratas que reciben ciclofosfamida y calcitriol.

5 La figura 28 ilustra el efecto del calcitriol sobre el segundo ciclo anágeno de ratas con cloroleucemia que reciben ciclofosfamida. De izquierda a derecha, ratas tratadas con ciclofosfamida sola, ratas tratadas con ciclofosfamida y vehículo y ratas tratadas con ciclofosfamida y calcitriol.

10 La figura 29 ilustra el efecto de calcitriol sobre el primer ciclo anágeno de ratas con cloroleucemia que reciben ciclofosfamida en combinación con doxorubicina. La figura 29A representa ratas que reciben ciclofosfamida y doxorubicina solas, la figura 29B representa ratas que reciben ciclofosfamida, doxorubicina y vehículo, mientras que la figura 29C representa ratas que reciben ciclofosfamida, doxorubicina y calcitriol.

15 La figura 30 ilustra el efecto del calcitriol sobre el segundo ciclo anágeno de ratas con cloroleucemia que reciben ciclofosfamida en combinación con doxorubicina. De izquierda a derecha, ratas tratadas con ciclofosfamida y doxorubicina solas, ratas tratadas con ciclofosfamida, doxorubicina y vehículo y ratas tratadas con ciclofosfamida, doxorubicina y calcitriol.

20 La figura 31 ilustra el efecto de calcitriol sobre el primer ciclo anágeno de ratas con cloroleucemia que reciben ciclofosfamida en combinación con doxorubicina y citarabina. La figura 31^a representa ratas que reciben ciclofosfamida, doxorubicina y citarabina solas, la figura 31B representa ratas que reciben ciclofosforamida, doxorubicina y citarabina y vehículo, mientras que la figura 31C representa ratas que reciben ciclofosfamida, doxorubicina, citarabina y calcitriol.

25 La figura 32 ilustra el efecto del calcitriol sobre el segundo ciclo anágeno de ratas con cloroleucemia que reciben ciclofosfamida en combinación con doxorubicina y citarabina. De izquierda a derecha, ratas tratadas con ciclofosfamida, doxorubicina y citarabina solas, ratas tratadas con ciclofosfamida, doxorubicina, citarabina y vehículo y ratas tratadas con ciclofosfamida, doxorubicina, citarabina y calcitriol.

30 La figura 33 ilustra el efecto de calcitriol sobre el primer ciclo anágeno de ratas con cloroleucemia que reciben ciclofosfamida en combinación con paclitaxel y etopósido. La figura 33A representa ratas que reciben ciclofosfamida, paclitaxel y etopósido solos, la figura 33B representa ratas que reciben ciclofosforamida, paclitaxel, etopósido y vehículo, mientras que la figura 33C representa ratas que reciben ciclofosfamida, paclitaxel, etopósido y calcitriol.

35 La figura 34 ilustra el efecto del calcitriol sobre el segundo ciclo anágeno de ratas con cloroleucemia que reciben ciclofosfamida en combinación con paclitaxel y etopósido. De izquierda a derecha, ratas tratadas con ciclofosfamida, paclitaxel y etopósido solos, ratas tratadas con ciclofosfamida, paclitaxel, etopósido y vehículo y ratas tratadas con ciclofosfamida, paclitaxel, etopósido y calcitriol.

40 La figura 35 ilustra el efecto del calcitriol sobre el primer ciclo anágeno de ratas con cloroleucemia que reciben doxorubicina en combinación con paclitaxel y etopósido. La figura 35A representa ratas que reciben doxorubicina, paclitaxel y etopósido solos, la figura 35B representa ratas que reciben doxorubicina, paclitaxel, etopósido y vehículo, mientras que la figura 35C representa ratas que reciben doxorubicina, paclitaxel, etopósido y calcitriol.

45 La figura 36 ilustra el efecto del calcitriol sobre el segundo ciclo anágeno de ratas con cloroleucemia que reciben doxorubicina en combinación con paclitaxel y etopósido. De izquierda a derecha, ratas tratadas con doxorubicina, paclitaxel y etopósido solos, ratas tratadas con doxorubicina, paclitaxel, etopósido y vehículo y ratas tratadas con doxorubicina, paclitaxel, etopósido y calcitriol.

50 **Descripción detallada de la invención**

La invención descrita en el presente documento se basa en parte en el descubrimiento de que formulaciones tópicas de compuestos de vitamina D que pueden prevenir o tratar la alopecia (por ejemplo, alopecia inducida por quimioterapia) pueden administrarse selectivamente o acumularse en la capa de epidermis de la piel mientras se evita sustancialmente la administración a y/o acumulación en la capa de dermis más profunda. Esto puede ser ventajoso en determinados pacientes que se someten a un tratamiento de quimioterapia, en el que la acumulación más profunda de un compuesto de vitamina D puede dar como resultado una disminución de la eficacia del régimen de quimioterapia. Tales formulaciones tópicas también pueden ser ventajosas en pacientes que tienen estados médicos que pueden verse afectados negativamente por la presencia de una cantidad excesiva de compuestos de vitamina D, tales como pacientes que padecen cálculos renales, y cuyo estado puede empeorar con la movilización de calcio por determinados compuestos de vitamina D. Por tanto, en tales pacientes, la administración ideal del compuesto de vitamina D debe ser una administración local de una dosis eficaz mínima a la capa de epidermis de la piel, en lugar de a la capa de dermis que es rica en vasos sanguíneos.

65 La invención también se basa en parte en el descubrimiento de que los compuestos de vitamina D presentan un leve efecto estimulante del crecimiento sobre queratinocitos normales a una concentración/dosificación relativamente

baja, mientras que presentan un efecto inhibitor del crecimiento en las mismas células a una concentración/dosificación relativamente alta. Por tanto, la invención proporciona métodos y composiciones farmacéuticas que presentan un efecto protector óptimo frente a la alopecia sin provocar efectos inhibidores del crecimiento indeseables.

5 La invención se basa además en el descubrimiento de que los compuestos de vitamina D activan o inhiben la expresión de múltiples genes diana en queratinocitos normales, proporcionando por tanto una base para seleccionar los compuestos de vitamina D más adecuados para aplicaciones terapéuticas específicas, e identificar análogos de vitamina D adicionales con actividad biológica similar.

10 Aunque no se desea restringirse a ninguna teoría en particular, las formulaciones de la invención pueden ser ventajosas en cuanto a la minimización de la interferencia farmacológica con reactivos de quimioterapia. La capa dérmica de la piel es rica en vasos sanguíneos, y la penetración tópica de fármacos en esta capa puede provocar la interferencia farmacológica con reactivos quimioterápicos administrados por vía sistémica, lo que conduce a efectos protectores desfavorables para las células cancerosas.

15 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para administración tópica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de vitamina D para su uso en un método de prevención o tratamiento de la alopecia en un individuo, comprendiendo el método administrar de manera tópica al individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de vitamina D formulado para administrarse a la epidermis mientras se evita sustancialmente la administración a y/o acumulación en la dermis, tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas.

20 La expresión “evitar sustancialmente la administración a y/o acumulación en la dermis” incluye la administración a y/o acumulación en la dermis de menos del 25% del compuesto de vitamina D en comparación con la administración a y/o acumulación del compuesto de vitamina D en la epidermis, por ejemplo, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 1% o ninguna administración a y/o acumulación del compuesto de vitamina D en la dermis en comparación a la cantidad administrada a la epidermis. En algunas realizaciones, entre aproximadamente el 1% y el 25% del compuesto de vitamina D se administra a y/o acumula en la dermis, por ejemplo, entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 20%, entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 15%, entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10% o entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 5%, en comparación con la administración a y/o acumulación en la epidermis. En algunas realizaciones, el compuesto de vitamina D no se administra a y/o acumula en la dermis. En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto de vitamina D que se administra a, o se acumula en, la dermis es menor de aproximadamente 0,3 ng/cm², menos de aproximadamente 0,2 ng/cm² o menos de aproximadamente 0,1 ng/cm².

25 El término “alopecia” incluye la caída del cabello involuntaria completa o parcial de la cabeza o el cuerpo de un individuo e incluye alopecia areata (AA), alopecia total (AT), alopecia universal (AU) o alopecia inducida por quimioterapia (AIQ). La alopecia areata puede incluir alopecia areata difusa, alopecia areata unilocular, alopecia areata multilocular y alopecia areata de la barba. La invención se centra en la prevención o el tratamiento de la AIQ.

30 La alopecia es la descripción médica de la caída del cabello de la cabeza o el cuerpo, a veces hasta el grado de calvicie. A diferencia de la depilación estética habitual del vello corporal, la alopecia tiende a ser involuntaria e inoportuna, por ejemplo, alopecia andrógena. Sin embargo, también puede estar provocada por una compulsión psicológica por arrancarse el cabello (tricotilomanía) o las consecuencias imprevistas de las rutinas voluntarias de peinado (“alopecia de tracción” mecánica por coletas o trenzas excesivamente apretadas, o quemaduras en el cuero cabelludo por disoluciones cáusticas de alisador de pelo o planchas para el cabello). En algunos casos, la alopecia es una indicación de un problema médico subyacente, tal como la deficiencia de hierro.

35 Cuando la caída del cabello se produce sólo en una sección, se conoce como “alopecia areata”. En la alopecia areata humana, el cabello se cae de algunas o todas las áreas del cuerpo, generalmente del cuero cabelludo. Debido a que provoca calvicie en el cuero cabelludo, especialmente en las primeras fases, a veces se denomina calvicie puntual. En el 1%-2% de los casos, el estado puede extenderse a todo el cuero cabelludo (alopecia total) o a toda la epidermis (alopecia universal).

40 Los estados que se asemejan a AA y que tienen una causa similar, también aparecen en otras especies. El tipo más habitual de alopecia areata implica la caída del cabello en uno o más puntos redondos en el cuero cabelludo. El cabello también puede caerse de manera más difusa en todo el cuero cabelludo, en cuyo caso el estado se denomina alopecia areata difusa. La alopecia areata unilocular describe la calvicie en un sólo lugar que puede aparecer en cualquier parte de la cabeza. La alopecia areata multilocular se refiere a múltiples áreas de caída del cabello. La enfermedad puede limitarse sólo a la barba, en cuyo caso se denomina alopecia areata de la barba. Si al individuo se le cae todo el cabello del cuero cabelludo, la enfermedad se denomina alopecia areata total.

45 La “alopecia universal” es cuando se produce la caída completa del cabello en el cuerpo, de manera similar a cómo afecta la caída del cabello asociada con la quimioterapia a veces a todo el cuerpo.

5 La "alopecia andr6gena" (tambi6n conocida como alopecia androg6nica o alopecia androgen6tica) es una forma habitual de ca6da del cabello en humanos tanto de sexo femenino como masculino, chimpanc6s y orangutanes. En los humanos de sexo masculino en particular, este estado tambi6n se conoce habitualmente como calvicie de patr6n masculino. El cabello se cae en un patr6n bien definido, comenzando por encima de ambas sienes. Con el tiempo, la l6nea de crecimiento del cabello retrocede para formar una caracter6stica forma de "M". El cabello tambi6n se adelgaza en la coronilla. A menudo queda un reborde de cabello alrededor de los lados y la parte posterior de la cabeza, o el estado puede progresar hasta calvicie completa. El patr6n de ca6da del cabello en las mujeres difiere de la calvicie de patr6n masculino. En las mujeres, el cabello se vuelve m6s delgado en toda la cabeza y la l6nea de crecimiento del cabello no retrocede. La alopecia andr6gena en las mujeres rara vez conduce a calvicie total.

10 La expresi6n "prevenir la alopecia" incluye la detenci6n o supresi6n de la ca6da del cabello asociada con la alopecia antes de que se produzca.

15 La expresi6n "tratar la alopecia" incluye reducir la intensidad de la ca6da del cabello asociada con la alopecia o reducir la extensi6n de la ca6da del cabello asociada con la alopecia. En algunas realizaciones, el tratamiento de la alopecia incluye la mejora de la alopecia.

20 El t6rmino "administrar" incluye proporcionar una o m6s dosis del compuesto de vitamina D al individuo en una cantidad eficaz para prevenir o tratar la alopecia. Los expertos en la t6cnica pueden determinar tasas de administraci6n 6ptimas para un protocolo de administraci6n dado del compuesto de vitamina D usando pruebas de determinaci6n de dosificaci6n convencionales realizadas con respecto a los compuestos espec6ficos que est6n utiliz6ndose, las composiciones particulares formuladas, el modo de aplicaci6n, el sitio de administraci6n particular y similares.

25 La expresi6n "administraci6n t6pica" incluye administrar una o m6s dosis del compuesto de vitamina D a la piel del individuo en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la alopecia.

30 La piel contiene muchas c6lulas y estructuras especializadas, y tiene diversas funciones importantes, tales como servir como barrera protectora que interact6a con el entorno, ayudando a mantener la temperatura corporal adecuada, recopilando informaci6n sensorial del entorno y desempe6ando un papel activo en el sistema inmunitario.

35 La piel tiene tres capas: la epidermis, la dermis y el tejido subcut6neo. La epidermis es la capa externa de la piel. Su grosor var6a en diferentes tipos de piel. Es el m6s delgado en los p6rpados con aproximadamente 0,05 mm y el m6s grueso en las palmas y las plantas de los pies con aproximadamente 1,5 mm. De abajo hacia arriba, la epidermis contiene cinco capas: estrato basal, estrato espinoso, estrato granular, estrato transl6cido (opcional en algunas pieles) y estrato c6rneo.

40 El estrato basal es la capa inferior de los queratinocitos en la epidermis y es responsable de renovar constantemente las c6lulas epid6rmicas. Esta capa contiene s6lo una fila de c6lulas madre columnares indiferenciadas que se dividen con mucha frecuencia. La mitad de las celdas se diferencian y se mueven a la siguiente capa para comenzar el proceso de maduraci6n. La otra mitad permanece en la capa basal y se divide repetidamente para reponer la capa basal. Las c6lulas que se mueven hacia la capa espinosa (tambi6n denominada capa de c6lulas espinosas) cambian de ser columnares a poligonales. En esta capa, las c6lulas comienzan a sintetizar queratina. Las c6lulas en el estrato granular, o capa granular, han perdido sus n6cleos y se caracterizan por agrupaciones oscuras de material citoplasm6tico. Hay mucha actividad en esta capa a medida que se producen y organizan prote6nas de queratina y l6pidos impermeables. La capa del estrato transl6cido s6lo est6 presente en la piel gruesa, en la que ayuda a reducir la fricci6n y las fuerzas de cizallamiento entre el estrato c6rneo y el estrato granular. Las c6lulas en la capa del estrato c6rneo se conocen como comeocitos. Estas c6lulas se han aplanado y se componen principalmente de prote6na de queratina que proporciona resistencia a la capa pero tambi6n permite la absorci6n de agua. La estructura de la capa del estrato c6rneo parece simple, pero esta capa es responsable de mantener la integridad y la hidrataci6n de la piel, una funci6n muy importante.

50 La dermis tambi6n var6a en grosor dependiendo de la ubicaci6n de la piel. Mide unos 0,3 mm en el p6rpado y unos 3,0 mm en la espalda. La dermis se compone de tres tipos de tejido que est6n presentes en su totalidad, no en capas: col6geno, tejido el6stico y fibras reticulares. Las dos capas de la dermis son las capas papilar y reticular. La capa papilar superior contiene una disposici6n delgada de fibras de col6geno. La capa reticular inferior es m6s gruesa y est6 compuesta por fibras de col6geno gruesas que est6n dispuestas en paralelo a la superficie de la piel. La dermis contiene muchas c6lulas y estructuras especializadas. Por ejemplo, los vasos sangu6neos y los nervios atraviesan esta capa. Los fol6culos pilosos tambi6n est6n situados en esta capa con el m6sculo piloerector que se une a cada fol6culo. Una porci6n del fol6culo piloso tambi6n contiene c6lulas madre capaces de regenerar la epidermis da6ada. Las c6lulas madre pueden estar presentes en la uni6n dermoepid6rmica (UDE). Las gl6ndulas seb6ceas (de grasa) y las gl6ndulas apocrinas (de olor) est6n asociadas con el fol6culo. Esta capa tambi6n contiene gl6ndulas ecrinas (sudor6paras), pero no est6n asociadas con los fol6culos pilosos. El tejido subcut6neo es una capa de grasa y tejido conjuntivo que alberga vasos sangu6neos y nervios m6s grandes. Esta capa es importante en la regulaci6n de la temperatura de la propia piel y del cuerpo. El tama6o de esta capa var6a en todo el cuerpo y de una

persona a otra.

5 En consecuencia, tal como se usa en el presente documento, "epidermis" incluye las cinco capas (cuando están presentes), incluida la capa de unión entre la epidermis y la dermis (por ejemplo, unión dérmica-epidérmica o UDE) y células madre que regeneran las capas epidérmicas (por ejemplo, células madre foliculares y células madre epidérmicas).

10 En algunas realizaciones, el compuesto de vitamina D se administra de manera tópica y/o se acumula en la epidermis mientras se evita sustancialmente la administración a y/o acumulación en la dermis. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "que evita sustancialmente la administración a y/o acumulación en la dermis" significa una administración a y/o acumulación en la dermis de menos del 25% del compuesto de vitamina D en comparación con la administración a y/o acumulación del compuesto de vitamina D en la epidermis; preferiblemente incluye no más de aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5% o aproximadamente el 0% de administración a/acumulación del compuesto de vitamina D en la dermis. En una realización más preferida, no hay administración a/acumulación detectable del compuesto de vitamina D en la dermis.

20 En determinadas realizaciones, los compuestos de vitamina D contenidos en las composiciones farmacéuticas de la invención se administran al individuo a lo largo de un periodo de aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses o aproximadamente un año. En algunas realizaciones, los compuestos de vitamina D de la invención pueden administrarse todos los días durante el periodo de tratamiento, en días alternos o una vez cada tres días.

30 En determinadas realizaciones, los compuestos de vitamina D contenidos en las composiciones farmacéuticas de la invención se administran una vez al día, dos veces al día o tres veces al día cada día de tratamiento.

35 En determinadas realizaciones, cada administración de los compuestos de vitamina D contenidos en las composiciones farmacéuticas de la invención se aplica a la misma ubicación, o a varias ubicaciones diferentes en el individuo. Cuando se aplica a diferentes ubicaciones, las dosis para cada ubicación pueden ser iguales o ajustarse en función de factores tales como el grosor de la piel y diferencias en la penetración del fármaco (si corresponde).

40 En determinadas realizaciones, los compuestos de vitamina D contenidos en las composiciones farmacéuticas de la invención se administran de manera tópica al cuero cabelludo dos veces al día cada día durante dos semanas consecutivas antes del comienzo de la quimioterapia para prevenir o reducir la intensidad de cualquier AIQ que pueda aparecer al comienzo de la quimioterapia.

45 El término "individuo" incluye aquellos animales que tienen la capacidad de padecer alopecia inducida por quimioterapia. En una realización, el individuo es un mamífero, por ejemplo, gatos, perros, primates, ratones, ratas, conejos, vacas, caballos, cabras, ovejas, cerdos, etc. En algunas realizaciones, el mamífero es un primate, por ejemplo, chimpancés, humanos, gorilas, bonobos, orangutanes, monos, etc. En otras formas de realización más, el mamífero es un humano.

50 En algunas realizaciones, el individuo está sometiéndose o está a punto de someterse a un tratamiento de quimioterapia. En una realización, el individuo aún no ha desarrollado síntomas de alopecia o la alopecia no ha comenzado antes de la administración. En algunas otras realizaciones, el individuo padece cáncer.

55 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en métodos de prevención o tratamiento de alopecia inducida por quimioterapia en un individuo mediante la administración tópica al individuo de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de vitamina D para prevenir o tratar la alopecia en dicho individuo, sin interferir sustancialmente o reducir la eficacia de un agente quimioterápico administrado conjuntamente.

60 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención no reducen sustancialmente la eficacia de la quimioterapia, especialmente la quimioterapia sistémica. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención potencian la eficacia de la quimioterapia. La expresión "sin interferir en la eficacia de un agente quimioterápico administrado conjuntamente" incluye la situación en la que el compuesto de vitamina D, cuando se administra con uno o más agentes quimioterápicos, no interrumpe la actividad biológica o terapéutica del uno o más agentes quimioterápicos ni evita que uno o más agentes quimioterápicos realicen su actividad biológica o terapéutica deseada. La expresión "sin reducir la eficacia de un agente quimioterápico administrado conjuntamente" incluye la situación en la que el compuesto de vitamina D, cuando se administra con uno o más agentes

quimioterápicos, no disminuye la actividad biológica o terapéutica del uno o más agentes quimioterápicos.

Los métodos y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse con cualquier agente quimioterápico o combinación de agentes quimioterápicos que tengan un efecto citotóxico sobre el folículo piloso o la papila dérmica, o que sea capaz de otro modo de inducir alopecia. La expresión “agente quimioterápico”, “quimioterapia” y “régimen quimioterápico” incluyen antraciclinas (adriamicina/doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina), 5-FU, tamoxifeno, irinotecán, paclitaxel (Taxol), carboplatino, etopósido, Cytosan/ciclofosfamida, cisplatino, erlotinib (Tarceva), gemcitabina, estaurosporina, vincristina, imatinib (Gleevec), gefitinib (Iressa), sorafenib, dasatinib, dactinomomicina, hexametamelamina (HMM, altretamina), ifosfamida, bleomicina, metotrexato, docetaxel (Taxotere), vindesina, vinorelbina, topotecán, amsacrina, citarabina, busulfano, melfalán, vinblastina, lomustina (CCNU), tiotepa, gemcitabina, carmustina (BCNU), mitroxantrona, mitomicina C, procarbazona, 6-mercaptopurina, estreptoizotocina, fludarabina, raltitrexato (Tomudex), capecitabina, y equivalentes de los mismos.

En algunas realizaciones, la quimioterapia es quimioterapia sistémica.

Los métodos y las composiciones farmacéuticas de la invención preferiblemente no reducen sustancialmente la eficacia de la quimioterapia, especialmente la quimioterapia sistémica. Preferiblemente, los métodos y las composiciones farmacéuticas de la invención potencian la eficacia de la quimioterapia.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que contiene el compuesto de vitamina D se administra conjuntamente con un agente quimioterápico. La expresión “administrado conjuntamente con un agente quimioterápico” incluye la administración de la composición farmacéutica que contiene el compuesto de vitamina D sustancialmente al mismo tiempo que el agente quimioterápico. Por ejemplo, la composición farmacéutica que contiene el compuesto de vitamina D puede administrarse conjuntamente con el agente quimioterápico; la composición farmacéutica que contiene el compuesto de vitamina D puede administrarse en primer lugar, e inmediatamente seguido por la administración del agente quimioterápico o el agente quimioterápico puede administrarse en primer lugar, e inmediatamente seguido por la administración de la composición farmacéutica que contiene el compuesto de vitamina D.

En algunas otras realizaciones, la composición farmacéutica que contiene el compuesto de vitamina D se administra al individuo antes de la aparición de alopecia (por ejemplo, antes de la caída del cabello). En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica que contiene el compuesto de vitamina D se administra al individuo después del comienzo de la quimioterapia, pero antes del comienzo de la alopecia. En otras realizaciones, el individuo aún no ha desarrollado síntomas de alopecia (por ejemplo, la alopecia no ha comenzado). La composición farmacéutica que contiene el compuesto de vitamina D puede administrarse al individuo antes de la quimioterapia o de manera concurrente a la quimioterapia.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” incluye la cantidad de un compuesto de vitamina D necesaria o suficiente para prevenir o tratar la alopecia en un individuo. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de factores tales como la estatura y el peso del sujeto, el tipo de enfermedad, etc. Un experto habitual en la técnica podría estudiar los factores mencionados anteriormente y realizar la determinación con respecto a la cantidad eficaz del compuesto de vitamina D sin excesiva experimentación.

La composición farmacéutica que contiene los compuestos de vitamina D de la invención puede administrarse de manera tópica a un individuo que lo necesite a un volumen de dosificación equivalente a aproximadamente 0,001 μg -5 μg de calcitriol/ cm^2 . En determinadas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 0,01 μg -0,5 μg de calcitriol/ cm^2 , o aproximadamente 0,1 μg -0,5 μg de calcitriol/ cm^2 .

La expresión “volumen de dosificación equivalente a calcitriol” incluye aquella cantidad de compuesto de vitamina D que tiene una actividad biológica y/o terapéutica sustancialmente similar a la actividad biológica y/o terapéutica que tiene 0,001 μg -5 μg de calcitriol/ cm^2 .

La expresión “concentración eficaz” incluye la concentración del compuesto de vitamina D en una formulación tópica que es necesaria o suficiente para prevenir o tratar la alopecia en un individuo. En determinadas realizaciones, la concentración del compuesto de vitamina D en la formulación tópica es de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 ó 400 μg /ml.

En determinadas realizaciones, la dosis total del compuesto de vitamina D es equivalente a aproximadamente 0,025-400 μg de calcitriol/75 kg de peso corporal. En determinadas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 0,1-100 μg de calcitriol/75 kg de peso corporal; aproximadamente 0,4-25 μg de calcitriol/75 kg de peso corporal; o aproximadamente 1, 2, 3, 5 ó 10 μg de calcitriol/75 kg de peso corporal. En determinadas realizaciones, el intervalo inferior de la dosis total es equivalente a aproximadamente 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 ó 2 μg de calcitriol/75 kg de peso corporal. En determinadas realizaciones, el intervalo alto de la dosis total es equivalente a aproximadamente 400, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2 ó 1 μg de calcitriol/75 kg de peso corporal.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en la prevención o el tratamiento de la alopecia en un individuo mediante la administración tópica al individuo de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de vitamina D, en las que dicho compuesto de vitamina D, cuando se administra de manera tópica al individuo a una concentración eficaz de:

- 5 (1) aproximadamente 50 µg/ml, no provoca toxicidad después de al menos aproximadamente 25 días consecutivos de administración del fármaco; o (2) aproximadamente 100 µg/ml, no provoca toxicidad después de al menos aproximadamente 7 días consecutivos de administración del fármaco.

Los posibles efectos secundarios tóxicos provocados por la administración de un compuesto de vitamina D pueden incluir, por ejemplo, hipercalcemia, que tiene síntomas que incluyen anorexia, dolor óseo, cansancio, vómitos, diarrea, estreñimiento, poliurea, prurito, insuficiencia renal, un sabor metálico en la boca, preteinuria, cilindros urinarios, azoemia o calcificación metastásica.

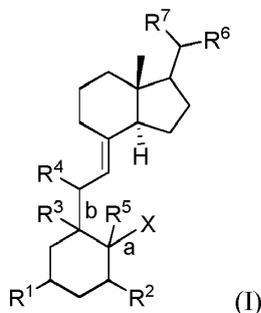
- 10

En la invención, el compuesto de vitamina D está formulado para administrarse a/acumularse en la epidermis humana, especialmente la epidermis del cuero cabelludo o la región del cuello, evitando sustancialmente la administración a/acumulación en la dermis. Un experto en la técnica podría determinar fácilmente la cantidad del compuesto de vitamina D, o la falta del mismo, administrado a/acumulado en la dermis y/o la epidermis usando el ejemplo 1.

- 15

La expresión "compuesto de vitamina D" se refiere a compuestos de fórmula I:

- 20



en la que

- 25

a y b son cada uno independientemente un enlace sencillo o doble;

X es -CH₂ cuando a es un enlace doble, o X es hidrógeno o un alquilo sustituido con hidroxilo cuando a es un enlace sencillo;

- 30 R¹ es hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo, tri-alquilsililo o alquilo, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';

R² es hidrógeno, hidroxilo, -O-tri-alquilsililo o alquilo, alcoxilo o alquenilo, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';

- 35 R³ está ausente cuando b es un doble enlace o R³ es hidrógeno, hidroxilo o alquilo, o R³ y R¹ pueden unirse junto con los átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo carbocíclico de 5-7 miembros cuando b es un enlace sencillo;

R⁴ está ausente cuando b es un enlace doble o hidrógeno, halógeno o hidroxilo cuando b es un enlace sencillo;

- 40

R⁵ está ausente cuando a es un doble enlace o R⁵ es hidrógeno, halógeno o hidroxilo cuando a es un enlace sencillo;

- 45 R⁶ es alquilo, alquenilo, alquínilo, cicloalquilo, heterocíclico, alquil-O-alquilo, alquil-CO₂-alquilo opcionalmente sustituido con de uno a cinco, restos hidroxilo, oxo, halógeno, alcoxilo, arilo, heteroarilo, ciano, nitro o -NR'R'';

R⁷ es alquilo opcionalmente sustituido con de uno a tres restos hidroxilo, halógeno, alcoxilo, arilo, heteroarilo, ciano, nitro o -NR'R''; y

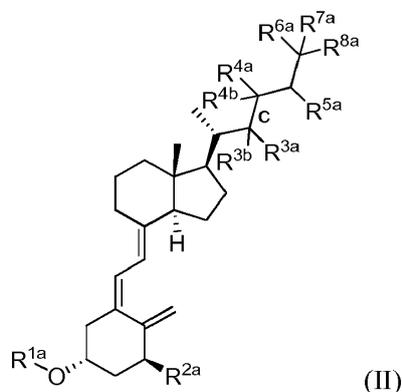
- 50 R' y R'' son cada uno, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alquilo o alcoxilo, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, R¹ es hidroxilo, R² es hidrógeno o hidroxilo, a es un doble enlace, R⁵ está ausente, X es

- 55

-CH₂, b es un doble enlace, R³ y R⁴ están ausentes, R⁶ es alquilo (por ejemplo, metilo) y R⁷ es alquilo (por ejemplo, un alquilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, un alquilo sustituido con hidroxilo o un alquilo sustituido con cicloalquilo, tal como -(CH₂)₃CH(CH₃)₂ o -(CH₂)₃COH(CH₃)₂) o alqueno (por ejemplo, -CH=CHCH(CH₃)CH(CH₃)₂).

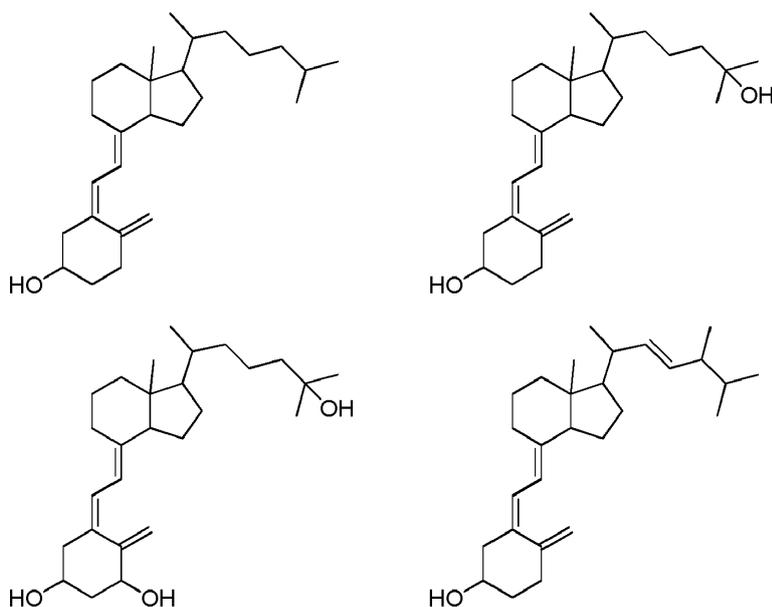
5 En determinadas realizaciones, el compuesto de vitamina D está representado por la fórmula (II):



en la que

- 10 c es un enlace sencillo o doble;
- R^{1a} es hidrógeno o alquilo, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';
- 15 R^{2a} es hidrógeno, hidroxilo, -O-trialquilsililo o alquilo, alcoxilo o alqueno, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';
- 20 R^{3a} y R^{4a} están ausentes cuando c es un doble enlace, o cada uno es independientemente hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxilo o alquilo opcionalmente sustituido con de uno a tres restos hidroxilo o halógeno cuando c es un enlace sencillo
- 25 R^{3b}, R^{4b}, R^{5a}, R^{6a}, R^{7a} y R^{8a} son cada uno, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxilo o alquilo opcionalmente sustituido con de uno a tres restos hidroxilo o halógeno, o dos cualesquiera de R^{6a}, R^{7a} y R^{8a} pueden unirse para formar un anillo carbocíclico de 3-7 miembros y sus sales farmacéuticamente aceptables.
- En una realización, el compuesto está representado por la fórmula (II), en la que R^{1a}, R^{3a} y R^{4a} son cada uno hidrógeno.
- 30 En otra realización, el compuesto está representado por la fórmula (II), en la que c representa un enlace sencillo.
- En aún otra realización, el compuesto está representado por la fórmula (II), en la que R^{6a} y R^{8a} son ambos metilo.
- En una realización, el compuesto está representado por la fórmula (II), en la que R^{1a} es hidrógeno.
- 35 En otra realización, el compuesto está representado por la fórmula (II), en la que R^{2a} es hidroxilo.
- En otra realización, el compuesto está representado por la fórmula (II), en la que R^{7a} es hidroxilo.
- 40 En aún otra realización, el compuesto está representado por la fórmula (II), en la que R^{5a} es hidroxilo.
- En una realización, R^{1a} es hidrógeno, R^{2a} es hidrógeno o hidroxilo, c es un enlace sencillo, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b} y R^{5a} son cada uno hidrógeno, R^{6a} y R^{7a} son cada uno alquilo (por ejemplo, metilo) y R^{8a} es hidrógeno o hidroxilo.
- 45 En otra realización, R^{1a} es hidrógeno, R^{2a} es hidrógeno o hidroxilo, c es un doble enlace, R^{3a} y R^{4a} están ausentes, R^{3b} y R^{4b} son hidrógeno, R^{5a} es alquilo (por ejemplo, metilo), R^{6a} y R^{7a} son cada uno alquilo (por ejemplo, metilo) y R^{8a} es hidrógeno o hidroxilo.
- En una realización, el compuesto de vitamina D se selecciona de las siguientes estructuras, o sus estereoisómeros o sales farmacéuticamente aceptables:

50



5 En determinadas realizaciones, el compuesto de vitamina D es 1,25-dihidroxitamina D3; 1,25-dihidroxi-16-en-23-in-colecalciferol; 1α -hidroxivitamina D3; $1\alpha,24$ -dihidroxitamina D3 o MC 903.

En otras realizaciones, el compuesto de vitamina D no es 1,25-dihidroxitamina D3; 1,25-dihidroxi-16-en-23-in-colecalciferol; 1α -hidroxivitamina D3; $1\alpha,24$ -dihidroxitamina D3 o MC 903.

10 Otros análogos, metabolitos, derivados y/o miméticos adecuados de los compuestos de vitamina D incluyen, por ejemplo, 1,25-dihidroxitamina D3 (también conocida como calcitriol), 1,25-dihidroxi-16-en-23-in-colecalciferol, y otros análogos de vitamina D, homólogos, miméticos y derivados de compuestos de vitamina D tales como los descritos en las siguientes patentes, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad: patentes
 15 estadounidenses n.^{os} 4.391.802 (derivados de la 1α -hidroxivitamina D); 4.717.721 (derivados de 1α -hidroxilo con una cadena lateral en 17 de mayor longitud que las cadenas laterales de colesterol o ergosterol); 4.851.401 (análogos de ciclopentano-vitamina D); 4.866.048 y 5.145.846 (análogos de vitamina D3 con cadenas laterales de alquinilo, alquenilo y alcanilo); 5.120.722 (trihidroxicalciferol); 5.547.947 (compuestos de fluoro-colecalciferol); 5.446.035 (vitamina D sustituida con metilo); 5.411.949 (23-oxa-derivados); 5.237.110 (compuestos de 19-nor-vitamina D); 4.857.518 (derivados hidroxilados de 24-homo-vitamina D). Otros ejemplos adecuados incluyen ROCALTROL (Roche Laboratories); calcitriol inyectable CALCIJEX; fármacos en investigación de Leo
 20 Pharmaceuticals, incluidos EB 1089 (24a,26a,27a, trihomo-22,24-dien- $1\alpha,25$ -(OH)2-D3, KH 1060 (20-epi-22-oxa-24a,26a,27a-trihomo- $1\alpha,25$ -(OH)2-D3), MC 1288 (1,25-(OH)2-20-epi-D3) y MC 903 (calcipotriol, $1\alpha,24s$ (OH)2-22-en-26,27-deshidro-D3); fármacos de Roche Pharmaceutical que incluyen 1,25-(OH)2-16-en-D3, 1,25-(OH)2-16-en-23-im-D3 y 25-(OH)2-16-en-23-in-D3; 22-oxacalciferol de Chugai Pharmaceuticals (22-oxa- $1\alpha,25$ -(OH)2-D3; 1α -(OH)-D5 de la Universidad de Illinois; y fármacos del Instituto de Química Médica-Schering AG que incluyen ZK 161422 (20-metil-1,25-(OH)2-D3) y ZK 157202 (20-metil-23-en-1,25-(OH)2-D3); 1α -(OH)-D2; 1α -(OH)-D3, 1α -(OH)-D4, 25-(OH)-D2; 25-(OH)-D3; y 25-(OH)-D4. Los ejemplos adicionales incluyen $1\alpha,25$ -(OH)2-26,27-d6-D3; $1\alpha,25$ -(OH)2-22-en-D3; $1\alpha,25$ -(OH)2-D3; $1\alpha,25$ -(OH)2-D2; $1\alpha,25$ -(OH)2-D4; $1\alpha,24,25$ -(OH)3-D3; $1\alpha,24,25$ -(OH)3-D2; $1\alpha,24,25$ -(OH)3-D4; 1α -(OH)-25-FD3; 1α -(OH)-25-FD4; 1α -(OH)-25-FD2; $1\alpha,24$ -(OH)2-D4; $1\alpha,24$ -(OH)2-D3; $1\alpha,24$ -(OH)2-D2; $1\alpha,24$ -(OH)2-25-FD4; $1\alpha,24$ -(OH)2-25-FD3; $1\alpha,24$ -(OH)2-25-FD2; $1\alpha,25$ -(OH)2-26,27-F6-22-en-D3; $1\alpha,25$ -(OH)2-26,27-F6-D3; $1\alpha,25S$ -(OH)2-26-F3-D3; $1\alpha,25$ -(OH)2-24-F2-D3; $1\alpha,25S,26$ -(OH)2-22-en-D3; $1\alpha,25R,26$ -(OH)2-22-en-D3; $1\alpha,25$ -(OH)2-D2; $1\alpha,25$ -(OH)2-24-epi-D3; $1\alpha,25$ -(OH)2-23-in-D3; $1\alpha,25$ -(OH)2-24R-F-D3; $1\alpha,25S,26$ -(OH)2-D3; $1\alpha,24R$ -(OH)2-25F-D3; $1\alpha,25$ -(OH)2-26,27-F6-23-in-D3; $1\alpha,25R$ -(OH)2-26-F3-D3; $1\alpha,25,28$ -(OH)3-D2; $1\alpha,25$ -(OH)2-16-en-23-in-D3; $1\alpha,24R,25$ -(OH)3-D3; $1\alpha,25$ -(OH)2-26,27-F6-23-en-D3; $1\alpha,25R$ -(OH)2-22-en-26-F3-D3; $1\alpha,25S$ -(OH)2-22-en-26-F3-D3; $1\alpha,25R$ -(OH)2-D3-26,26,26-d3; $1\alpha,25S$ -(OH)2-D3-26,26,26-d3; y $1\alpha,25R$ -(OH)2-22-en-D3-26,26,26-d3. Sin embargo, pueden hallarse ejemplos aún adicionales en la patente estadounidense n.^o 6.521.608, cuya divulgación completa se incorpora como referencia en el presente documento. Véanse también, por ejemplo,
 40 las patentes estadounidenses n.^{os} 6.503.893, 6.482.812, 6.441.207, 6.410.523, 6.399.797, 6.392.071, 6.376.480, 6.372.926, 6.372.731, 6.359.152, 6.329.357, 6.326.503, 6.310.226, 6.288.249, 6.281.249, 6.277.837, 6.218.430, 6.207.656, 6.197.982, 6.127.559, 6.103.709, 6.080.878, 6.075.015, 6.072.062, 6.043.385, 6.017.908, 6.017.907, 6.013.814, 5.994.332, 5.976.784, 5.972.917, 5.945.410, 5.939.406, 5.936.105, 5.932.565, 5.929.056, 5.919.986, 5.905.074, 5.883.271, 5.880.113, 5.877.168, 5.872.140, 5.847.173, 5.843.927, 5.840.938, 5.830.885, 5.824.811, 5.811.562, 5.786.347, 5.767.111, 5.756.733, 5.716.945, 5.710.142, 5.700.791, 5.665.716, 5.663.157, 5.637.742,
 45 5.612.325, 5.589.471, 5.585.368, 5.583.125, 5.565.589, 5.565.442, 5.554.599, 5.545.633, 5.532.228, 5.508.392, 5.508.274, 5.478.955, 5.457.217, 5.447.924, 5.446.034, 5.414.098, 5.403.940, 5.384.313, 5.374.629, 5.373.004,

5.371.249, 5.430.196, 5.260.290, 5.393.749, 5.395.830, 5.250.523, 5.247.104, 5.397.775, 5.194.431, 5.281.731, 5.254.538, 5.232.836, 5.185.150, 5.321.018, 5.086.191, 5.036.061, 5.030.772, 5.246.925, 4.973.584, 5.354.744, 4.927.815, 4.804.502, 4.857.518, 4.851.401, 4.851.400, 4.847.012, 4.755.329, 4.940.700, 4.619.920, 4.594.192, 4.588.716, 4.564.474, 4.552.698, 4.588.528, 4.719.204, 4.719.205, 4.689.180, 4.505.906, 4.769.181, 4.502.991, 4.481.198, 4.448.726, 4.448.721, 4.428.946, 4.411.833, 4.367.177, 4.336.193, 4.360.472, 4.360.471, 4.307.231, 4.307.025, 4.358.406, 4.305.880, 4.279.826 y 4.248.791, cuyas divulgaciones completas de cada una se incorporan como referencia en el presente documento.

Aún otros compuestos que pueden utilizarse incluyen miméticos de vitamina D tales como derivados de bis-arilo divulgados por la patente estadounidense n.º 6.218.430 y la publicación WO 2005/037755, cuyas divulgaciones completas de cada una se incorporan como referencia en el presente documento. Pueden hallarse ejemplos adicionales de compuestos miméticos de vitamina D no secosteroides adecuados para la presente invención en las patentes estadounidenses n.ºs 6.831.106; 6.706.725; 6.689.922; 6.548.715; 6.288.249; 6.184.422, 6.017.907, 6.858.595 y 6.358.939, cuyas divulgaciones completas de cada una se incorporan como referencia en el presente documento.

Sin embargo, otros análogos, metabolitos y/o derivados de vitamina D3 adecuados que pueden utilizarse incluyen los identificados en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0177374, cuya divulgación completa se incorpora como referencia en el presente documento.

La vitamina D3 se absorbe después de la ingestión de aceites de hígado de pescado o levadura irradiada. Las fuentes vegetales y animales contienen sólo los precursores inactivos de vitamina D, 7-deshidrocolesterol o ergosterol. El 7-deshidrocolesterol se almacena en la piel y la luz solar puede convertirlo en vitamina D3. Sin embargo, ya sea ingerido o formado mediante irradiación con radiación ultravioleta en la piel, la vitamina D debe transformarse en metabolitos activos. La vitamina D3 se convierte en 25-hidroxicolecalciferol por enzimas hepáticas. Luego en los riñones se forman dos compuestos 1,25-dihidroxicolecalciferol y 24,25-dihidroxicolecalciferol. Los metabolitos activos de la vitamina D desempeñan un papel importante en la absorción de calcio del tracto intestinal, la deposición ósea y la reabsorción ósea.

Los compuestos de vitamina D de la invención comparten determinadas actividades biológicas comunes, tales como la capacidad de prevenir la apoptosis en los queratinocitos, en parte a través de su capacidad de regular por incremento o por disminución determinadas expresiones de genes diana, por ejemplo, en queratinocitos normales (por ejemplo, HEKa). Por tanto, en determinadas realizaciones, los compuestos de vitamina D de la invención pueden presentar un perfil de regulación génica similar o idéntico como una cantidad equivalente de calcitriol, por ejemplo, en queratinocitos normales (por ejemplo, HEKa).

Tal como se usa en el presente documento, "cantidad equivalente" incluye la misma cantidad molar si los compuestos de vitamina D tienen sustancialmente la misma o igual actividad biológica o terapéutica en sustancialmente la misma cantidad molar. Sin embargo, cuando diferentes compuestos de vitamina D no son sustancialmente los mismos o iguales en cuanto a actividad biológica o terapéutica, la expresión "cantidad equivalente" incluye aquella cantidad de un compuesto de vitamina D que da lugar sustancialmente a la misma cantidad de actividad biológica o terapéutica en comparación con un compuesto de vitamina D de referencia (por ejemplo, calcitriol).

La expresión "perfil de regulación génica" incluye la lista o el espectro de genes que están modulados (por ejemplo, regulados por incremento o por disminución) de manera estadísticamente significativa (por ejemplo, $p < 0,05$) en comparación con controles apropiados. Por ejemplo, tras poner en contacto una célula con un compuesto de vitamina D durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 24 horas), una célula diana puede presentar un espectro de genes cuyo nivel de expresión de ARNm o proteína está modulado (por ejemplo, regulado por incremento o por disminución) en comparación con el control de tratamiento simulado/de vehículo. La lista de genes modulados (por ejemplo, regulados por incremento o por disminución) en el momento de la detección constituye una panorámica del perfil de expresión génica de la célula en ese momento específico.

La expresión "perfil de regulación génica similar" incluye la situación en la que más del 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o más del número total de genes diana examinados presentan sustancialmente el mismo sentido de expresión génica (por ejemplo, ambos regulados por incremento o ambos regulados por disminución, aunque la magnitud o el alcance de la regulación por incremento o por disminución en cada gen pueden diferir).

La expresión "perfil de regulación génica idéntico" incluye la situación en la que casi todos los genes diana examinados presentan el mismo sentido de expresión génica (por ejemplo, ambos regulados por incremento o ambos regulados por disminución, aunque la magnitud o el alcance de la regulación por incremento o por disminución en cada gen pueden diferir).

En una realización, un compuesto de vitamina D contenido en una composición farmacéutica de la invención fomenta la expresión de uno o más genes diana cuyos niveles de expresión se fomentan por una cantidad equivalente de un compuesto de vitamina D de referencia (por ejemplo, calcitriol). En otras realizaciones, el

compuesto de vitamina D contenido en una composición farmacéutica de la invención inhibe la expresión de uno o más genes cuyos niveles de expresión se inhiben por una cantidad equivalente de un compuesto de vitamina D de referencia (por ejemplo, calcitriol).

5 En determinadas realizaciones, un compuesto de vitamina D contenido en una composición farmacéutica de la invención puede modular la expresión de proteínas en queratinocitos normales. La expresión “expresión modular de proteínas” incluye la regulación por incremento y la regulación por disminución de las proteínas en queratinocitos normales. En algunas realizaciones, el compuesto de vitamina D modula la expresión de ARNm de HSPA2, HSF4,
10 ARNm de HSPB1 o DNAJC6. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto de vitamina D regula por incremento la expresión de ARNm de HSPA2 o HSF4, y/o regula por disminución la expresión de ARNm de HSPB1 o DNAJC6 en queratinocitos normales (por ejemplo, HEKa).

15 En determinadas realizaciones, un compuesto de vitamina D contenido en una composición farmacéutica de la invención modula la expresión de la proteína SLC1A1, KCNB2, KCNN4 o la proteína SLC1A3 en queratinocitos normales. En algunas realizaciones, el compuesto de vitamina D puede regular por incremento la expresión de la proteína SLC1A1, KCNB2 o KCNN4, y/o regular por disminución la expresión de la proteína SLC1A3 en queratinocitos normales (por ejemplo, HEKa).

20 En determinadas realizaciones, un compuesto de vitamina D contenido en una composición farmacéutica de la invención puede modular una o más proteínas en la tabla 3-1 y la tabla 3-2. Por ejemplo, en una realización, el compuesto de vitamina D puede regular por incremento la expresión de una o más proteínas en la tabla 3-1 en al menos aproximadamente 2 veces, y/o regular por disminución la expresión de una o más proteínas en la tabla 3-2 en al menos aproximadamente 2 veces, por ejemplo, en queratinocitos normales (por ejemplo, HEKa).

25 En determinadas realizaciones, un compuesto de vitamina D contenido en una composición farmacéutica de la invención puede inducir la sobreexpresión de una o más proteínas en cualquiera de las tablas 3-3, 3-4, 3-5 o 3-6, después de exposición durante aproximadamente 24 horas de queratinocitos normales (por ejemplo, HEKa) al compuesto de vitamina D.

30 En determinadas realizaciones, un compuesto de vitamina D contenido en una composición farmacéutica de la invención puede inducir la sobreexpresión en queratinocitos normales (por ejemplo, HEKa) de uno o más de: GST, queratina 1, queratina 17, galectina 1, S100 A9 (calprotectina) o S100 A13.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “alquilo” incluye un resto hidrocarbonado completamente saturado ramificado o no ramificado (por ejemplo, de cadena recta o lineal), que comprende de 1 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, de 1 a 7 átomos de carbono, o de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos representativos de restos alquilo incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *n*-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, *n*-heptilo.

40 Además, el término “alquilo” incluye tanto “alquilos no sustituidos” como “alquilos sustituidos”. Los ejemplos representativos de sustituyentes para restos alquilo son hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxilo, alqueniloxilo, alquiniloxilo, halógeno o amino (incluyendo alquilamino, di-alquilamino, arilamino, di-arilamino).

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “alcoxilo” incluye alquil-O-, en el que el alquilo se definió anteriormente en el presente documento. Los ejemplos representativos de restos alcoxilo incluyen, pero no se limitan a, metoxilo, etoxilo, propoxilo, 2-propoxilo, butoxilo, *terc*-butoxilo, pentiloxilo, hexiloxilo, ciclopropiloxi-, ciclohexiloxi- y similares. En algunas realizaciones, los grupos alcoxilo tienen aproximadamente 1-7 carbonos, por ejemplo 1-4 carbonos. El término alcoxilo incluye alcoxilo sustituido. Los ejemplos de grupos alcoxilo sustituidos
50 incluyen grupos alcoxilo halogenados. Ejemplos de grupos alcoxilo sustituidos con halógeno son fluorometoxilo, difluorometoxilo, trifluorometoxilo, clorometoxilo, diclorometoxilo y triclorometoxilo.

55 El término “alcoxialquilo” incluye grupos alquilo, tal como se definió anteriormente, en los que el grupo alquilo está sustituido con alcoxilo. Además, el término “alcoxialquilo” incluye tanto “alcoxialquilo no sustituido” como “alcoxialquilo sustituido”. Los ejemplos representativos de sustituyentes para restos alcoxialquilo incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxilo, alqueniloxilo, alquiniloxilo, halógeno o amino (incluyendo alquilamino, di-alquilamino, arilamino, di-arilamino).

60 El término “alquenilo” incluye hidrocarburos ramificados o no ramificados que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos representativos de restos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, vinilo, prop-1-enilo, alilo, butenilo, isopropenilo o isobutenilo. Además, el término “alquenilo” incluye tanto “alquenos no sustituidos” como “alquenos sustituidos”. Los ejemplos representativos de sustituyentes para restos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxilo, alqueniloxilo, alquiniloxilo, halógeno o amino (incluyendo alquilamino, di-alquilamino, arilamino, di-arilamino).

65 El término “alquinilo” incluye hidrocarburos ramificados o no ramificados que tienen al menos un triple enlace

carbono-carbono. Los ejemplos representativos de restos alquinilo incluyen, pero no se limitan a, etinilo, prop-1-inilo (propargilo), butinilo, isopropinilo o isobutinilo. Además, el término “alquinilo” incluye tanto “alquinos no sustituidos” como “alquinos sustituidos”. Los ejemplos representativos de sustituyentes para restos alquinilo incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxilo, alqueniloxilo, alquiniloxilo, halógeno o amino (incluyendo alquilamino, di-alquilamino, arilamino, di-arilamino).

Tal como se usa en el presente documento, el término “cicloalquilo” incluye grupos hidrocarbonados saturados o insaturados, monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos de 3-12 átomos de carbono, por ejemplo, 3-8 ó 3-7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos hidrocarbonados monocíclicos incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo y ciclohexenilo. Los ejemplos de grupos hidrocarbonados bicíclicos incluyen, por ejemplo, bornilo, indilo, hexahidroindilo, tetrahidronaftilo, decahidronaftilo, biciclo[2,1.1]hexilo, biciclo[2.2.1]heptilo, biciclo[2.2.1]heptenilo, 6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]heptilo y 2,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]heptilo, biciclo[2.2.2]octilo. Un ejemplo de un grupo hidrocarbonado tricíclico incluye, por ejemplo, adamantilo.

El término “cicloalquilo” incluye tanto “cicloalquilo no sustituido” como “cicloalquilo sustituido”. Los ejemplos representativos de sustituyentes para restos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxilo, alqueniloxilo, alquiniloxilo, halógeno o amino (incluyendo alquilamino, di-alquilamino, arilamino, di-arilamino).

El término “arilo” incluye grupos hidrocarbonados aromáticos monocíclicos o bicíclicos que tienen 6-20 átomos de carbono en la porción del anillo. Los ejemplos representativos de restos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, antracilo, fenantrilo o tetrahidronaftilo. Además, el término arilo incluye tanto “arilo no sustituido” como “arilo sustituido”. Los ejemplos representativos de sustituyentes para restos arilo incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxilo, alqueniloxilo, alquiniloxilo, halógeno o amino (incluyendo alquilamino, di-alquilamino, arilamino, di-arilamino).

El término “heteroarilo” incluye restos heteroarilo monocíclicos o bicíclicos, que contienen 5-10 miembros de anillo seleccionados de átomos de carbono y de 1 a 5 heteroátomos, seleccionados de O, N o S. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, tienilo, furilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxa-2,3-diazolilo, oxa-2,4-diazolilo, oxa-2,5-diazolilo, oxa-3,4-diazolilo, tia-2,3-diazolilo, tia-2,4-diazolilo, tia-2,5-diazolilo, tia-3,4-diazolilo, 3-, 4- o 5-isotiazolilo, 2-, 4- u 5-oxazolilo, 3-, 4- o 5-isoxazolilo, 3- o 5-1,2,4-triazolilo, 4- o 5-1,2,3-triazolilo, tetrazolilo, 2-, 3- o 4-piridilo, 3- o 4-piridazinilo, 3-, 4- o 5-pirazinilo, 2-pirazinilo, 2-, 4- o 5-pirimidinilo. Un grupo heteroarilo puede ser mono, bi, tri o policíclico.

El término “heteroarilo” incluye además grupos en los que un anillo heteroaromático se condensa con uno o más anillos de arilo, cicloalifáticos o de heterociclilo, en los que el radical o punto de unión está en el anillo heteroaromático o en el anillo de arilo condensado. Los ejemplos representativos de tales restos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, indolilo, isoindolilo, indazolilo, indolizínilo, purínilo, quinolizínilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinazolinilo, quinaxalinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, benzoisoquinolinilo, tieno[2,3-b]furanilo, furo[3,2-b]piranilo, 5H-pirido[2,3-d]-o-oxazinilo, 1H-pirazolo[4,3-d]-oxazolilo, 4H-imidazo[4,5-d]tiazolilo, pirazino[2,3-d]piridazinilo, imidazo[2,1-b]tiazolilo, imidazo[1,2-b][1,2,4]triazinilo, 7-benzo[b]tienilo, benzoxazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxapínilo, benzoxazinilo, 1H-pirrol[1,2-b][2]benzoazapínilo, benzofurilo, benzotiofenilo, benzotriazolilo, pirrolo[2,3-b]piridinilo, pirrolo[3,2-c]piridinilo, pirrolo[3,2-c]piridinilo, pirrolo[3,2-b]piridinilo, imidazo[4,5-b]piridinilo, imidazo[4,5-c]piridinilo, pirazolo[4,3-d]piridinilo, pirazolo[4,3-c]piridinilo, pirazolo[3,4-c]piridinilo, pirazolo[3,4-d]piridinilo, pirazolo[3,4-b]piridinilo, imidazo[1,2-a]piridinilo, pirazolo[1,5-a]piridinilo, pirrolo[1,2-b]piridazinilo, imidazo[1,2-c]pirimidinilo, pirido[3,2-d]pirimidinilo, pirido[4,3-d]pirimidinilo, pirido[3,4-d]pirimidinilo, pirido[2,3-d]pirimidinilo, pirido[2,3-b]pirazinilo, pirido[3,4-b]pirazinilo, pirimido[5,4-d]pirimidinilo, pirazino[2,3-b]pirazinilo o pirimido[4,5-d]pirimidinilo. Además, el término “heteroarilo” incluye tanto “heteroarilo no sustituido” como “heteroarilo sustituido”.

El anillo aromático de un grupo “arilo” o “heteroarilo” puede no estar sustituido o estar sustituido en una o más posiciones del anillo con sustituyentes que incluyen, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, alcoxilo, cicloalquiloxilo, alqueniloxilo, alquiniloxilo, ariloxilo, heteroariloxilo, heterocicliloxilo, arilalquiloxilo, heteroarilalquiloxilo, heterociclilalquiloxilo, cetonas (incluyendo alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alquilcarbonilo, aroilo, arilalquilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, heterociclilcarbonilo), ésteres (incluyendo alcoxycarbonilo, cicloalquiloxycarbonilo, ariloxycarbonilo, heteroariloxycarbonilo, heterocicliloxycarbonilo, alquilcarboniloxilo, cicloalquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, heteroarilcarboniloxilo, heterociclilcarboniloxilo), carbonatos (incluyendo alcoxycarboniloxilo, ariloxycarboniloxilo, heteroariloxycarboniloxilo), carbamatos (incluyendo alcoxycarboxilamino, ariloxycarbonilamino, alqueniloxycarbonilamino, alquiloxycarbonilamino, ariloxycarbonilamino, aminocarboniloxilo, alquilaminocarboniloxilo, di-alquilaminocarboniloxilo, arilaminocarboniloxilo), carbamoilo (incluyendo alquilaminocarbonilo, di-alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, arilalquilaminocarbonilo, alquenilaminocarbonilo), amido (incluyendo alquilcarbonilamino, alquilcarbonilalquilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino), arilalquilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, amino (incluyendo alquilamino, di-alquilamino, arilamino, di-arilamino y alquilalilamino), sulfonilo (incluyendo alquilsulfonilo, arilsulfonilo, arilalquilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alcoxilsulfonilo, ariloxilsulfonilo, heteroariloxilsulfonilo, cicloalquilsulfonilo, heterociclilsulfonilo), sulfamoilo, sulfonamido, fosfato,

fosfonato, fosfinato, tioéter (incluyendo alquiltio, ariltio, heteroariltio), ureido, imino, amidino, tiocarboxilo (incluyendo alquiltiocarbonilo, ariltiocarbonilo), sulfínico (incluyendo alquilsulfínico, arilsulfínico), carboxilo, en los que cada uno de los grupos hidrocarbonados mencionados anteriormente puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, halógeno, hidroxilo o alcoxilo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "heterociclilo" o "heterociclo" incluye anillos o sistemas de anillos no aromáticos saturados o insaturados, no sustituidos o sustituidos, por ejemplo, que es un sistema de anillos monocíclico de 4, 5, 6 ó 7 miembros, bicíclico de 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 miembros o tricíclico de 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 miembros y contiene al menos un heteroátomo seleccionado de O, S y N, en el que el N y S también pueden oxidarse opcionalmente a diversos estados de oxidación. En una realización, el resto heterociclilo representa un anillo monocíclico saturado que contiene 5-7 átomos en el anillo y que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional, seleccionado de O, S o N. El grupo heterocíclico puede unirse en un heteroátomo o un átomo de carbono. El heterociclilo puede incluir anillos condensados o en puente, así como anillos espirocíclicos. Los ejemplos de heterocíclicos incluyen, por ejemplo, dihidrofuranilo, dioxolanilo, dioxanilo, ditianilo, piperazinilo, pirrolidina, dihidropiranilo, oxatolanilo, ditiolano, oxatiano, tiomorfolino, oxiranilo, aziridinilo, oxetanilo, oxepanilo, azetidino, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, pirrolidinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, morfolino, piperazinilo, azepanilo, oxapinilo, oxazepanilo, oxatiano, tiepanilo, azepanilo, dioxepanilo y diazepanilo.

El término "heterociclilo" incluye grupos heterocíclicos tal como se definen en el presente documento que pueden estar sustituidos con 1, 2 ó 3 sustituyentes tales como =O, =S, halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, heterociclilo, alcoxilo, cicloalquiloxilo, alquenoiloxilo, alquinoiloxilo, ariloxilo, heteroariloxilo, heterocicliloxilo, arilalquiloxilo, heteroarilalquiloxilo, heterociclilalquiloxilo, cetonas (incluyendo alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, alquenoilcarbonilo, alquinoilcarbonilo, aroilo, arilalquilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, heterociclilcarbonilo), ésteres (incluyendo alcoxicarbonilo, cicloalquiloxycarbonilo, ariloxycarbonilo, heteroariloxycarbonilo, heterocicliloxycarbonilo, alquilcarboniloxilo, cicloalquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, heteroarilcarboniloxilo, heterociclilcarboniloxilo), carbonatos (incluyendo alcoxicarboniloxilo, ariloxycarboniloxilo, heteroariloxycarboniloxilo), carbamatos (incluyendo alcoxicarboxilamino, ariloxycarbonilamino, alquenoiloxycarbonilamino, alquinoiloxycarbonilamino, ariloxycarbonilamino, aminocarboniloxilo, alquilaminocarboniloxilo, dialquilaminocarboniloxilo, arilaminocarboniloxilo), carbamoilo (incluyendo alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, arilalquilaminocarbonilo, alquenoilaminocarbonilo), amido (incluyendo alquilcarbonilamino, alquilcarbonilalquilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino), arilalquilo, heteroarilalquilo, heterociclilalquilo, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), sulfínico (incluyendo alquilsulfínico, arilsulfínico, arilalquilsulfínico, heteroarilsulfínico, alcoxisulfínico, ariloxisulfínico, heteroariloxisulfínico, cicloalquilsulfínico, heterociclilsulfínico), sulfamoilo, sulfonamido, fosfato, fosfonato, fosfinato, tioéter (incluyendo alquiltio, ariltio, heteroariltio), ureido, imino, amidino, tiocarboxilo (incluyendo alquiltiocarbonilo, ariltiocarbonilo), sulfínico (incluyendo alquilsulfínico, arilsulfínico), carboxilo en los que cada uno de los grupos hidrocarbonados mencionados anteriormente puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, halógeno, hidroxilo o alcoxilo.

El término "heterociclilalquilo" es un alquilo sustituido con heterociclilo. El término incluye restos heterociclilalquilo sustituidos y no sustituidos que pueden estar sustituidos con uno o más grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, halógeno, hidroxilo o alcoxilo.

El término "carbonilo" o "carboxilo" incluye compuestos y restos que contienen un carbono conectado con un doble enlace a un átomo de oxígeno (C=O).

El término "hidroxi" o "hidroxilo" incluye grupos con un -OH u -O⁻.

El término "halógeno" incluye flúor, bromo, cloro, yodo, etc.

El término "perhalogenado" incluye restos en los que todos los hidrógenos se reemplazan por átomos de halógeno.

Los compuestos de vitamina D contenidos en las composiciones farmacéuticas de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos o profármacos de los mismos, pueden contener uno o más centros asimétricos y pueden dar lugar así a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S), o como (D) o (L) para aminoácidos. La presente invención pretende incluir todos de tales posibles isómeros, así como sus formas racémicas y ópticamente puras. Los isómeros (+) y (-), (R) y (S) o (D) y (L) ópticamente activos pueden prepararse usando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse usando técnicas convencionales, tales como HPLC usando una columna quiral. Cuando los compuestos descritos en el presente documento contienen dobles enlaces olefinicos u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique de otro modo, se pretende que los compuestos incluyan ambos isómeros geométricos E y Z. Asimismo, también se pretende que estén incluidas todas las formas tautoméricas.

El término "estereoisómero" incluye compuestos formados por los mismos átomos unidos por los mismos enlaces pero que tienen diferentes estructuras tridimensionales, que no son intercambiables. La presente invención contempla diversos estereoisómeros y mezclas de los mismos e incluye enantiómeros, que se refiere a dos

estereoisómeros cuyas moléculas son imágenes especulares no superponibles entre sí.

La presente invención incluye todos los compuestos de vitamina D marcados de manera isotópica farmacéuticamente aceptables como componentes de las composiciones farmacéuticas reivindicadas, en los que uno o más átomos se reemplazan por átomos que tienen el mismo número atómico, pero una masa atómica o un número másico diferente de la masa atómica o el número másico que se encuentra generalmente en la naturaleza.

Los ejemplos de isótopos adecuados para su inclusión en los compuestos de la invención comprenden isótopos del hidrógeno, tales como ^2H y ^3H , carbono, tales como ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C , cloro, tal como ^{36}Cl , flúor, tal como ^{18}F , yodo, tales como ^{123}I y ^{125}I , nitrógeno, tales como ^{13}N y ^{15}N , oxígeno, tales como ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O , fósforo, tal como ^{32}P y azufre, tal como ^{35}S . La sustitución por isótopos más pesados tales como el deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, aumento de la semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducida. Los compuestos de vitamina D marcados de manera isotópica pueden prepararse generalmente mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica usando un reactivo marcado de manera isotópica apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado previamente.

El término "profármacos" incluye compuestos que pueden convertirse en condiciones fisiológicas o mediante solvólisis en un compuesto biológicamente activo de la invención. Por tanto, el término "profármaco" se refiere a un precursor metabólico de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede ser inactivo cuando se administra a un sujeto que lo necesita, pero se convierte *in vivo* en un compuesto activo de la invención. Los profármacos normalmente se transforman rápidamente *in vivo* para producir el compuesto parental de la invención, por ejemplo, mediante hidrólisis en sangre o conversión en el intestino o el hígado. El compuesto de profármaco ofrece a menudo ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en un organismo mamífero (véase, Bundgard, H., *Design of Prodrugs* (1985), págs. 7-9, 21-24 (Elsevier, Amsterdam)).

Se proporciona un análisis de profármacos en Higuchi, T., *et al.*, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", A.C.S. Symposium Series, vol. 14, y en *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, Anglican Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

La "sal farmacéuticamente aceptable" incluye sales de adición tanto de ácido como de base. "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres, que no son biológicamente o de otra manera indeseables, y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, pero sin limitarse a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares, y ácidos orgánicos tales como, pero sin limitarse a, ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, ácido adipico, ácido alginico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido benenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido canfórico, ácido canfor-10-sulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-glutárico, ácido glicerofosfórico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido isobutírico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido láurico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido múxico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido propiónico, ácido piroglutámico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido sebáico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tiocianico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido undecilénico, y similares.

"Sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no son biológicamente o de otra manera indeseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas que se producen de manera natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como amoniaco, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitlohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, benetamina, benzatina, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, trietanolamina, trometamina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares.

A menudo, las cristalizaciones producen un solvato del compuesto contenido en la composición farmacéutica de la invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un agregado que comprende una o más moléculas de un compuesto de la invención con una o más moléculas de disolvente. El disolvente puede ser agua, en cuyo caso el solvato puede ser un hidrato. Alternativamente, el disolvente puede ser un disolvente orgánico. Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden existir como un hidrato, incluyendo un monohidrato, dihidrato, hemihidrato, sesquihidrato, trihidrato, tetrahidrato y similares, así como las formas solvatadas

correspondientes. El compuesto de la invención pueden ser verdaderos solvatos, mientras que en otros casos, el compuesto de la invención puede simplemente retener agua accidental o ser una mezcla de agua más algún solvente accidental.

5 La expresión "composición farmacéutica" incluye formulaciones de un compuesto de la invención (por ejemplo, un compuesto de vitamina D) y un medio generalmente aceptado en la técnica, para la administración del compuesto de vitamina D a un individuo. Tal medio incluye todos los vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10 Las composiciones de la invención se administrarán de manera tópica a cualquier superficie epitelial. Una "superficie epitelial" incluye un área de tejido que cubre las superficies externas de un cuerpo, o que reviste estructuras huecas incluyendo, pero sin limitarse a, superficies cutáneas y mucosas. Tales superficies epiteliales incluyen las superficies oral, faríngea, esofágica, pulmonar, ocular, auditiva, nasal, bucal, lingual, vaginal, cervicouterina, genitourinaria, alimentaria y anorrectal.

15 Las composiciones pueden formularse en una variedad de formas convencionales empleadas para administración tópica. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación semisólidas y líquidas, tales como disoluciones o suspensiones líquidas, geles, cremas, emulsiones, lociones, lechadas, polvos, aerosoles, espumas, pastas, pomadas, ungüentos, bálsamos o gotas.

20 Los vehículos usados convencionalmente para aplicaciones tópicas incluyen pectina, gelatina y derivados de las mismas, polímeros de poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico) o copolímeros de los mismos, derivados de celulosa tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa o celulosa oxidada, goma guar, goma arábica, goma karaya, goma tragacanto, bentonita, agar, carbómero, sargazo vejigoso, *Ceratonía*, dextrano y sus derivados, goma ghatti, hectorita, cáscara de ispágula, polivinilpirrolidona, sílice y sus derivados, goma xantana, caolín, talco, almidón y sus derivados, parafina, agua, aceites vegetales y animales, polietileno, poli(óxido de etileno), polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol, etanol, propanol, propilenglicol (glicoles, alcoholes), aceites fijos, sales de sodio, potasio, aluminio, magnesio o calcio (tales como cloruro, carbonato, bicarbonato, citrato, gluconato, lactato, acetato, gluceptato o tartrato).

30 Las estrategias de composición convencionales para los agentes tópicos pueden aplicarse a los compuestos de vitamina D para mejorar la persistencia y el tiempo de residencia del fármaco, y para mejorar la eficacia profiláctica lograda.

35 En una realización, el compuesto de vitamina D puede administrarse de manera profiláctica. Para aplicaciones profilácticas, el compuesto de vitamina D puede aplicarse antes de una posible alopecia. El momento de la aplicación puede optimizarse para maximizar la eficacia profiláctica del compuesto de vitamina D. El momento de la aplicación variará según el modo de administración, las dosis, la estabilidad y la eficacia de la composición, la frecuencia de la dosificación, por ejemplo, aplicación única o dosificación múltiple. Un experto en la técnica podrá determinar el intervalo de tiempo más apropiado requerido para maximizar la eficacia profiláctica del compuesto de vitamina D.

45 El compuesto de vitamina D cuando está presente en una composición estará presente generalmente en una cantidad de desde aproximadamente el 0,000001% hasta aproximadamente el 100%, más preferiblemente desde aproximadamente el 0,001% hasta aproximadamente el 50%, y lo más preferiblemente desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 25% del peso total.

50 Además, los componentes independientes de las composiciones de la invención pueden premezclarse o cada componente puede añadirse por separado al mismo entorno de acuerdo con una dosificación predeterminada con el fin de lograr el nivel de concentración deseado de los componentes de tratamiento y siempre que los componentes eventualmente entren en mezcla íntima entre sí. Además, las composiciones de la presente invención pueden administrarse o suministrarse de manera continua o intermitente.

55 En una realización, la formulación incluye el principio activo de vitamina D, formulado en aproximadamente el 40% (p/p) de propilenglicol y aproximadamente el 60% (p/p) de etanol absoluto anhidro (200 Proof, EE.UU. (al 100%)), tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas. En algunas realizaciones, el etanol es etanol sin desnaturalizar (USP) absoluto anhidro de 200 Proof (EE.UU.). La formulación descrita en el presente documento proporciona un nivel de penetración dérmica y administración de los compuestos activos de vitamina D, y proporciona un medio eficaz para prevenir la alopecia o para reducir la intensidad de la alopecia inducida por quimioterapia (AIQ).

60 En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica, tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas, comprende aproximadamente el 40% (p/p) de propilenglicol (grado USP) y aproximadamente el 60% (p/p) de etanol absoluto anhidro (200 Proof, EE.UU.), sin desnaturalizar USP.

65 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica, tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas, comprende aproximadamente el 40% (p/p) de propilenglicol (por ejemplo, grado USP o mejor) y aproximadamente el

60% (p/p) de etanol absoluto anhidro (200 Proof, EE.UU.), sin desnaturalizar (por ejemplo, grado USP o mejor).

En la invención, el porcentaje preciso (p/p) de propilenglicol y/o etanol absoluto anhidro puede variarse en función de la razón del 40%: el 60% a 35:65; 36:64; 37:63; 38:62; 39:61; 41:59; 42:58; 43:57; 44:56; o 45:55. La eficacia de tales otras formulaciones puede verificarse usando técnicas reconocidas en la técnica, tales como el procedimiento descrito en el ejemplo I.

Los compuestos de vitamina D de la invención están formulados para administrarse a la epidermis sin tener sustancialmente penetración en la capa de la dermis. Una formulación diferente anterior desarrollada por Roche Dermatology fue ineficaz en la protección frente a la AIQ cuando se usó a una dosis de aproximadamente 500 - 1000 µg por aplicación, y provocó dermatitis en la mayoría de los sujetos humanos en el estudio de fase I. La misma formulación de Roche tampoco funcionó en el modelo de rata con cloroleucemia (citado a continuación).

Una de las formulaciones a modo de ejemplo de la invención puede prepararse de acuerdo con el siguiente procedimiento (no limitativo):

Fórmula I: Calcitriol a 1,2 µg/g (1,2 ppm)

Componente	% p/p
Concentrado de 100 ppm de calcitriol	1,2
Etanol 200 Proof	58,8
Propilenglicol	40
Total	100

La fórmula I se prepara tal como sigue: se disuelve el calcitriol en el etanol; se añade entonces el propilenglicol y se mezcla hasta que la disolución resultante es transparente y de aspecto uniforme. El peso específico de la formulación anterior es de aproximadamente 0,875 g/ml. La concentración objetivo de la fórmula anterior expresada en p/v es de 1,05 µg/ml.

Fórmula II: Calcitriol a 3,6 µg/g (3,6 ppm)

Componente	% p/p
Concentrado de 100 ppm de calcitriol	3,6
Etanol 200 Proof	56,4
Propilenglicol	40
Total	100

La fórmula II se prepara tal como sigue: se disuelve el calcitriol en el etanol; se añade entonces el propilenglicol y se mezcla hasta que la disolución resultante es transparente y de aspecto uniforme. El peso específico de la formulación anterior es de aproximadamente 0,875 g/ml. La concentración objetivo de la fórmula anterior expresada en p/v es de 3,15 µg/ml.

Los reactivos usados son todos reactivos de grado USP (que cumplen los requisitos de la Farmacopea de los EE.UU.).

Usando la formulación de la invención, una dosificación de aproximadamente 0,2 µg (administrada como 100 µl de disolución tópica 2 µg/ml) es protectora frente a la AIQ en ratas neonatales. Basándose en esta información, un experto en la técnica puede ajustar fácilmente el nivel de dosificación adecuado en función del peso corporal promedio del mamífero que va a tratarse. Por ejemplo, en sujetos humanos, puede usarse una dosis total de calcitriol (u otra cantidad equivalente de compuestos de vitamina D) de aproximadamente 2,5 µg, 5 µg, 10 µg, 25 µg, 50 µg, 75 µg o 100 µg. El estudio preliminar de toxicología animal muestra que una dosis de aproximadamente 100 µg no provocó irritación dérmica y presentó una excelente penetración epidérmica sin una penetración dérmica sustancial (por ejemplo, una penetración extremadamente baja en la dermis). Véase la descripción anterior para obtener información adicional sobre la dosificación.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran determinados aspectos de la invención, y no son limitativos en ningún aspecto. Aunque se han descrito los ejemplos con cierto detalle con propósitos de claridad e ilustración, un experto en la técnica apreciará que pueden realizarse diversos cambios en las formas y detalles sin apartarse del verdadero alcance de la invención tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1. Evaluación de la absorción percutánea de calcitriol, *in vitro*, usando el modelo de dosis finitas en piel humana de Franz

Se diseñó este ejemplo para evaluar la farmacocinética de absorción percutánea de diversas formulaciones de calcitriol. Se midió la absorción en piel cadavérica humana, *in vitro* usando la técnica de dosis finitas y las celdas de difusión de Franz. El modelo de piel cadavérica humana *in vitro* ha demostrado ser una herramienta valiosa para el estudio de la absorción percutánea y la determinación de la farmacocinética de fármacos de aplicación tópica. El modelo usó piel cadavérica humana preparada en celdas de difusión diseñadas especialmente que permitieron mantener la piel a una temperatura y humedad que coinciden con las condiciones típicas *in vivo*. Una dosis finita (por ejemplo, 4-7 mg/cm²) de formulación se aplicó a la superficie externa de la piel y se midió la absorción del fármaco controlando su tasa de aparición en la disolución receptora que bañaba la superficie interna de la piel. Entonces se determinaron con precisión datos que definen la absorción total, la tasa de absorción y el contenido en la piel en este modelo. El método tiene un precedente histórico para predecir con precisión la cinética de absorción percutánea *in vivo*. Por tanto, el modelo de dosis finitas *in vitro* en piel humana permitió la caracterización de la farmacocinética de absorción percutánea de compuestos de vitamina D, tales como el calcitriol.

En este experimento, se sometieron a prueba seis formulaciones que contienen calcitriol en tres secciones de piel replicadas por formulación en cada uno de los tres donantes de piel cadavéricos diferentes, para la absorción percutánea de calcitriol a lo largo de un periodo de dosis de 48 horas. En momentos preseleccionados después de la aplicación de la dosis, se retiró en su totalidad la disolución receptora dérmica, se reemplazó por nueva disolución de receptor y se guardó una alícuota para su posterior análisis. Además, se recuperó el estrato córneo, la epidermis y la dermis y se evaluó para determinar el contenido del fármaco. Se analizaron las muestras para determinar el contenido de calcitriol mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). A continuación se proporciona una breve descripción del protocolo usado en el presente documento.

En este estudio se usó piel de tronco de cadáver humano sin signos evidentes de enfermedad de la piel, obtenida en un plazo de 24-48 horas desde el fallecimiento. Se cortó la piel con dermatomo, se criopreservó, se selló en una bolsa de plástico impermeable al agua y se almacenó a <-70°C hasta el día del experimento. Antes de su uso, se descongeló la piel en agua a 37°C, luego se enjuagó en agua del grifo para retirar la sangre adherente u otro material de la superficie. La piel de un solo donante se cortó en varias secciones más pequeñas lo suficientemente grandes como para caber en celdas de difusión de Franz de 2,0 cm² estáticas. Se sometieron a prueba tres réplicas por donante para cada formulación. Se llenó la cámara dérmica hasta su capacidad con una disolución de reservorio de solución salina isotónica tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4 ± 0,1, y se dejó abierta la cámara epidérmica al entorno ambiental del laboratorio. Puede añadirse al PBS, Volpo (Oleth-20), un tensioactivo no iónico que se sabe que aumenta la solubilidad en agua de compuestos poco solubles en agua. Volpo en la disolución de reservorio asegura las condiciones de exceso de medio de disolución de difusión durante la absorción percutánea, y se sabe que no afecta a las propiedades de barrera de la piel de prueba. Luego, se pusieron las células en un aparato de difusión en el que la disolución de reservorio dérmico se agitó magnéticamente a ~ 600 RPM y se mantuvo su temperatura para alcanzar una temperatura de superficie de la piel de 32,0 ± 1,0°C.

Para asegurar la integridad de cada sección de piel, se determinó su permeabilidad al agua tritiada antes de la aplicación de los productos de prueba. Después de un breve periodo de equilibrio (0,5-1 hora), se dispuso en capas ³H₂O (NEN, Boston, MA, act. esp. ~ 0,5 µCi/ml) a través de la parte superior de la piel mediante un cuentagotas para cubrir toda la superficie expuesta (aproximadamente 250 - 500 µl). Después de 5 minutos, se retiró la capa acuosa de ³H₂. A los 30 minutos, se recogió la disolución de reservorio y se analizó el contenido radiactivo mediante recuento por centelleo líquido. Se consideran aceptables las muestras de piel en las que la absorción de ³H₂O es menor de 1,56 µl-eq./cm². Todas las muestras de piel usadas tenían una absorción de ³H₂O de menos de aproximadamente 0,50 µl-eq./cm² (resultados no mostrados).

Administración de dosis y recogida de muestras: Justo antes de la dosificación, se tomó una muestra previa a la dosis y se reemplazó la disolución de reservorio por una nueva disolución de 0,1 × PBS con Volpo al 0,2% (también conocido como Oleth-20, un tensioactivo no iónico usado para garantizar la miscibilidad del fármaco en una disolución acuosa). Se retiró la chimenea de la celda de Franz para permitir el acceso total a la superficie epidérmica de la piel. Todas las formulaciones se aplicaron luego a las secciones de piel usando un conjunto de pipetas de desplazamiento positivo para administrar 10 µl de formulación/cm². La dosis se extendió a través de la superficie con la punta de teflón de la pipeta. De cinco a diez minutos después de la aplicación, se reemplazó la porción de chimenea de la celda de Franz. En tiempos preseleccionados después de la dosificación (6, 12, 24 y 48 horas), se retiró la disolución de reservorio en su totalidad, se reemplazó por una nueva disolución de reservorio y se guardó una alícuota de volumen predeterminado para su posterior análisis.

Se preparó una única sección de piel de cada donante sobre células que no se dosificaron pero que se usaron para evaluar la aparición de sustancias que difunden fuera de la piel, que pueden representar al calcitriol endógeno. Después de recoger la última muestra, se lavaron las superficies de la piel dos veces (1,0 ml de volumen cada una) con etanol:agua 80:20 para recoger la formulación no absorbida de la superficie de la piel. Tras el lavado, se retiró la piel de la cámara y se dividió en epidermis y dermis. Se extrajo cada capa durante la noche en etanol:agua 80:20.

La cuantificación de calcitriol se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). En resumen, la HPLC se realizó en un sistema HPLC Hewlett-Packard serie 1100 con un CL/MSD Agilent serie 1100. Se hizo

5 pasar un sistema de disolventes que consistía en A) acetato de amonio al 0,1% en agua y B) acetato de amonio al 0,1% en metanol a través de una columna Phenomenex Luna C18 (2) (100A, 3 μ , 100 \times 4,6 mm) a un caudal de 0,550 ml/min. Se cuantificaron las áreas de pico a concentración usando una curva patrón externa preparada diariamente a partir del patrón puro. Las muestras no sometidas a ensayo el día de la recogida se almacenaron a -20°C o menos.

10 En el estudio piloto, se dosificó una formulación única del grupo a seis cámaras a una dosis de aproximadamente 5 μ l/cm² en un solo donante. Se recogieron las disoluciones receptoras a las 0, 2, 4, 8, 12, 24, 32 y 48 horas. Tras la última muestra de disolución receptora, se lavó la superficie y se recogió la piel para análisis tal como se describió previamente. Todas las muestras fueron procesadas y analizadas para determinar el contenido de calcitriol.

15 El diseño final del estudio fundamental se basó en los resultados observados en el estudio piloto, en particular, la dosis aplicada, el programa de muestreo de disolución receptora y los métodos de procesamiento de muestras. Estas modificaciones se realizaron para optimizar la detección y cuantificación de calcitriol en las muestras del estudio fundamental. Por ejemplo, aunque el protocolo piloto establece que las muestras de reservorio se tomen a las 2, 4, 8, 12, 24, 32 y 48 horas, después del estudio piloto se determinó que las muestras de reservorio se tomarían a las 6, 12, 24 y 48 horas para facilitar mejores niveles de detección de calcitriol en las muestras de reservorio. Además, tras un estudio piloto, se determinó que la dosificación a 2 cm² con 20 μ l (la cantidad de dosificación fue entonces de 10 μ l/cm²) mejoraría la detección de calcitriol en las muestras de disolución de reservorio. Sin embargo, las cámaras no dosificadas se conservaron a 1 cm². Se calcularon los siguientes parámetros: a) absorción total (suma de todas las disoluciones de reservorio); b) tasa y grado de penetración a lo largo del periodo de estudio; y c) balance de masas de la dosis aplicada. Para la evaluación de datos, a) si alguna muestra fue <LLQ (límite inferior de cuantificación), entonces esa muestra puede tratarse como un valor sin datos. Para muestras radiactivas (por ejemplo, la prueba de integridad del agua), el LLQ se definió como el fondo medio predeterminado de muestras de blanco. A discreción del investigador, todos los valores <LLQ se declararon como valores cero o valor real medido con el propósito de calcular parámetros clave; b) se confirmó un valor aberrante sospechoso si es mayor que el intervalo medio \pm 3D.E. de los mismos valores del conjunto de cámaras replicadas restantes, o según se determina mediante la prueba de valores aberrantes de Dean y Dixon. A discreción del investigador, se eliminaron los valores declarados como valores aberrantes de la suma global de los datos (pero se anotan como tales en el texto o las tablas de datos); c) dentro de una cámara, si un valor de punto de tiempo dado se ha declarado un valor sin datos, o si falta debido a otros motivos, el valor de punto de tiempo se reemplazó por un valor interpolado para calcular los parámetros relevantes. El valor interpolado se calcula en una línea que conecta los valores adyacentes de la siguiente manera:

35 • Datos 3 puntos: (T1, A), (T2, B) y (T3, C) faltando (B),

• Donde T = tiempo y A-C = valores de datos medidos

40 • B estimado = $A - \left[\frac{(A-C)}{|T1-T3|} \times (|T1-T2|) \right]$

Para la evaluación estadística, se promediaron las réplicas dentro de los donantes y se calculó la desviación estándar para cada parámetro clave. Se cotejaron entonces los promedios dentro de los donantes y se calculó la media de la población de donantes con el error estándar. Las diferencias entre los artículos de prueba se evaluaron mediante la prueba de la t de Student.

45 Usando este protocolo, se evaluaron las siguientes formulaciones de prueba:

50 • A: (1 ppm, formulación comparativa): disolver 0,2 ml (1% (p/v)) de concentrado de 100 ppm de calcitriol (número de lote H, a continuación) en 19,8 ml (99% (p/v)) de etanol 200 Proof (1 μ g/ml).

• B (1 ppm): en primer lugar, disolver 0,2 ml (1% (p/v)) de concentrado de 100 ppm de calcitriol (número de lote H, a continuación) en 11,8 ml (59% (p/v)) de etanol 200 Proof; luego añadir 8 ml (40% (p/v)) de propilenglicol y mezclar hasta que esté transparente y uniforme (1 μ g/ml).

55 • C (1 ppm, formulación comparativa): en primer lugar, disolver 0,2 ml (1% (p/v)) de concentrado de 100 ppm de calcitriol (número de lote H, a continuación) en 11,8 ml (59% (p/v)) de etanol 200 Proof; luego añadir 6 ml (30% (p/v)) de propilenglicol y 2 ml (10% (p/v)) de etoxidiglicol, y mezclar hasta que esté transparente y uniforme (1 μ g/ml).

60 • D (3 ppm, formulación comparativa): en primer lugar, disolver 0,6 ml (3% (p/v)) de concentrado de 100 ppm de calcitriol (número de lote H, a continuación) en 11,4 ml (57% (p/v)) de etanol 200 Proof; luego añadir 6 ml (30% (p/v)) de propilenglicol y mezclar hasta que esté transparente y uniforme; finalmente añadir 2 ml (10% (p/v)) de etoxidiglicol y mezclar hasta que esté transparente y uniforme (3 μ g/ml).

65 • E (1 ppm, formulación comparativa): en primer lugar, disolver 0,2 ml (1% (p/v)) de concentrado de 100 ppm de calcitriol (número de lote H, a continuación) en 11,72 ml (58,6% (p/v)) de etanol 200 Proof (DP-04-099); luego añadir

6 ml (30% (p/v)) de propilenglicol y mezclar hasta que esté transparente y uniforme; luego añadir 2 ml (10% (p/v)) de Transcutol P y mezclar hasta que esté transparente y uniforme; finalmente, añadir 0,08 ml (0,4% (p/v)) de concentrado de Phospholipon 90G (número de lote G, a continuación) y dispersar en la disolución, mezclar hasta que esté transparente y uniforme (1 µg/ml).

• F (3 ppm, formulación comparativa): en primer lugar, disolver 0,6 ml (3% (p/v)) de concentrado de 100 ppm de calcitriol (número de lote H, a continuación) en 11,32 ml (56,6% (p/v)) de etanol 200 Proof; luego añadir 6 ml (30% (p/v)) de propilenglicol y mezclar hasta que esté transparente y uniforme; luego añadir 2 ml (10% (p/v)) de Transcutol P y mezclar hasta que esté transparente y uniforme; finalmente, añadir 0,08 ml (0,4% (p/v)) de concentrado de Phospholipon 90G (número de lote G, a continuación) y dispersar en disolución, mezclar hasta que esté transparente y uniforme (31 µg/ml).

• G (concentrado de Phospholipon): mezclar 50 g (50% (p/v)) de etanol 200 Proof con 50 g (50% (p/v)) de Phospholipon 90G, y mezclar hasta que esté transparente y uniforme.

• H (concentrado de calcitriol): disolver por completo 0,01 mg (0,01% (p/v)) de calcitriol en 100 ml (99,99% (p/v)) de etanol 200 Proof.

Todos los reactivos usados en este estudio fueron de grado de reactivo analítico o mejor. La fuente de reactivos únicos se anotará después de la primera mención de cada producto químico en el texto del informe final.

Los resultados de este estudio se resumen en la siguiente tabla resumen:

Tabla resumen: Resultados promedio a través de los donantes para el contenido de calcitriol en la epidermis, dermis y absorción total. Absorción percutánea de calcitriol usando piel cadavérica humana a lo largo de 48 horas a partir de una aplicación única. Media ± E.E. como masa total (ng)

Artículo de prueba	Epidermis (ng/cm ²)	Dermis (ng/cm ²)	Absorción total (ng/cm ²)
Lote A [#]	0,98 ± 0,19	0,11 ± 0,11	9,85 ± 0,62
Lote B	1,63 ± 0,44	0,19 ± 0,19	9,84 ± 0,67
Lote C [#]	1,89 ± 0,54	0,00 ± 0,00*	9,74 ± 0,43
Lote D [#]	6,44 ± 0,74	0,00 ± 0,00	10,51 ± 0,10
Lote E [#]	2,19 ± 0,14	0,00 ± 0,00	9,96 ± 0,32
Lote F [#]	4,83 ± 0,42	0,00 ± 0,00	8,80 ± 0,25
Células blanco no dosificadas	0,37 ± 0,37	0,00 ± 0,00	13,75 ± 0,59**

* Los valores cero indican resultados por debajo del límite inferior de detección.

** Se supone que es calcitriol endógeno que se libera de la piel.

Formulación comparativa

Los datos indican que el calcitriol sí que penetró, pero no necesariamente a través de la piel cadavérica humana, *in vitro* a partir de las formulaciones de prueba evaluadas. Las secciones de piel de blanco, no dosificadas, de cada donante demostraron un pico de elución conjunta en HPLC/MS que concuerda con calcitriol endógeno. La cantidad presente en la disolución de reservorio, que es esencialmente idéntica a lo largo de todas las formulaciones de prueba y similar a las secciones de piel no dosificadas, fue lo más probablemente la difusión de calcitriol endógeno que se libera desde las secciones de piel. Como se observó poca diferencia entre las formulaciones de prueba y las cámaras no dosificadas, es poco probable que la cantidad observada en la disolución de reservorio represente calcitriol proveniente de las formulaciones de prueba aplicadas de manera tópica.

Se observó evidencia de absorción de calcitriol, como contenido dérmico, en aquellas secciones de piel a las que se les dosificaron dos formulaciones (formulación comparativa A y formulación de la invención B), se ve en la figura 1. Como no se observaron niveles medibles en la capa dérmica de la piel de las secciones de piel no dosificadas, se interpreta, por tanto, que los niveles dérmicos medibles de estas dos formulaciones de prueba representan la absorción de la dosis aplicada. Además, todas las muestras epidérmicas a las que se les dosificaron formulaciones de prueba demostraron niveles de calcitriol mayores (~3× a ~17×) que las secciones de piel no dosificadas. La clasificación jerárquica basa en el contenido de calcitriol epidérmico organiza las formulaciones de prueba como:

D > F > E > C > B > A >>> Piel no dosificada

Concuerda con esta clasificación jerárquica que las formulaciones de prueba demuestran los mayores contenidos epidérmicos cuando contienen las concentraciones más altas (3 µg/ml frente a 1 µg/ml) de calcitriol (formulación comparativa D y formulación comparativa F) Se observa una clasificación jerárquica muy similar en los resultados de lavado de superficie (recuperación del artículo de prueba residual de la superficie de la piel). No se halló calcitriol en el lavado de superficie de las secciones de piel de blanco no dosificadas.

Ejemplo 2 (Ejemplo de referencia). Identificación de proteínas clave involucradas en la respuesta de cultivo de células epidérmicas al calcitriol - PCR en tiempo real (RT-PCR)

5 Este y los siguientes ejemplos proporcionan información adicional sobre la identidad de proteínas o genes en las rutas de activación del calcitriol. Estos experimentos permiten la identificación del mecanismo de acción y las proteínas/genes clave involucrados en la respuesta celular de las células epidérmicas a los compuestos de vitamina D.

10 Específicamente, se halló que exponer la línea celular de queratinocitos HEKa al calcitriol provocó un impacto significativo en procesos celulares. Los experimentos descritos en el presente documento se centran en la identificación de proteínas/genes clave que estaban involucrados en los cambios inducidos por el calcitriol en el transporte del canal de calcio y los cambios en la regulación de las proteínas de choque térmico. Se emplearon métodos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) en este ejemplo para identificar cambios en el nivel de ARNm para genes involucrados en canales iónicos, proteínas de transporte y proteínas de choque térmico.

20 Usando alineamientos de PCR como herramienta de detección, se evaluó un espectro de dianas moleculares que potencialmente ofrecerían una percepción del modo de acción biológica del calcitriol dentro de las células. Se evaluaron los cambios en los niveles de ARNm mediante la cuantificación por PCR en tiempo real para evaluar los niveles de ARNm en subconjuntos preseleccionados que contenían 80 dianas específicas de la ruta (véase el Apéndice). El análisis de alineamientos de PCR utilizó dos grupos de genes: los relacionados con las proteínas de choque térmico (SABiosciences) y los relacionados con los canales y transportadores iónicos de neurociencia (SABioscience).

25 Cultivo celular: se mantuvieron queratinocitos epidérmicos humanos primarios (HEKa) en medio Epilife (Cascade Biologics, Inc., Portland OR) junto con el complemento de crecimiento de queratinocitos humanos (Cascade Biologics, Inc., Portland OR). Se hicieron crecer las células a 37°C con el 5% de CO₂.

30 Tratamiento con D3 de células HEKa: se trataron células HEKa con 0,1 µg/ml de calcitriol o el vehículo de control. Para dar una concentración final de calcitriol de 0,1 µg/ml, se disolvió 1 mg de calcitriol en 2 ml de etanol y se añadió 1 µl de la disolución madre resultante a 5 ml de medios. Se trató el grupo de células de control de vehículo con 5 ml de medios que contenían 1 µl de etanol. Se recogieron las células 3, 6, 16, 24, 48 ó 72 horas después del inicio del tratamiento.

35 Aislamiento de ARN: se lisaron las células para el aislamiento de ARN a diferentes tiempos de tratamiento usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Inc., Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ARN midiendo la densidad óptica a 260 nm. Síntesis de primera hebra: se sintetizó el ADNc de primera hebra a partir de 1 µg de ARN total usando el kit de síntesis de primera hebra RT2 (SABiosciences., Frederick, MD) según las recomendaciones del fabricante.

40 PCR en tiempo real: Los productos de la síntesis de primera hebra se diluyeron con agua, se mezclaron con la mezcla maestra verde SYBR (SABiosciences., Frederick, MD) y se cargaron en alineamientos de PCR. La PCR en tiempo real se ejecutó en los alineamientos de PCR (alineamientos de proteínas de choque térmico y alineamientos de canales de iones y neurociencia) (SABiosciences, Frederick, MD) en un sistema Biorad CFX96. Se realizaron análisis de datos usando el software de análisis de datos de alineamientos de PCR disponible en el sitio web de SABiosciences.

50 La tabla 2-1 a continuación muestra los genes en el alineamiento de genes de proteínas de choque térmico que se regulan en las células HEKa después del tratamiento con calcitriol. Los resultados muestran sólo aquellos genes que se regularon en dos experimentos independientes.

Tabla 2-1 Genes en el alineamiento de proteínas de choque térmico regulados por el tratamiento con vitamina D3.

Símbolo de gen	Proteína	Patrón de regulación
HSPB1	Proteína 1 de choque térmico de 27 kDa	Regulado por disminución a las 48 horas
DNAJC6	Homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 6	Regulado por disminución
HSPA2	Proteína 2 de choque térmico de 70 kDa	Regulado por incremento a las 48 horas
HSF4	Factor 4 de transcripción de choque térmico	Regulado por incremento a las 48 horas

55 Dos de los genes que se regularon a nivel de ARNm mediante el tratamiento con calcitriol en células HEKa eran

5 HSPB1 y HSPA2. HSPB1 es una proteína de 27 kDa que se expresa no sólo en la membrana celular, sino también en el citosol, las mitocondrias y los aparatos de Golgi. HSPA2 es una proteína de 70 kDa presente en la membrana celular y el núcleo, y está regulada por HSF1. Tanto HSPB1 como HSPA2 se han involucrado en la apoptosis. HSF4 está regulado por el ácido retinoico y está involucrado en la diferenciación celular. DNAJC6 pertenece al grupo de proteínas de HSP40. Está presente en vesículas recubiertas de clatrina y en el citoplasma.

Del mismo modo, los resultados obtenidos del alineamiento de canales de iones y neurociencia que concuerdan de tres experimentos independientes se resumen a continuación en la tabla 2-2.

10 Tabla 2-2 Genes en el alineamiento de canales de iones y neurociencia regulados por el tratamiento con vitamina D3

Símbolos de gen	Gen	Patrón de regulación
SLC1A1	Familia de transportadores de solutos 1 (transportador de glutamato de alta afinidad neuronal/epitelial, sistema Xag), miembro 1)	regulado por incremento a las 16 h
KCNB2	Canal de potasio dependiente de voltaje, subfamilia relacionada con Shab, miembro 2	regulado por incremento hasta las 24 horas
KCNN4	Canal de potasio de conductancia intermedia/pequeña activado por calcio, subfamilia N, miembro 4	regulado por incremento a las 48 horas
SLC1A3	Familia de transportadores de solutos 1 (transportador de glutamato de alta afinidad glial), miembro 3	regulado por disminución a las 48 horas

15 Se observaron sistemáticamente cambios en los transportadores de glutamato y en los canales de potasio. Se sabe que SLC1A1 (también conocido como EAAC1 o EAAT3) es el principal responsable del transporte del neurotransmisor excitatorio glutamato a través de la membrana. Esta proteína transportadora de solutos se ha encontrado fuera del sistema nervioso en tejidos como el corazón y la piel. En queratinocitos de rata, hay evidencia que muestra la participación de la señalización de glutamato y SLC1A1 en la cicatrización de heridas (Genever *et al.*, 1999). La inhibición de SLC1A1 por riluzol, un fármaco actualmente en ensayos clínicos para el melanoma (Clinical Trials.gov, Mosby's Drug Consult, 13^a edición) es indicativa de un papel biológico de SLC1A1 en las células de la piel. Dado que SLC1A1 se ha implicado en mecanismos antiapoptóticos en neuronas motoras lesionadas (Kiryu-Seo *et al.* 2006), la observación en este experimento de que SLC1A1 está regulado por incremento por el tratamiento con D3 en células HEKa sugiere una posible vinculación de la ruta del mecanismo de protección.

25 SLC1A3 (también conocido como EAAT1 o EA6) es otro transportador de solutos que permite un transporte de glutamato y aspartato dependiente de sodio. Hallándose normalmente en las células gliales del cerebro, este transportador está involucrado en la limpieza del espacio sináptico de glutamato, impidiendo así la despolarización prolongada de las neuronas postsinápticas. Se sabe que SLC1A3 interacciona con el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y la fosfodiesterasa 6B (PDE6B). Es posible que SCL1A3 esté involucrado en la reducción de la citotoxicidad.

30 KCNN4 es un canal de potasio de conductancia intermedia/pequeña activado por calcio, subfamilia N, miembro 4. Tras su activación, la membrana celular se hiperpolariza y hay un flujo de entrada aumentado de calcio en la célula. Este canal de potasio se localiza en muchos tejidos fuera del sistema nervioso.

35 KCNB2, canal de potasio dependiente de voltaje, subfamilia relacionada con Shab, miembro 2, se regula por incremento aproximadamente 24 horas después del tratamiento con calcitriol. Este canal de potasio es importante en la regulación de la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina y la contracción del músculo liso.

40 Aunque se usó calcitriol en estos experimentos, un experto en la técnica comprenderá fácilmente que otros compuestos de vitamina D de la invención (tales como los descritos anteriormente en el presente documento) también pueden presentar actividades similares en la regulación de la expresión de genes diana. Se contempla que, en determinadas realizaciones, los compuestos de vitamina D de la invención presentan un perfil de modulación génica similar o idéntico al del calcitriol en estos experimentos, por ejemplo, regulación por incremento de la expresión (ARNm y/o proteína) de uno o más genes diana regulados por incremento de manera similar por calcitriol, o regulación por disminución de la expresión (ARNm y/o proteína) de uno o más genes diana regulados por disminución de manera similar por calcitriol.

50 Ejemplo 3 (Ejemplo de referencia). Identificación de proteínas clave involucradas en la respuesta de cultivo de células epidérmicas al calcitriol - alineamiento de anticuerpos

La evaluación de los cambios de proteínas tras la estimulación con calcitriol también se evaluó mediante la utilización de microalineamientos de anticuerpos, que son capaces de detectar cambios en más de 700 proteínas diana potenciales.

5 En este experimento, se usó un microalineamiento de anticuerpos (alineamiento de anticuerpos Panorama XP725, Sigma) que abarca anticuerpos contra más de 700 proteínas diana para evaluar los cambios en la concentración/nivel de proteína en células HEKa tratadas con calcitriol durante aproximadamente 3, 6 ó 24 horas, respectivamente. En resumen, en primer lugar se recogieron las células HEKa tratadas y luego se extrajeron para obtener un sobrenadante de proteína soluble. Se marcaron dos porciones de la muestra de proteína extraída (~1 mg en total) de cada muestra (a 1 mg/ml) con colorante fluorescente (Cy3 y Cy5, respectivamente). Se retiró el exceso de colorante de la muestra de proteína, y se usaron las muestras de proteína marcadas resultantes para la incubación de microalineamientos.

15 Para determinar el nivel de expresión de una proteína diana particular en un punto de tiempo posterior (por ejemplo, en la hora 6 ó 24) en relación con el mismo en un punto de tiempo anterior (por ejemplo, a la hora 3), se marcaron las muestras mediante diferentes marcadores (por ejemplo, extracto de 3 horas marcado con Cy3, extracto de 6 horas o 24 horas marcado con Cy5). Luego se mezclaron las dos muestras marcadas que contenían cantidades iguales de proteína total (por ejemplo, se mezcla la muestra de 3 horas marcada con Cy3 con muestras de 6 horas o 24 horas marcadas con Cy5, respectivamente). Después de la incubación con el chip de microalineamientos (de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante), se lavaron y secaron los chips. Entonces se exploraron los microalineamientos con un explorador láser fluorescente para medir la intensidad de fluorescencia relativa de los colorantes Cy3 y Cy5.

25 Si la cantidad de un tipo particular de proteína diana aumentó (o disminuyó) a lo largo del tiempo, se retendrá más (o menos) cantidad del colorante asociado con el punto de tiempo posterior (por ejemplo, Cy5) por el microalineamiento. Por ejemplo, en este experimento, se usó el punto de tiempo más temprano (por ejemplo, 3 horas) como nivel inicial para determinar el nivel relativo de expresión de proteínas en dos puntos de tiempo posteriores (por ejemplo, 6 horas frente a 24 horas). Si el alineamiento retiene más Cy5 entre 6-24 horas, el nivel de expresión de la proteína diana aumentará a lo largo del periodo de tiempo. Por el contrario, si hay una disminución del Cy5 retenido entre las horas 6 y 24, el nivel de expresión de la proteína diana disminuye.

35 El análisis inicial usando este método se centró en aquellas proteínas diana que presentaron cambios relativos en el nivel de expresión > 2 veces (aumento o disminución). En general, los experimentos de alineamientos de anticuerpos usando las células HEKa tratadas con calcitriol (24 horas) identificaron las siguientes proteínas diana (en las tablas 3-1 y 3-2) con un nivel de expresión significativamente alterado en respuesta a la vitamina calcitriol:

Tabla 3-1. Proteínas diana con niveles de proteína aumentados (> 2 veces) después del tratamiento con calcitriol

Proteína precursora de amiloide	HDAC2
ARTS	HDAC6
ASAP1 Centaurina b4	ILK
BACH1	Proteína cinasa 2 activada por MAP cinasa MAPKAPK2
Bclx	MAP cinasa ERK1
BclxL	Receptor de melanocortina 3
BID	Miosina IX Myr5
Bmf	Neurofilamento 200
CENPE	Óxido nítrico sintasa bNOS
cMyc	p120ctn
Cofilina	PAD14
Conexina 32	Par4 de respuesta a la apoptosis de próstata 4
Csk	Presenilina 1
CtBP1	Proteína celular de proliferación Ki67
DcR2	Proteína cinasa Ba
Dimetil-histona H3 diMeLys4	PUMA bbc3

Dimetil-histona H3 diMeLys9	ROCK1
Distrofina	S100
ERK5 BIG MAPKBMK1	SHPTP2
Receptor de estrógenos	Sin3A
FKHRL1 FOXO3a	Receptor de sustancia P
Cinasa de adhesión focal pp125FAK	Sinaptopodina
FOXP2	Factor de necrosis tumoral a
Ácido glutámico descarboxilasa 65	Ubiquitina C-terminal hidrolasa L1
Ácido glutámico descarboxilasa GAD65 67	Uvomorulina cadherina E
Tubulina g	Vitronectina

Tabla 3-2. Proteínas diana con niveles de proteína disminuidos (> 2 veces) tras tratamiento con calcitriol

Crk II
Factor de crecimiento de independencia 1
Serina-treonina proteína fosfatasa 1b
Catepsina D
Factor de crecimiento transformante b pan
wave
Proteína tirosina fosfatasa PEST
CD40

5 La evaluación de las células HEKa tratadas con calcitriol a las 24 horas con el mismo método de alineamiento de anticuerpos de proteínas identificó aproximadamente cincuenta proteínas que estaban reguladas por incremento significativamente. Estas proteínas se clasifican generalmente dentro de cuatro categorías: (i) transcripcionales y de control del ciclo celular (tabla 3-3); (ii) proteínas estructurales, citoesqueléticas y de adhesión (tabla 3-4); (iii) proteínas de regulación de la apoptosis (tabla 3-5); y (iv) diferenciación de células nerviosas y enfermedad de Alzheimer (tabla 3-6).

10 Tabla 3-3. Proteínas sobreexpresadas relacionadas con el ciclo celular y el control transcripcional (después de 24 horas de tratamiento con calcitriol)

Proteína	Función
BACH1	factor de transcripción (Alzheimer)
CENPE	Proteína centromérica que se acumula en la fase G2 del ciclo celular.
cMyc	factor de transcripción (oncogén de cáncer)
Tripsina cinasa C-src (Csk)	crecimiento celular (cáncer)
CtBP1	represor transcripcional
Dimetil-histona H3 diMeLys4	regulación de la transcripción
Dimetil-histona H3 diMeLys9	regulación de la transcripción
Receptor de estrógenos	receptor nuclear dependiente de ligando
FKHRL1 FOXO3a	factor de transcripción, vinculado a cinasa ROCK y señalización de NO
FOXP2	regulador de la transcripción, en

Proteína	Función
	desarrollo de cerebro, pulmón, intestino
HDAC2	regula la expresión génica
Proteína cinasa 2 activada por MAP cinasa MAPKAPK2	Una cinasa involucrada en muchos procesos celulares (estrés y respuestas inflamatorias, exportación nuclear, regulación de la expresión génica y proliferación celular). La proteína de choque térmico HSP27 demostró ser uno de los sustratos.
MAP cinasa ERK1	actúa en una cascada de señalización que regula diversos procesos celulares tales como la proliferación, diferenciación y progresión del ciclo celular en respuesta a una variedad de señales extracelulares, fosforila proteínas nucleares
Receptor de melanocortina 3	receptor hormonal
proteína celular de proliferación Ki67	marcador de proliferación
S100	proteína de unión al calcio similar a calmodulina implicada en la regulación de múltiples procesos celulares
SHPTP2	una cinasa que desempeña un papel regulador en diversos eventos de señalización celular
Sin3A	proteína reguladora transcripcional

Tabla 3-4. Proteínas sobreexpresadas relacionadas con la estructura, el citoesqueleto y la adhesión (después de 24 horas de tratamiento con calcitriol)

Proteína	Función
ARTS	Regula la organización del citoesqueleto
ASAP1 Centaurina b4	regular el citoesqueleto de actina
Cofilina	oculta filamentos de actina
Conexina 32	componente principal de la mielina periférica
Distrofina	proteína grande para la conexión del citoesqueleto
Cinasa de adhesión focal pp125FAK	La fosforilación de la cinasa de adhesión focal está aumentada en los queratinocitos inducidos para migrar
Tubulina g	microtubular, polo del huso
Miosina IX Myr5	proteínas motoras
Neurofilamento 200	proteína estructural relacionada con células nerviosas
p120ctn	adhesión y transducción de señales
PAD14	convierte los residuos de arginina en

Proteína	Función
	residuos de citrulina; puede regular proteínas de filamentos intermedios y proteínas asociadas a filamentos intermedios en células que experimentan procesos degenerativos
ROCK1	cinasa, contribuye a la estabilidad de la actina
Uvomorulina Cadherina E	Molécula de adhesión celular dependiente de Ca, glicoproteína transmembrana que funciona para regular la adhesión y el reconocimiento de células epiteliales
Vitronectina	fomenta la propagación y la adhesión celular

Tabla 3-5. Proteínas sobreexpresadas relacionadas con el control de la apoptosis (después de 24 horas de tratamiento con calcitriol)

Proteína	Función
Bclx	Regulación de la apoptosis
BclxL	Regulación de la apoptosis
BID	Regulación de la apoptosis
Bmf	Regulación de la apoptosis
DcR2	El receptor contiene un dominio de unión a TRAIL extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de muerte citoplasmático truncado. Este receptor no induce apoptosis, y se ha demostrado que desempeña un papel inhibitorio en la apoptosis celular inducida por TRAIL.
ERK5 BIG MAPKBMK1	Protege las células endoteliales frente a la apoptosis mediante fosforilación de Bad
Cinasa ligada a integrinas (ILK)	La regulación de la transducción de señal mediada por integrinas puede prevenir la apoptosis en asociación con las rutas de PKB/Akt
Proteína cinasa Ba	(Akt) involucrado en la supervivencia celular y la inhibición de la apoptosis
PUMA bbc3	regulador de la apoptosis

5
Tabla 3-6. Proteínas sobreexpresadas asociadas con la diferenciación de células nerviosas y la enfermedad de Alzheimer (después de 24 horas de tratamiento con calcitriol)

Proteína	Función
Proteína precursora de amiloide	La proteína precursora de amiloide (APP) es una proteína integral de membrana expresada en muchos tejidos y concentrada en las sinapsis de las neuronas. Se desconoce su función principal, aunque se ha implicado como regulador de la formación de sinapsis [2] y la plasticidad neural. [3]
BACH1	factor de transcripción (Alzheimer)

Proteína	Función
Presenilina 1	el subcomponente de la gamma secretasa que es responsable de cortar la APP (mutaciones observadas en la enfermedad de Alzheimer)
Ácido glutámico descarboxilasa 65	producción de neurotransmisores (esquizofrenia)
Ácido glutámico descarboxilasa GAD65 67	producción de neurotransmisores (esquizofrenia)
Neurofilamento 200	proteína estructural relacionada con las células nerviosas
Óxido nítrico sintasa bNOS	inducible, señalización celular, sistemas inmunitarios
Receptor de sustancia P	un receptor neuropeptídico
Sinaptopodina	proteína de unión a actina, implicada en la formación del aparato de la columna vertebral en las neuronas
Conexina 32	componente principal de la mielina periférica
Factor de necrosis tumoral a	regulación de las células inmunes
Ubiquitina C-terminal hidrolasa L1	especificidad neuronal (Alzheimer y Parkinson)

Ejemplo 4 (Ejemplo de referencia). Identificación de proteínas clave involucradas en la respuesta de cultivo de células epidérmicas al calcitriol - Análisis proteómico

5 Una serie de cultivos de HEKa se trataron con calcitriol, y se recogieron los sedimentos celulares a las 3, 6 y 24 horas después de la exposición al calcitriol³. Se analizaron luego los sedimentos celulares usando métodos proteómicos, tales como análisis de inmunotransferencia de tipo Western y gel 2-D. En el experimento que se describe a continuación, se trataron células HEKa con calcitriol 0,1 µg/ml, y se procesaron las muestras obtenidas a las 3, 6 y 24 horas mediante electroforesis en gel 2-D y el análisis comparativo asociado (resultados no mostrados).

10 En total, se realizó un análisis de aproximadamente 458 manchas de proteína en el estudio comparativo, comparando la muestra de control frente a las muestras de tratamiento de 3, 6 y 24 horas. Se identificaron seis manchas que mostraban cambios diferenciales estadísticamente significativos. Se cortaron estas manchas, y se sometió su contenido de proteína a identificación de secuencia mediante digestión con tripsina y caracterización por espectrometría de masas.

15 Los resultados (tabla 4-1) mostraron que el conjunto de seis manchas de las muestras de queratinocitos HEKa contenía queratinas endógenas puras, a diferencia de la queratina observada a menudo como contaminante habitual. Se identificaron dos proteínas S100 como fuertemente reguladas, junto con glutatión S-transferasa y galectina 1. Hubo evidencia de que la galectina 1 estaba glicosilada.

20 Tabla 4-1 Proteínas identificadas como fuertemente moduladas por calcitriol basándose en el estudio de electroforesis en gel 2-D

Mancha	Proteína identificada	Nombre	Respuesta	Función	Localización celular
4	Glutatión S-transferasa	GST	incremento a las 3, 6 y 24 horas	Transferencia de GST	Citoplasma
2	Queratina 1	KRT1	incremento a las 6 horas y disminución a las 24 horas	de filamentos intermedios	Citoplasma
8	Queratina 17	KR17	disminución a las 24 horas	de filamentos intermedios	Citoplasma
10	S100 A9 (Calprotectina)	S100A9	disminución a las 6 y 24 horas	Proteína de unión a calcio	Citoplasma

Mancha	Proteína identificada	Nombre	Respuesta	Función	Localización celular
14	S100 A13	S100A13	incremento a las 6 y 24 horas	Proteína de unión a calcio	Citoplasma
27	Galectina 1	LGALS1	incremento a las 6 y 24 horas	proteína de unión a beta-galactósido	Extracelular

Las dos proteínas S100 (A9 y A13) pertenecen a la familia de proteínas de calprotectina. Hay 21 tipos diferentes de estas proteínas de bajo peso molecular en la familia. Estas proteínas S100 se unen al calcio (motivo de mano EF), y se expresa cada tipo de manera específica de la célula y en un nivel que depende de factores ambientales. Diversas enfermedades están asociadas con niveles alterados de proteínas S100 (cardiomiopatías, trastornos neurodegenerativos e inflamatorios y cáncer). Obsérvese que las proteínas S100 también se identificaron en los resultados del alineamiento de anticuerpos como reguladas por incremento tras contacto con calcitriol.

Ejemplo 5 (Ejemplo de referencia). Efecto del calcitriol sobre el crecimiento de queratinocitos

Una serie de cultivos de HEKa se trataron con diferentes concentraciones de calcitriol, y se analizó el comportamiento de crecimiento de las células HEKa después de un periodo de crecimiento predeterminado. Todos los experimentos se realizaron en formato de placa de 96 pocillos. Cada pocillo contenía la misma cantidad de células HEKa en aproximadamente 100 µl de medio (generalmente entre 2.000 - 5.000 células/pocillo). Se disolvió el calcitriol en etanol para producir una disolución madre. La disolución madre se diluyó en serie 1:2 con los medios de crecimiento, cubriendo un intervalo de entre 4,0 µg/ml y aproximadamente 15,5 ng/ml (9 concentraciones de prueba). Se añadieron aproximadamente 100 µl de cada concentración de prueba de calcitriol a un pocillo de prueba correspondiente, dando como resultado un volumen final de aproximadamente 200 µl/pocillo. Las concentraciones de calcitriol sometidas a prueba están en el intervalo de entre 2,0 - 0,008 µg/ml (por ejemplo, correspondía a las columnas 2 a 10 en la placa de 96 pocillos). La columna 11 se usó como control negativo (sin calcitriol). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Tal como se muestra en la figura 2, se tituló el calcitriol en células HEKa en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,008-2,0 µg/ml. Los niveles más bajos de calcitriol se toleraron bien en las células HEKa, y el calcitriol parece estimular ligeramente el crecimiento de las células HEKa (~10-20%). Sin embargo, a concentraciones de calcitriol de aproximadamente 1,0 µg/ml o mayores, se inhibe el crecimiento celular. La respuesta global a la dosis de las células HEKa al calcitriol concordó a lo largo de una serie de diecinueve experimentos independientes a lo largo de un periodo de aproximadamente seis semanas (datos no mostrados).

Ejemplo 6 (Ejemplo de referencia). Efecto del calcitriol sobre el crecimiento de células cancerosas

A diferencia de lo que se observó en queratinocitos normales HEKa, no se observaron efectos significativos de fomento o inhibición del crecimiento para la mayoría de las líneas de células inmortalizadas o de cáncer sometidas a prueba, incluyendo SkBr-3 (cáncer de adenocarcinoma de mama, Her2 sobreexpresado), SKMEL-28 (melanoma), PaCa2 (carcinoma de páncreas), NCI-ES-0808 y NIH-3T3 (fibroblastos inmortalizados). Una curva de crecimiento a modo de ejemplo que presentan tales líneas celulares inmortales/de cáncer se muestra en la figura 3 para la línea celular de carcinoma de páncreas PaCa2. Obsérvese que el crecimiento de PaCa2 no se vio afectado en un amplio intervalo de concentraciones de calcitriol.

Una de las dos líneas celulares de cáncer sometidas a prueba, MCF-7 (cáncer de mama con mutación p53) y HepG2 (cáncer de hígado), respondieron de manera similar a la estimulación con calcitriol a bajas concentraciones de vitamina D3 (0,05-0,25 µg/ml), y la inhibición de calcitriol a altas concentraciones de calcitriol (> 0,5 µg/ml). Véase la figura 4.

Estos datos sugieren que los compuestos de vitamina D en cuestión, cuando se aplican a queratinocitos normales (tales como HEKa) hasta un cierto límite de concentración, pueden ser capaces de fomentar el crecimiento de estos queratinocitos normales, sin fomentar simultáneamente el crecimiento de células cancerosas. Superando el límite de concentración, los compuestos de vitamina D pueden inhibir de hecho el crecimiento de queratinocitos normales.

Ejemplo 7 (Ejemplo de referencia). Efecto protector del calcitriol sobre las células HEKa frente a diversos fármacos quimioterápicos

Este ejemplo demuestra que, con pocas excepciones, los compuestos de vitamina D de la invención pueden proteger los queratinocitos normales (como HEKa) frente a los efectos citotóxicos de la mayoría de los tipos de fármacos quimioterápicos de primera línea. Específicamente, se sometieron a prueba diecisiete fármacos anticancerígenos para evaluar el impacto del calcitriol sobre el efecto citotóxico de estos fármacos. Los nombres de los fármacos y sus mecanismos de acción respectivos se enumeran en la tabla a continuación.

Tabla 7-1 Fármacos sometidos a prueba para determinar la actividad quimio protectora del calcitriol en células HEKa

Fármaco sometido a prueba	Mecanismo
Doxorubicina	citotóxico
5-FU	antimetabolito de pirimidina
Tamoxifeno	se une a receptores de estrógenos
Irinotecán	inhibidor de topoisomerasa 1
Paclitaxel	inhibidor mitótico
Carboplatino	agente alquilante de ADN
Etopósido	inhibidor de topoisomerasa 2
Ciclofosfamida	agente alquilante
Cisplatino	agente alquilante de ADN
Erlotinib (Tarceva)	Inhibidor de tirosina cinasa de EGFR
Gemcitabina	antimetabolito de pirimidina
Estaurosporina	inhibidor inespecífico de cinasas
Vincristina	inhibidor microtubular
Imatinib (Gleevec)	inhibidor de tirosina cinasa (abl, c-kit, PDGF-R)
Gefitinib (Iressa)	Inhibidor de tirosina cinasa de EGFR
Sorafenib	inhibidor de tirosina cinasa (Raf, VEGF-R2, c-kit, PDGF-R)
Dasatinib	inhibidor de tirosina cinasa (BCR/ABL)

- 5 En la primera serie de experimentos, se usaron varios fármacos basados en inhibidores de cinasas en ensayos diseñados para evaluar la capacidad de calcitriol 0,1 $\mu\text{g/ml}$ para proporcionar un efecto protector sobre las células HEKa. Estos incluyen: erlotinib (Tarceva), un inhibidor de Tyr cinasa de EGFR; gefitinib (Iressa), un inhibidor de Tyr cinasa de EGFR; sorafenib, inhibidor de varias Tyr cinasas (Raf, VEGF-R2, c-kit, PDGF-R); dasatinib, un inhibidor de Tyr cinasa BCR/ABL; y estaurosporina, un inhibidor de cinasa relativamente inespecífico.
- 10 Las curvas de dosificación obtenidas en estos experimentos muestran una tendencia general de que, a bajos niveles de dosificación de fármaco (no muy diferentes de los que afectan a la piel de los pacientes sometidos a quimioterapia administrada por vía sistémica), el calcitriol proporcionó cierta estimulación del crecimiento y protegió las células HEKa (véanse las figuras 5-9) Además, parece que el calcitriol tiene un efecto protector más pronunciado frente a inhibidores de cinasas más específicos en comparación con otros inhibidores de cinasas inespecíficos.
- 15 De manera similar, el calcitriol también presentó un nivel moderado de protección frente a bajos niveles de dosificación de agentes alquilantes, tales como cisplatino y carboplatino (véanse las figuras 10 y 11).
- 20 Presumiblemente, el irinotecán inhibe el crecimiento celular a través de la interacción con la topoisomerasa I. También se observó un efecto protector positivo frente al irinotecán en presencia de calcitriol (figura 12).
- El paclitaxel es un inhibidor mitótico. La presencia de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de calcitriol sí que proporcionó algunos efectos protectores frente a paclitaxel (figura 13).
- 25 Los fármacos basados en antimetabolitos de pirimidina, tales como el 5-fluorouracilo (5-FU), actúan de varios modos, pero principalmente como inhibidor de timidilato sintasa. 5-FU bloquea la síntesis de timidina, que se requiere para la replicación del ADN. Por tanto, el 5-fluorouracilo se ha usado de manera tópica para tratar las queratosis actínicas (solares) y algunos tipos de carcinomas basocelulares de la piel. Se observa al menos un efecto protector leve frente a 5-FU cuando estaban presentes 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de calcitriol (figura 14).
- 30 La gemcitabina es un análogo nucleosídico en el que los átomos de hidrógeno en los carbonos 2' de la desoxicitidina se reemplazan por átomos de flúor. De manera similar al fluorouracilo y otros análogos de las pirimidinas, la gemcitabina reemplaza uno de los elementos estructurales de los ácidos nucleicos (que en este caso es la citidina) durante la replicación del ADN. La gemcitabina se usa en el tratamiento de diversos carcinomas: cáncer de pulmón
- 35 de células no pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga y cáncer de mama. La figura 15 muestra que se

observa al menos un leve efecto protector frente a la gemcitabina cuando estaba presente 0,1 µg/ml de calcitriol.

Por otro lado, el calcitriol no parecía proporcionar un efecto protector significativo frente al efecto citotóxico de la doxorubicina (figura 16). Además, cualquier efecto protector frente al tamoxifeno es débil (figura 17). El tamoxifeno se une de manera competitiva a los receptores de estrógenos en tumores y otras dianas tisulares, produciendo un complejo nuclear que disminuye la síntesis de ADN e inhibe los efectos de los estrógenos.

De manera acorde a los datos anteriores, los datos en la figura 18 muestran que se hicieron crecer queratinocitos HEKa estimulados por el calcitriol, y se observaron algunos niveles de protección frente a 5-FU en las células HEKa. Curiosamente, en tres líneas celulares de cáncer sometidas a prueba, Hep-G2, PaCa-2 y SKMEL-28, las curvas de DE₅₀ para los tratamientos con 5-FU no fueron significativamente diferentes de las que también tenían un complemento de calcitriol 0,1 µg/ml. Obsérvese que las células Hep-G2 se vieron levemente estimuladas por el tratamiento con calcitriol, pero su curva de DE₅₀ de 5-FU no cambió sustancialmente ni siquiera en presencia de calcitriol.

De manera similar, la exposición de las siguientes 4 líneas celulares de cáncer sometidas a prueba: Hep-G2, MCF-7, PC-3 y PaCa; 2 - a 0,1 µg/ml de calcitriol para dos pases no alteró la respuesta de estas células a otros fármacos (por ejemplo, doxorubicina, cisplatino y erlotinib).

Estos resultados anteriores sugieren que el calcitriol puede proteger los queratinocitos normales (tales como HEKa) durante la quimioterapia (usando 5-FU, por ejemplo) sin antagonizar la eficacia de la quimioterapia contra las células cancerosas.

Al igual que lo observado en las células HEKa, el calcitriol no pareció alterar apreciablemente el efecto citotóxico de la doxorubicina contra células inmortales/de cáncer tales como SkBr-3, SKMEL-28, PaCa-2, MCF-7, NCI-ES-0808, Hep-G2 y NIH-3T3 (véase la figura 19).

Además, también se exploraron los posibles efectos sinérgicos de los fármacos comerciales con calcitriol. En estos experimentos, se diluyó en serie un fármaco comercial seleccionado, partiendo de una concentración 4 veces mayor que la concentración final deseada para la incubación celular. Mientras tanto, se preparó una disolución madre de calcitriol 0,4 µg/ml, y luego se mezcló con el fármaco diluido en serie (en una razón de 1:1). Luego se incubó la mezcla de fármaco/calcitriol durante al menos 15 minutos y se añadió a los medios celulares (en una razón de 100 µl a 100 µl). Por tanto, la concentración final de calcitriol fue de 0,1 µg/ml.

El periodo de tratamiento farmacológico fue generalmente de tres días. Al final de los tres días, se leyó la DO de fondo de la placa de 96 pocillos a 280 nm, antes de que se añadieran a cada pocillo 20 µl del "Substrate Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent" (Promega). Se devolvió la placa al incubador a 37°C, y se leyó su DO a 490 nm cada hora hasta que se alcanzó una DO de aproximadamente 1,5. El aumento neto de DO se calculó restando la lectura de DO previa al sustrato.

Se calculó el impacto del fármaco sobre las células comparando la DO a diferentes concentraciones en relación con la DO de los pocillos de control (sin el fármaco). Se representaron gráficamente los resultados de la DO neta en función de la concentración del fármaco y se usaron para determinar los valores de DE₅₀.

El análisis de los resultados de las células HEKa indica que no existe interacción entre el calcitriol y la mayoría de los fármacos sometidos a prueba, incluidos 5-FU, doxorubicina, tamoxifeno, irinotecán, paclitaxel, carboplatino, estaurosporina, vincristina, cisplatino, erlotinib, gencitabina, imatinib, gefitinib, sorafinib y dasatinib. También se obtuvieron los mismos resultados cuando se sometió a prueba la combinación de fármacos en otras células. Por tanto, aunque no se desea restringirse a ninguna teoría en particular, parece que los mecanismos de acción del calcitriol y los fármacos anteriores son diferentes.

Ejemplo 8 (Ejemplo de referencia). Pretratamiento de células con calcitriol: pruebas de ensayo basado en células de calcitriol en presencia y ausencia de fármacos de quimioterapia

Los ensayos basados en células anteriores para evaluar la viabilidad celular se usaron en el ejemplo para evaluar el posible efecto protector del calcitriol frente a la acción de fármacos de quimioterapia seleccionados. Se permitió que cada línea celular creciera en presencia de calcitriol 0,1 µg/ml para dos pases celulares. Luego, se utilizaron estas células pretratadas para configurar el ensayo basado en células. Además, se usaron células no tratadas para establecer un experimento paralelo con concentraciones duplicadas de fármaco/calcitriol. Esto permitió una comparación directa de los efectos potenciales de la exposición prolongada al calcitriol antes de la administración del fármaco de quimioterapia.

Después de que se hiciera crecer cada una de las cinco líneas celulares para dos pases celulares en presencia de calcitriol 0,1 µg/ml, sólo las células HEKa se vieron significativamente afectadas en su crecimiento y morfología globales. Las cuatro líneas celulares de cáncer continuaron creciendo y no se vieron alteradas en su aspecto

morfológico general. Sin embargo, las células HEKa dejaron de crecer después de una exposición prolongada al calcitriol, y su morfología cambió a una alargada en una dirección, a diferencia de un aspecto más ramificado antes del tratamiento con calcitriol. Para esta línea celular, se inició un nuevo lote de células y se expuso a un solo pase en presencia de calcitriol, antes de las pruebas en presencia de los fármacos de quimioterapia.

Se seleccionaron tres fármacos de quimioterapia de uso habitual (doxorubicina, cisplatino y erlotinib) para evaluar las células tratadas con calcitriol. Se exploraron los posibles efectos sinérgicos o protectores de los fármacos comerciales con calcitriol. En estos experimentos, se diluyeron en serie los fármacos comerciales, partiendo de una concentración 4 veces mayor que la concentración final deseada para la incubación celular. Se preparó una disolución madre de 0,4 µg/ml de calcitriol y se añadió al fármaco diluido en serie (en una razón 1: 1). Se incubó la mezcla de fármaco y calcitriol durante al menos 15 minutos y se añadió a las células (en una razón de 100 µl a 100 µl). Por tanto, la concentración final de calcitriol fue de 0,1 µg/ml.

El ensayo se realizó de acuerdo con el método descrito previamente para proporcionar sistematicidad y permitir una comparación directa. El resultado se basó en la medición del número total de células viables. Los resultados (no mostrados) indican que el pretratamiento con calcitriol no era necesario para el efecto quimio protector sobre los cultivos celulares. Los resultados fueron casi idénticos entre el grupo de pretratamiento y el grupo de tratamiento simultáneo. Por tanto, una aplicación tópica de calcitriol podría aplicarse al mismo tiempo que la administración sistémica de la quimioterapia. No se requiere una aplicación por etapas.

Ejemplo 9. Protección frente a la alopecia inducida por quimioterapia (AIQ) mediante una nueva formulación de calcitriol

La alopecia es uno de los efectos secundarios más angustiantes de la quimioterapia, para el que no existe una intervención terapéutica actual. Se ha demostrado que la rata neonatal es un excelente modelo para estudiar la alopecia inducida por quimioterapia (AIQ), ya que el patrón de folículos capilares anágenos es similar al de los humanos.

En el presente estudio, se suministró el secoesteroide calcitriol (grado USP) en una formulación tópica (el 40% (p/p) de propilenglicol, USP; y el 60% (p/p) de alcohol deshidratado, 200 Proof, USP sin desnaturalizar para tratar/prevenir la AIQ, de una manera dependiente de la dosis y el tiempo.

Específicamente, se adquirieron ratas Long Evans y Sprague Dawley con crías de Harlan Laboratories, Inc. Se alojaron y se alimentaron de acuerdo con las normas y reglamentos de manipulación de animales aplicables. Se permitió que se aclimataran las crías durante 48 horas antes del inicio de los experimentos. La formulación del secoesteroide calcitriol (citada anteriormente) o el control del vehículo (sin calcitriol) se aplicaron de manera tópica sobre el área de la cabeza y el cuello diariamente, comenzando el día 5 durante 6 días consecutivos. Se aislaron las ratas de sus hermanos de camada y su madre durante periodos de tiempo de 6 horas. Posteriormente, se limpió con agua y jabón el área tratada y se devolvieron sus crías a sus camadas. El día 13, las ratas recibieron etopósido (1,5 mg/kg al día durante 3 días) o ciclofosfamida (CTX) (37,5 mg/kg una vez) o combinación de ciclofosfamida (35 mg/kg una vez) y doxorubicina (2,5 mg/kg al día durante 3 días). Todas las quimioterapias se compraron de Sigma y se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen total de 0,1 ml. La alopecia se registró 10 días después de la última dosis de quimioterapia.

Para los experimentos en los que se trasplantó cloroleucemia a las ratas, el día 5 después del nacimiento, las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos de 45 cada uno. Todas las ratas recibieron 1 × 10⁵ línea celular cloroleucémica MIAC51 (i.p.) en 0,1 ml de RPMI libre de suero (SF). MIAC51 se cultivaron en RPMI 1640 complementado con L-glutamina y suero bovino fetal al 10% a 37°C en un 5% de CO₂, Incubadora 100% de humedad. Se hicieron crecer las células hasta un 50% de confluencia (1,5 × 10⁶ ml) recogidas en tubos cónicos de 50 ml, centrifugadas a 600 g x 10 min. a temperatura ambiente y resuspendido en SF-RPMI a una concentración de 1 × 10⁶/ml. Las ratas del grupo 1 no recibieron tratamiento adicional. Las ratas del grupo 2 recibieron vehículo tópico y CTX el día 13. Las ratas del grupo 3 recibieron la formulación tópica de calcitriol (0,1 µg) y CTX el día 13. Las aplicaciones tópicas se realizaron tal como se describió anteriormente.

El día 23 después del nacimiento, se tomó una muestra de sangre de todas las ratas y se realizaron diferenciales. Se sacrificaron ratas con leucemia, se mantuvieron ratas sin leucemia y se realizó un segundo diferencial el día 31, en cualquier momento si se detectaba leucemia, los animales eran sacrificados por CO₂ asfixia.

Los resultados demostraron que se observó alopecia de cuerpo completo en el grupo que recibió etopósido. En cambio, en las ratas tratadas con 0,1 µg de calcitriol durante 6 horas, se observó protección parcial localizada en todos los animales. En el grupo que recibió 0,3 µg de calcitriol, se logró la protección total del cuerpo. Véanse las figuras 20A y 20B.

En el grupo que recibió ciclofosfamida, las ratas control se volvieron totalmente alopecíficas, mientras que las ratas que recibieron 0,1 µg de calcitriol lograron una protección similar a la observada con etopósido. Del mismo modo, la

administración de 0,3 µg de calcitriol dio como resultado una protección corporal completa en ratas tratadas con ciclofosfamida. Véase la figura 21. Se muestran resultados similares usando otros regímenes de quimioterapia o quimioterapia combinada en las figuras 22A, 22B, 22C y 23.

5 En un experimento separado en el que las ratas fueron trasplantadas con cloroleucemia, los resultados preliminares no mostraron protección de las células cancerosas frente a la ciclofosfamida mediante la aplicación tópica de calcitriol. Véase la figura 24.

10 En conclusión, el pretratamiento con calcitriol en la formulación del sujeto ofreció protección frente a la AIQ sin proteger las células cancerosas. El calcitriol tópico previno la AIQ, de una manera dependiente de la dosis, de la AIQ inducida por quimioterapia simple o combinada. Además, el calcitriol tópico previno la AIQ sin proteger las células cancerosas de los efectos citotóxicos de la quimioterapia.

15 Ejemplo 10. Protección de AIQ por calcitriol tópico en ratas con cloroleucemia que reciben regímenes de quimioterapia múltiple

20 Este estudio verifica el efecto protector de la disolución tópica de calcitriol en un modelo animal de alopecia inducida por quimioterapia de múltiples ciclos. Las ratas usadas en el estudio portan MIAC51, una línea celular de cloroleucemia de rata desarrollada por instilación gástrica de 20-metilcolantreno y la posterior inyección de las células con cloroleucemia en neonatos de ratas. La línea celular MIAC51 provoca leucemia mielógena maligna con características de cloroleucemia humana (leucemia, ascitis leucémica y formación de cloroma). Véase Jiménez *et al.*, Science 238: 1278-1280 (1987).

25 Hasta la fecha, no hay un modelo *in vitro* o no vertebrado eficaz para someter a prueba la alopecia inducida por quimioterapia (AIQ). Entre los modelos más usados, la rata neonatal desarrollada por Jiménez *et al.* ha demostrado una correlación directa con humanos (Int J Cancer 1996; 65: 97-103, incorporado como referencia). Posteriormente, se desarrolló un modelo de rata en el que puede inducirse una segunda etapa anágena mediante el recorte del cabello y permitir de ese modo someter a prueba múltiples ciclos de quimioterapia. Este modelo puede usarse para someter a prueba quimioterapias alopécicas de uso frecuente, incluyendo ciclofosfamida, doxorubicina, paclitaxel, etopósido y citarabina, y sus combinaciones.

30 Cuando se someten a prueba agentes protectores para determinar la alopecia inducida por quimioterapia, es fundamental determinar si el artículo de prueba protegerá los folículos pilosos y también las células cancerosas frente a la quimioterapia y/o interferirá en la terapia. El modelo de rata neonatal de leucemia, desarrollado por Jiménez *et al.* brinda la oportunidad de someter a prueba simultáneamente cualquier efecto del compuesto de vitamina D sobre el desarrollo de leucemia, el tratamiento de leucemia, la interacción potencial con agentes quimioterápicos y el efecto del compuesto de vitamina D sobre la prevención de la alopecia inducida por quimioterapia. Este modelo también responde a la cuestión de si múltiples ciclos del agente de prueba en los mismos animales darán como resultado la protección de los folículos capilares múltiples veces. Además, al usar la rata pigmentada Long Evans, el estudio también permite determinar si el agente de prueba protege el color del pelo.

35 La formulación de calcitriol es un líquido anhidro, transparente que contiene calcitriol de grado USP en un vehículo que contiene propilenglicol de grado USP (el 40% p/p) y etanol absoluto anhidro, 200 Proof (el 60% p/p). La concentración de calcitriol en estos estudios es de ~ 0,2 µg/100 µl (2 µg/ml). El artículo de prueba se recibe en hielo y se almacena inmediatamente a 4-5°C tras su llegada. El lote se subdividirá entonces en tubos de 4,5 ml mientras se mantiene en hielo. Dado que los grupos de animales no serán menores de 40 por variable, cada unidad de 4,5 ml del artículo de prueba se envasará en un tubo de polipropileno a 4-5°C con el número de lote. Los tubos de 4,5 ml del artículo de prueba se guardarán en cajas oscuras y sólo se sacará de la nevera la cantidad necesaria por experimento. Se someterá a ensayo una muestra del artículo de prueba envasado en un tubo de 4,5 ml a intervalos regulares para determinar los niveles de calcitriol. En el momento de los experimentos, los tubos se mantendrán en hielo mientras se tratan las ratas.

40 El vehículo se compone de propilenglicol de grado USP (el 40% p/p) y etanol absoluto anhidro y sin desnaturalizar de grado USP, 200 Proof (el 60% p/p). En el momento de los experimentos, el vehículo de control se manipula exactamente como el artículo de prueba.

45 Tanto el artículo de prueba como el vehículo en sí se someten a prueba. Cada grupo de prueba consiste en 40 animales, lo que es estadísticamente significativo para este estudio. Este número incluye la exclusión del modelo y tiene en cuenta cualquier eventualidad que reduzca el número de animales. A todos los animales se les inyecta MIAC51 cuando tienen 5 días de edad. Se someten a prueba cinco (5) regímenes de quimioterapia: ciclofosfamida, ciclofosfamida/doxorubicina, ciclofosfamida/doxorubicina/citarabina, ciclofosfamida/paclitaxel/etopósido y doxorubicina/paclitaxel/etopósido. Los grupos de prueba son: sin quimioterapia, quimioterapia sola, quimioterapia + vehículo, quimioterapia + artículo de prueba = 160 animales por régimen de quimioterapia. Por tanto, el número estimado final de animales usados es el siguiente: 5 regímenes combinados de quimioterapia × 160 animales = 800 crías/ratas. Para los experimentos que usan el modelo de rata adulta en segunda fase anágena, sólo se usan animales libres de cáncer (por ejemplo, aquellos que han sobrevivido a la quimioterapia), mientras que se sacrifican

los animales que muestran signos tempranos de leucemia.

Cultivo de la línea celular MIAC51 de cloroleucemia de Shay: se cultiva MIAC51 en el incubador con el 5% de CO₂ con el 100% de humedad a 37°C tal como se describió previamente (Science 1987; 238: 1278-80). Se hacen crecer las células en frascos tratados de cultivo no tisular (Falcon) en medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con L-glutamina y suero bovino fetal al 10% (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA). Antes de la inyección de células en los animales, se hacen crecer hasta un 50% de confluencia y se recogen en tubos cónicos. Luego, se centrifugan las células a 600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspenden a una concentración de 1×10^6 en RPMI 1640 sin suero bovino fetal. Se transfiere luego la suspensión celular a jeringas de insulina de 1/2 cc de calibre 29 (ga) en condiciones estériles.

Inyección de MIAC51: Todas las crías tienen cinco días después de la inyección de MIAC51 y se restringen manualmente. Se tira suavemente de la pata derecha y se limpia el área con un algodón con alcohol. Luego se inyecta MIAC51 por vía intraperitoneal. La aguja, el camino y las células en la jeringa son estériles y se usa una jeringa nueva para cada inyección. El desarrollo de signos tempranos de leucemia se observa generalmente durante los días 21-33. Por tanto, se realizan frotis de sangre los días 23 y 31. Sólo los animales que no tienen cáncer se afeitan el día 31, mientras que el resto se sacrifica.

Administración del artículo de prueba y de control en la primera etapa anágena en la rata neonatal: a cada camada se le administra o bien vehículo o bien artículo de prueba de manera tópica en el área de la cabeza y el cuello de aproximadamente 2 cm². Para ratas de 5 y 6 días de edad, se aplican 100 µl en 4 alícuotas de 25 µl 4 veces para tener en cuenta de su tamaño más pequeño. Se aplica el artículo de prueba o el vehículo con una micropipeta calibrada usando puntas estériles de 200 µl. Una vez que el artículo de prueba o vehículo está en la superficie de la cabeza, se frota con un dedo cubierto con un guante hasta su total absorción. Inmediatamente después, se aplica otra alícuota a la cabeza y se repite el proceso hasta que se apliquen 100 µl de artículo de prueba o vehículo total. En animales de 7, 8, 9 y 10 días, se aplican alícuotas de 50 µl dos veces. En animales mayores, pueden aplicarse 100 µl en una dosis. La aplicación del artículo de prueba se aplica en la cabeza y el cuello, y se frota con un guante de nitrilo resistente a los disolventes durante 10 segundos con el dedo índice derecho. La justificación que subyace a este régimen de aplicación es que a diferentes edades, la tasa de saturación puede diferir, y la administración del artículo de prueba o vehículo también puede diferir. Una vez que la disolución ha penetrado completamente en la piel, las crías se mantendrán aisladas en jaulas con compartimentos aislados diseñados especialmente durante 6 horas. Luego se lavan las crías con un jabón de manos suave de laboratorio (Soft-Cide EC, VWR international) y se secan cuidadosamente con toallitas de papel.

Administración de quimioterapia en la primera etapa anágena en la rata neonatal: Cuarenta crías reciben cada régimen de quimioterapia, 40 reciben cada régimen de quimioterapia y artículo de prueba, y 40 reciben cada régimen de quimioterapia y vehículo. Como control, 40 animales no reciben quimioterapia. Se obtiene un promedio de los pesos de cada camada y se usa para preparar una concentración adecuada de quimioterapia. Las quimioterapias se inyectan por vía intraperitoneal en un volumen de aproximadamente 100 µl de acuerdo con el peso de los animales usando jeringas de insulina de 1/2 cc de 29 ga. Al inyectar, se tira suavemente de la pata derecha de cada cría y se limpia el área con un algodón con alcohol.

Administración del artículo de prueba y de control en la segunda etapa anágena de la rata adulta: Los sobrevivientes que han demostrado estar libres de cáncer el día 31 de acuerdo con el análisis hematológico de los frotis de sangre se restringen manualmente y se afeitan en el área de la cabeza y el cuello (2-3 cm²) Nueve días después, cuando las ratas tienen entre 40 y 45 días de edad, inclusive, se aplica o bien vehículo o bien artículo de prueba en el área de la cabeza y el cuello. Se aplica una cantidad de 100 µl en una dosis en la cabeza y el cuello, y se frota con un guante de nitrilo resistente a los disolventes durante 10 segundos con el dedo índice derecho. Una vez que la disolución ha penetrado completamente en la piel, las ratas individuales se mantienen aisladas en jaulas. Luego, se lavan las ratas con jabón de manos suave de laboratorio (Soft-Cide EC, VWR international) y se secan cuidadosamente con toallitas de papel.

Administración de quimioterapia en la rata adulta en la segunda etapa anágena: Cada grupo recibe de 1 de 5 regímenes de quimioterapia diferentes, comenzando el día 47 y terminando el día 53 para aquellos que reciben citarabina combinada. Se obtiene un promedio de los pesos y se usa para preparar una concentración adecuada de quimioterapia. Las quimioterapias se inyectan por vía intraperitoneal en un volumen de aproximadamente 100 µl de acuerdo con el peso de los animales usando jeringas de insulina de 1/2 cc de 29 ga. Para administrar la quimioterapia, se restringen manualmente las ratas sin anestesia. El área de inyección se limpia con un algodón con alcohol.

Vía de administración: El artículo de prueba y el vehículo se aplican por vía dérmica. Las quimioterapias se inyectan por vía intraperitoneal.

Frecuencia y duración de la administración y niveles y volúmenes de dosis: El artículo de prueba y el vehículo se administran diariamente durante 6 días para el primer y el segundo ciclo anágeno. El artículo de prueba contiene

una concentración de 2 µg/ml de calcitriol en el propilenglicol/etanol, y el vehículo contiene sólo el vehículo de propilenglicol/etanol. Las quimioterapias se administran en función del peso en un volumen de aproximadamente 100 µl por vía intraperitoneal.

5 *Observación visual y calificación de la alopecia:* La alopecia total (cabeza y cuello) o del cuerpo completo se califica usando la siguiente escala: 0 = sin alopecia; 1+ = el 0-25% de alopecia; 2+ = el 25-50% de alopecia; 3+ = el 50-75% de alopecia; 4+ = el 75-100% de alopecia. La escala de observación visual se usa diariamente para calificar la alopecia mientras se realizan observaciones de rutina de la jaula. Además, esta escala complementa la documentación fotográfica una vez que a toda la camada o las ratas adultas se les ha caído el pelo.

10 Ejemplo 11. Estudio de absorción dérmica: aplicación tópica de disolución de calcitriol en minicerdos Gottingen® y cuantificación de calcitriol en piel porcina ex vivo

15 Los cerdos se usan con frecuencia en estudios de toxicidad que involucran la vía dérmica de administración porque la piel del cerdo es muy similar a la de los humanos. Por tanto, se usaron cerdos en este estudio para evaluar la tolerabilidad dérmica y la penetración dérmica de la formulación tópica de calcitriol en minicerdos Gottingen®, después de 7 días desde la administración dérmica.

20 A un grupo de tratamiento de tres minicerdos Gottingen® macho y tres hembra se les administró el artículo de prueba o de placebo por vía dérmica en cinco sitios de administración independientes a concentraciones de dosis de 0 (placebo), 1, 3, 10 y 30 µg/ml. A un grupo de tratamiento adicional de un minicerdo macho se le administró el artículo de prueba o de placebo por vía dérmica en dos sitios de administración independientes, a concentraciones de dosis de 0 (placebo) y 100 µg/ml, respectivamente. El artículo de placebo o de prueba se administró a una tasa de aplicación de 4 mg/cm² (equivalente a 144 mg en un área de prueba de 6 cm × 6 cm, o 166 µl de disolución de prueba, que contiene el principio activo a diversas concentraciones y vehículo, por sitio de aplicación a ambos grupos dos veces al día, con una separación de aproximadamente 6 horas, durante 7 días durante el estudio.

30 Se realizaron observaciones de morbilidad, lesiones y la disponibilidad de alimentos y agua dos veces al día para todos los animales. Se realizaron observaciones clínicas a diario. Se realizó la evaluación de la reacción cutánea antes de la prueba y diariamente antes de la dosificación. Se midieron y registraron los pesos corporales antes de la prueba y de manera terminal (día 7). Se realizaron exploraciones físicas antes de la prueba. En la terminación del estudio, se realizaron exámenes de necropsia y se recogieron y conservaron secciones de piel tratada y no tratada. Se realizó un examen microscópico de cada uno de los sitios de la piel, así como un sitio de la piel no tratado cerca de los sitios tratados.

35 Los resultados muestran que la administración dérmica de la formulación tópica de calcitriol a concentraciones de 0, 1, 3, 10, 30 y 100 µg/ml a minicerdos Gottingen® se toleró bien. No se observó ningún efecto del tratamiento sobre la supervivencia, los hallazgos clínicos, la irritación dérmica, el peso corporal, el examen macroscópico o microscópico de la piel en cualquiera de los sitios de tratamiento (datos no mostrados). Los datos del estudio de distribución tisular indican que el calcitriol fue medible en la mayoría del estrato córneo y otras partes de las muestras epidérmicas, pero no en la muestra dérmica (con la única excepción de la aplicación de la dosis de 100 µg/ml en un único minicerdo macho). En este conjunto de experimentos, los machos parecían demostrar mayores niveles en tejido de calcitriol que las hembras. La correlación de dosis aplicada más clara con el nivel en tejido se observó en la epidermis, con un aumento casi lineal con concentraciones crecientes de calcitriol de desde 3 hasta 100 µg/ml.

45 Específicamente, el placebo (una mezcla 40/60 (p/p) de propilenglicol (USP) y etanol (sin desnaturalizar) anhidro, 200 Proof – EE.UU., USP), y la formulación tópica de calcitriol, se usaron a las concentraciones previamente formuladas de 1, 3, 10, 30 y 100 µg/g. El artículo de prueba se administró puro (sin diluir). Se dispensaron formulaciones de los artículos de placebo y de prueba para cada concentración requerida una vez para uso diario, y se almacenaron a temperatura ambiente.

50 Marshall BioResources, North Rose, Nueva York, recibió un total de tres minicerdos Gottingen® macho y tres hembra, no tratados previamente a nivel experimental (aproximadamente de 4 a 5 meses de edad). Un macho adicional (aproximadamente de 4,5 meses de edad en el momento de la recepción) se transfirió posteriormente de la colonia de existencias. Usando un procedimiento de aleatorización simple, se asignaron cuatro animales macho y tres hembra (con un peso de 11,75 a 15,55 kg y de 14,50 a 16,65 kg, respectivamente, en la aleatorización) a los grupos de placebo y tratamiento. Los artículos de placebo y de prueba se administraron por vía dérmica dos veces al día con una separación de aproximadamente 6 horas durante 7 días durante el estudio. Las concentraciones de dosis fueron de 0, 1, 3, 10, 30 y 100 µg/ml, y se administraron a una tasa de aplicación de 4 mg/cm² (equivalente a 144 mg o 166 µl de disolución de prueba). Antes del inicio de la administración (días -4 y -5 para los grupos 1 y 2, respectivamente), se recortó el pelo de los sitios de aplicación usando una cortadora eléctrica. Se tuvo cuidado para evitar producir abrasión de la piel. La superficie dorsal de cada animal se dividió en cinco sitios de aplicación para el grupo 1 y dos sitios de aplicación para el grupo 2. Cada sitio de aplicación tenía aproximadamente 6 × 6 cm con al menos un espacio de 2 cm entre cada sitio. Las formulaciones de artículo de placebo y de prueba se aplicaron uniformemente sobre el sitio de aplicación especificado con una varilla de agitación de vidrio o un instrumento

apropiado. Antes de la dosificación, se retiró suavemente el artículo de prueba residual de la dosis anterior usando una toallita de papel suave (es decir, WyPall®) humedecida con agua del grifo.

5 Al final del estudio, se reflejó la piel a partir de una incisión de línea media ventral, y se recogieron y preservaron secciones de piel tratada y no tratada. En primer lugar se lavaron meticulosamente secciones de cada sitio de dosificación de 6 x 6 cm con una mezcla de agua y jabón suave (por ejemplo, jabón Ivory al 1% en agua o equivalente) para retirar cualquier formulación de prueba tópica residual. Las secciones de piel lavadas se limpiaron entonces con etanol y se cortaron hasta la capa adiposa incluida. Si el área que ha de cortarse es mayor que el área dosificada, se marcó el área dosificada con tinta indeleble para delinear el área de la piel que se dosificó. Las secciones de 1,5 cm x 1,5 cm se dispusieron planas, se envolvieron en dos capas de envoltura Saran (o equivalente) y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -70°C y se enviaron en hielo seco a través de un servicio de mensajería durante la noche para su análisis. Cada sección de piel se identificó según fue apropiado (por ejemplo, identificación de animales, número de estudio, fecha, etc.

15 Al llegar al sitio de análisis, se pusieron las secciones de piel en una bolsa de plástico estanca al agua y se descongelaron por inmersión en agua tibia (~30°C - 35°C). Cada sección de piel se enjuagó suavemente con agua desionizada destilada para retirar cualquier cantidad residual de artículo de prueba y sangre. Se retiró todo el tejido subcutáneo (por ejemplo, adiposo) mediante ablación manual con bisturí. Dentro de la región central del área dosificada, se marcaron cuatro círculos de 1 cm² individuales (réplicas) y posteriormente se identificó cada sitio y se registró el área real. Los sitios de prueba replicados se cortaron de la lámina de piel usando un punzón de 1 cm². Se pesaron las secciones de piel y se registró el peso. Se retiró la cinta adhesiva (Transpore™, 3M) de cada área marcada replicada cinta suficientes veces (~10 - ~20) hasta que aproximadamente el 10% - 25% de la superficie del área demostró brillo. Este proceso retiró el estrato córneo y cualquier dosis superficial residual.

25 Después de retirar la cinta, se separó la piel en la epidermis (sin estrato córneo, denominado simplemente más adelante en el presente documento "epidermis") y la dermis mediante exposición a calor hasta 60°C durante aproximadamente 1-1,5 minutos. Luego se separaron las capas de la piel con unas pinzas de punta fina o bisturí. Se pesaron la epidermis y la dermis y se registró el peso.

30 Para la extracción, se extrajeron todas las muestras de piel en 1 ml de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, grado USP/NF). Se extrajeron las tiras de cinta adhesiva en 5 ml de acetonitrilo (EMD, grado HPLC). Todas las extracciones se realizaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. Una cantidad de 500 µl del extracto de tira de cinta adhesiva se secó por centrifugación a vacío y se reconstituyó en 100 µl de acetonitrilo absoluto. El extracto epidérmico también se secó y se reconstituyó en 100 µl de etanol:agua 80:20.

35 La cuantificación de calcitriol se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de fase inversa con detectores de ultravioleta y espectroscopía de masas. El límite inferior de detección se estima en 0,4 ng/ml.

40 Los resultados para la cuantificación de calcitriol, del estrato córneo (tiras de cinta adhesiva), la epidermis y dermis se resumen en las tablas 11-1 a 11-4. Las figuras 25A y 25B ilustran los niveles en el estrato córneo y la epidermis, respectivamente, y la figura 26 ilustra los niveles epidérmicos sólo en machos. Los datos del estrato córneo se proporcionan en dos unidades diferentes, ng/cm², para reflejar la cantidad de calcitriol recuperado en las muestras con la cinta adhesiva retirada en función del área de la muestra, y como µg/mg de tejido estimado. Sin embargo, la concentración notificada, como µg/mg, está determinada por el peso total diferencial de muestra antes de la separación de la capa menos los pesos de la epidermis y la dermis para esa muestra (en lugar del peso real debido a su adherencia a las tiras de cinta adhesiva). Las muestras epidérmicas y dérmicas se notifican como concentración de tejido (ng/mg) usando la cantidad medida de la muestra dividida entre el peso húmedo real de la capa de piel.

50 Tabla 11-1 Estrato córneo (ng/cm²) Media ± D.E. de calcitriol recuperado (n = Número de animales [4 réplicas/animal])

Tratamiento	Minicerdos macho	Minicerdos hembra
No tratados	0 ± 0* (1)	n/A
Placebo	30,2± 35,0 (4)	0 ± 0 (3)
1 µg/ml	56,1 ± 17,4 (3)	0,76 ± 1,3 (3)
3 µg/ml	62,4 ± 7,91 (3)	1,12 ± 1,49(3)
10 µg/ml	59,6 ± 14,1 (3)	1,65 ± 1 80 (3)
30 µg/ml	54,6 ± 32,5 (3)	20,2 ± 11,7 (3)

ES 2 742 750 T3

Tratamiento	Minicerdos macho	Minicerdos hembra
100 µg/ml	118,1 ± 11,4 (1)	na

• Los ceros indican que los resultados están por debajo del límite inferior de detección
• na = no aplicable

Tabla 11-2 Estrato córneo estimado (ng/mg) Media ± D.E. de calcitriol recuperado (n = Número de animales [4 réplicas/animal])

Tratamiento	Minicerdos macho	Minicerdos hembra
No tratados	0 ± 0* (1)	na
Placebo	0,92 ± 1,07 (4)	0 ± 0 (3)
1 µg/ml	1,54 ± 0,79 (3)	0,03 ± 0,05 (3)
3 µg/ml	1,63 ± 0,25 (3)	0,04 ± 0,06 (3)
10 µg/ml	2,02 ± 0,39 (3)	0,05 ± 0,04 (3)
30 µg/ml	1,51 ± 0,89 (3)	0,64 ± 0,37 (3)
100 µg/ml	4,52 ± 1,21 (1)	na

• Los ceros indican que los resultados están por debajo del límite inferior de detección
• na = no aplicable

5

Tabla 11-3 Epidermis (ng/mg) Media ± D.E. de calcitriol recuperado (n = Número de animales [4 réplicas/animal])

Tratamiento	Minicerdos macho	Minicerdos hembra
No tratados	0 ± 0* (1)	n/A
Placebo	0,12 ± 0,23 (4)	0 ± 0 (3)
1 µg/ml	0,16 ± 0,28 (3)	0 ± 0 (3)
3 µg/ml	0,14 ± 0,23 (3)	0 ± 0 (3)
10 µg/ml	0,23 ± 0,20 (3)	0,02 ± 0,04 (3)
30 µg/ml	0,38 ± 0,33 (3)	0,34 ± 0,24 (3)
100 µg/ml	2,09 ± 1,0 (1)	n/A

• Los ceros indican que los resultados están por debajo del límite inferior de detección
• na = no aplicable

Tabla 11-4 Dermis (ng/mg) Media ± D.E. de calcitriol recuperado (n = Número de animales [4 réplicas/animal])

Tratamiento	Minicerdos macho	Minicerdos hembra
No tratados	0,08 ± 0,01 (1)	n/A
Placebo	0,02 ± 0,03 (4)	0 ± 0* (3)
1 µg/ml	0 ± 0 (3)	0 ± 0 (3)
3 µg/ml	0 ± 0 (3)	0 ± 0 (3)
10 µg/ml	0 ± 0 (3)	0 ± 0 (3)
30 µg/ml	0 ± 0 (3)	0 ± 0 (3)
100 µg/ml	0,13 ± 0,04 (1)	n/A

• Los ceros indican que los resultados están por debajo del límite inferior de detección.
• na = no aplicable

5 Los datos indican que el calcitriol era medible en la mayoría de las muestras de estrato córneo y epidérmicas, pero no en las muestras dérmicas (con la única excepción de la aplicación de dosis de 100 µg/ml a un único minicerdo macho). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el modelo de dosis finitas de piel humana de Franz descrito anteriormente en el ejemplo 1.

A través de las muestras de tejido evaluadas, los minicerdos macho parecieron demostrar, en general, mayores niveles en tejido de calcitriol que los minicerdos hembra.

10 Se observó que las mayores concentraciones de calcitriol se encontraban en el estrato córneo. Aunque el contenido en el estrato córneo es un valor estimado, su mayor concentración puede reflejar la presencia de calcitriol de manera profunda en los poros de la piel, no retirado por el proceso de lavado de superficie, o podría atribuirse a la solubilidad del calcitriol en la matriz muy lipófila del estrato córneo.

15 Sin embargo, la correlación de dosis aplicada más clara con el nivel en tejido se observó en la epidermis con un aumento casi lineal de las concentraciones de calcitriol a partir de las aplicaciones de 3 a 100 µg/ml.

Ejemplo 12. Estudio de disolución tópica en ratas con cloroleucemia que reciben quimioterapia de múltiples ciclos

20 Las ratas Long Evans (Harlan Laboratories, Inc) tenían 3 días de edad a su llegada. El peso de los animales se obtuvo al llegar y todos los días hasta la conclusión de los experimentos usando una balanza electrónica (American Scientific Products TL 410s). Se alojaron las ratas durante dos días antes del comienzo de los experimentos. Entonces se aleatorizaron los animales en cuatro grupos. Todas las ratas recibieron MIAC51 tal como se describe a continuación.

25

- El grupo 1 (n = 27) no recibió tratamiento adicional.

- El grupo 2 (n = 40) recibió sólo quimioterapia.

30

- El grupo 3 (n = 40) recibió quimioterapia y vehículo tópico tal como se describe a continuación.

- Grupo 4, (n = 40) recibió quimioterapia y calcitriol tópico.

35 Se iniciaron los tratamientos el día 6 después del nacimiento. Se aplicó de manera tópica una cantidad de 0,1 ml de calcitriol tópico en la parte superior de la cabeza y el cuello de las ratas. Para el primer ciclo anágeno, en los días 6 y 7, se aplicó o bien vehículo o bien calcitriol en un volumen de 25 µl cuatro veces para evitar la saturación. Los días 8, 9, 10 y 11, se aplicó dos veces un volumen de 50 µl. Para el segundo ciclo anágeno, se trataron las ratas con 0,1 ml de vehículo o calcitriol diariamente en los días 40 a 45. Cada aplicación implicó frotar un área de 2 cm² durante 10 segundos con el dedo índice derecho cubierto con un guante de examen de nitrilo. Después de completarse los tratamientos, se separó cada rata individualmente durante 6 horas. Posteriormente, se lavaron la cabeza y el lomo de cada rata con un jabón de manos suave (Soft CIDE-EC de VWR International) y agua destilada. Se devolvieron luego las crías a sus madres y se llevaron de vuelta a las salas para animales. Para el segundo ciclo anágena, se devolvieron las ratas adultas a sus jaulas con sus hermanos de camada y se llevaron de vuelta a las salas para animales.

45

El día 5 después del nacimiento, todas las ratas recibieron 1x10⁵ MIAC51 por vía intraperitoneal en 0,1 ml de RPMI libre de suero (SF). Los MIAC51 se cultivaron en RPMI 1640 complementado con L-glutamina y suero bovino fetal al 10% a 37°C en un incubador con el 5% de CO₂ y el 100% de humedad. Se hicieron crecer las células hasta el 50% de confluencia (1,5x10⁶ ml), se recogieron en tubos cónicos de 50 ml, se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en SF-RPMI a una concentración de 1x10⁶/ml antes de la inyección.

50

El día 23 después del nacimiento, se extrajo una muestra de sangre de todas las ratas y se realizaron diferenciales. Se sacrificaron las ratas con leucemia mientras que las ratas sin leucemia se usaron para experimentos adicionales. Se realizó un segundo diferencial el día 31 y se sacrificaron los animales leucémicos. A los animales sobrevivientes se le afeitó un área de 2 cm² antes de la administración del segundo conjunto de tratamiento con vehículo o calcitriol y se administró un segundo ciclo de quimioterapia 15 días después. Tanto en la segunda como en la primera fase anágena, se registró alopecia diez días después del tratamiento con quimioterapia.

55

La extensión de la alopecia en cada rata se determinó mediante la siguiente escala:

60

0 = sin alopecia

1+ = el 0-25% de alopecia

65

2+ = el 25-50% de alopecia

3+ = el 50-75% de alopecia

4+ = el 75-100% de alopecia

5 Compuestos experimentales

Se diluyó la formulación de calcitriol 2,3 µg/g con el vehículo (el 40% en peso de propilenglicol y el 60% en peso de etanol 200 Proof anhidro) hasta una concentración final de 2 µg/ml. Se subdividieron los viales de 1 ml y se mantuvieron en la nevera a 4°C. Para cada experimento, se extrajeron un vial de calcitriol 2,3 µg/g y de vehículo y se pusieron en hielo durante el procedimiento experimental. Se desecharon las preparaciones no usadas.

A. Ciclofosfamida sola

Administración de quimioterapia

Ratas jóvenes: El día 13, todas las ratas recibieron ciclofosfamida (CTX) (Sigma Aldrich, lote #068k1131) 37,5 mg/kg por vía intraperitoneal usando una jeringa de insulina de ½ cc 29G ½" (B-D) en un volumen total de 0,1 ml de mezcla de H₂O/manitol.

Ratas adultas: Para el segundo ciclo de quimioterapia, se administró ciclofosfamida 150 mg/kg a ratas de 47 días de edad anestesiadas (ketamina 50 mg/kg/xilazina 5 mg/kg) por vía intraperitoneal usando una jeringa de insulina de ½ cc 29G ½" (BD) en un volumen total de 0,1 ml de mezcla de H₂O/manitol.

Se observan los resultados en las tablas 12-1 y 12-2. Específicamente, después de la primera tanda de quimioterapia (tabla 12-1 y figura 27), todas las ratas que recibieron ciclofosfamida sola o ciclofosfamida en combinación con el vehículo tuvieron alopecia intensa (+4). En cambio, todas las ratas que recibieron ciclofosfamida en combinación con calcitriol no mostraron signos de alopecia, de manera similar al grupo de control. Se obtuvieron resultados similares después de la segunda tanda de quimioterapia, tal como se muestra en la tabla 12-2 (véase también la figura 28).

Tabla 12-1. Extensión de la alopecia en ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX) después de la primera tanda de quimioterapia

GRUPO	ALOPECIA									
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/	Prob.	Grupos/	Prob.
1. Control (sin quimioterapia)	27					27	1 frente a 2	p <0,01	2 frente a 3	p = 1,000
2. CTX					40	40	1 frente a 3	p <0,01	2 frente a 4	p <0,01
3. CTX + vehículo					40	40	1 frente a 4	p = 1,000	3 frente a 4	p <0,01
4. CTX + calcitriol	40					40				

Tabla 12-2. Extensión de la alopecia en ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX) después de la segunda tanda de quimioterapia

GRUPO	ALOPECIA							
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/	Prob.
2. CTX sólo					8	8	2 frente a 3	p = 1,000
3. CTX + vehículo					9	9	2 frente a 4	p <0,01
4. CTX + calcitriol	10					10	3 frente a 4	p <0,01

Además, este experimento indicó que la tasa de supervivencia de las ratas que recibieron la formulación tópica de calcitriol fue sustancialmente similar a la de las ratas que recibieron quimioterapia sola o en combinación con el vehículo. Tal como se muestra en la tabla 12-3, la tasa de supervivencia de aquellos animales tratados con ciclofosfamida y la formulación tópica de calcitriol (25%) fue similar a la de las ratas tratadas con ciclofosfamida sola (20%) y las ratas tratadas con ciclofosfamida y vehículo (23%).

Tabla 12-3. Tasa de supervivencia de ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX) después de dos tandas de quimioterapia

GRUPO

	Curado	%	Total	Grupos/	Prob.	Grupos/	Prob.
1. Control (sin quimioterapia)	0	0	27				
2. CTX	8	20	40	1 frente a 2	p <0,01	2 frente a 3	p = 0,7846
3. CTX + vehículo	9	23	40	1 frente a 3	p <0,01	2 frente a 4	p = 0,5923
4. CTX + calcitriol	10	25	40	1 frente a 4	p <0,01	3 frente a 4	p = 0,7927
TOTAL	27	18	147				

En resumen, en el grupo de ciclofosfamida, el calcitriol ofreció una protección del 100% frente a la AIQ en ambos ciclos y no interfirió en la tasa de curación que estaba en el intervalo del 20-25%.

5 B. Ciclofosfamida y doxorubicina

Administración de quimioterapia

10 Ratas jóvenes: El día 13, todas las ratas recibieron ciclofosfamida (CTX) (Sigma Aldrich, lote #068k1131) 37,5 mg/kg por vía intraperitoneal usando una jeringa de insulina de ½ cc 29G ½" (B-D) en un volumen total de 0,1 ml de mezcla de H₂O/manitol. Los días 13, 14 y 15 las ratas recibieron clorhidrato de doxorubicina (Sigma Aldrich, lote #038k1349) (ADM) 2,5 mg/kg por vía i.p. en 0,1 ml de agua destilada.

15 Ratas adultas: Para el segundo ciclo de quimioterapia, ciclofosfamida 150 mg/kg a ratas anestesiadas (ketamina 50 mg/kg/ xilazina 5 mg/kg) por vía intraperitoneal usando una jeringa de insulina de ½ cc 29G ½" (B-D) en un volumen total de 0,1 ml de mezcla de H₂O/manitol en el día 47. Para el segundo ciclo de quimioterapia, las ratas recibieron ADM 20 mg/kg en los días 47 a 49 tal como se describió anteriormente.

20 Se observan los resultados en las tablas 12-4 y 12-5. Específicamente, después de la primera tanda de quimioterapia (tabla 12-4 y figura 29), todas las ratas que recibieron ciclofosfamida y doxorubicina solas o en combinación con el vehículo tuvieron alopecia intensa (+4). En cambio, todas las ratas que recibieron ciclofosfamida y doxorubicina en combinación con calcitriol no presentaron ningún signo de alopecia, de manera similar al grupo de control. Se obtuvieron resultados similares después de la segunda tanda de quimioterapia, tal como se muestra en la tabla 12-5 (véase también la figura 30).

25 Tabla 12-4. Extensión de la alopecia en ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX) y doxorubicina (ADM) después de la primera tanda de quimioterapia

GRUPO	ALOPECIA									
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/	Prob.	Grupos/	Prob.
1. Control (sin quimioterapia)	40					40	1 frente a 2	p <0,01	2 frente a 3	p = 1,000
2. CTX + ADM					40	40	1 frente a 3	p <0,01	2 frente a 4	p <0,01
3. CTX + ADM + vehículo				40		40	1 frente a 4	p = 1,000	3 frente a 4	p <0,01
4. CTX + ADM + calcitriol	40					40				

30 Tabla 12-5. Extensión de la alopecia en ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX) y doxorubicina (ADM) después de la segunda tanda de quimioterapia

GRUPO	ALOPECIA							
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/	Prob.
1. CTX + ADM					21	21	2 frente a 3	p = 1,000
2. CTX + ADM + vehículo					22	22	2 frente a 4	p <0,01
3. CTX + ADM + calcitriol	20					20	3 frente a 4	p <0,01

35 Además, este experimento indicó que la tasa de supervivencia de las ratas que recibieron la formulación tópica de calcitriol fue sustancialmente similar a la de las ratas que recibieron quimioterapia sola o en combinación con el vehículo. Tal como se muestra en la tabla 12-6, la tasa de supervivencia de aquellos animales tratados con ciclofosfamida y doxorubicina en combinación con la formulación tópica de calcitriol (50%) fue similar a la de las ratas tratadas sólo con quimioterapia (53%) y las ratas tratadas con quimioterapia y vehículo (55%).

40 Tabla 12-6. Tasa de supervivencia de ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX) y doxorubicina (ADM) después de dos

tandas de quimioterapia

GRUPO							
	Curado	%	Total	Grupos/	Prob.	Grupos/	Prob.
1. Control (sin quimioterapia)	0	0	40				
2. CTX + ADM	21	53	40	1 frente a 2	p <0,01	2 frente a 3	p = 0,8225
3. CTX + ADM + vehículo	22	55	40	1 frente a 3	p <0,01	2 frente a 4	p = 0,8230
4. CTX + ADM + calcitriol	20	50	40	1 frente a 4	p <0,01	3 frente a 4	p = 0,9336
TOTAL	63	39	160				

5 En resumen, en el grupo de ciclofosfamida y doxorubicina, el calcitriol ofreció una protección del 100% frente a la AIQ en ambos ciclos y no interfirió en la tasa de curación, que estaba en el intervalo del 50-55%.

C. Ciclofosfamida, doxorubicina y citarabina

Administración de quimioterapia

10 Ratas jóvenes: El día 13, todas las ratas recibieron ciclofosfamida (CTX) (Sigma Aldrich, lote #068k1131) 30 mg/kg por vía intraperitoneal usando una jeringa de insulina de ½ cc 29G ½” (B-D) en un volumen total de 0,1 ml de mezcla de H₂O/manitol. En los días 13, 14 y 15, las ratas recibieron clorhidrato de doxorubicina 2,0 mg/kg (Sigma Aldrich, lote #038k1349) (ADM) por vía intraperitoneal en 0,1 ml de agua destilada y en los días 13-19, la ras recibió citarabina 50 mg/kg.

15 Ratas adultas: Para el segundo ciclo de quimioterapia, se administró ciclofosfamida 100 mg/kg a ratas anestesiadas (ketamina 50 mg/kg/xilacina 5 mg/kg) durante un día, doxorubicina 20 mg/kg durante tres días y citarabina 100 mg/kg durante siete días.

20 Se observan los resultados en las tablas 12-7 y 12-8. Específicamente, después de la primera tanda de quimioterapia (tabla 12-7 y figura 31), todas las ratas que recibieron ciclofosfamida, doxorubicina y citarabina solas o ciclofosfamida, doxorubicina y citarabina en combinación con el vehículo tuvieron alopecia intensa (+4). En cambio, todas las ratas que recibieron ciclofosfamida, doxorubicina y citarabina en combinación con calcitriol no mostraron ningún signo de alopecia, de manera similar al grupo de control. Se obtuvieron resultados similares después de la segunda tanda de quimioterapia, tal como se muestra en la tabla 12-8 (véase la figura 32).

25 Tabla 12-7. Extensión de la alopecia en ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX), doxorubicina (ADM) y citarabina (ARA-C) después de la primera tanda de quimioterapia

GRUPO	ALOPECIA									
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/	Prob.	Grupos/	Prob.
1. Control (sin quimioterapia)	40					40	1 frente a 2	p <0,01	2 frente a 3	p = 1,000
2. CTX + ADM + ARA-C					40	40	1 frente a 3	p <0,01	2 frente a 4	p <0,01
3. CTX + ADM + ARA-C + vehículo					40	40	1 frente a 4	p = 1,000	3 frente a 4	p <0,01
4. CTX + ADM + ARA-C + calcitriol	40					40				

30 Tabla 12-8. Extensión de la alopecia en ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX), doxorubicina (ADM) y citarabina (ARA-C) después de la segunda tanda de quimioterapia

GRUPO	ALOPECIA								
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/	Prob.	
2. CTX + ADM + ARA-C						32	32	2 frente a 3	p = 1,0000
3. CTX + ADM + ARA-C+ vehículo						30	30	2 frente a 4	p <0,01
4. CTX + ADM + ARA-C+ calcitriol	31						31	3 frente a 4	p <0,01

35 Además, este experimento indicó que la tasa de supervivencia de las ratas que recibieron la formulación tópica de calcitriol fue sustancialmente similar a la de las ratas que recibieron quimioterapia sola o en combinación con el vehículo. Tal como se muestra en la tabla 12-9, la tasa de supervivencia de aquellos animales tratados con ciclofosfamida, doxorubicina y citarabina en combinación con la formulación tópica de calcitriol (78%) fue similar a la

de las ratas tratadas sólo con quimioterapia (80%) y las ratas tratadas con quimioterapia y vehículo (75%).

Tabla 12-9. Tasa de supervivencia de ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX), doxorubicina (ADM) y citarabina (ARA-C) después de dos tandas de quimioterapia

5

GRUPO						
	Curado	%	Total	Grupos/	Prob.	Grupos/ Prob.
1. Control (sin quimioterapia)	0	0	40			
2. CTX + ADM + ARA-C	32	80	40	1 frente a 2	p <0,01	2 frente a 3 p = 0,5923
3. CTX + ADM + ARA-C + vehículo	30	75	40	1 frente a 3	p <0,01	2 frente a 4 p = 0,5501
4. CTX + ADM + ARA-C + calcitriol	31	78	40	1 frente a 4	p <0,01	3 frente a 4 p = 0,7927
TOTAL	93	58	160			

En resumen, en el grupo de ciclofosfamida, doxorubicina y citarabina, el calcitriol ofreció una protección del 100% frente a la AIQ en ambos ciclos y no interfirió en la tasa de curación, que estaba en el intervalo del 75-80%.

10 D. Ciclofosfamida, paclitaxel y etopósido

Administración de quimioterapia

15 Ratas jóvenes: El día 13, todas las ratas recibieron ciclofosfamida (CTX) (Sigma Aldrich, lote #068k1131) 37,5 mg/kg por vía intraperitoneal usando una jeringa de insulina de ½ cc 29G ½" (B-D) en un volumen total de 0,1 ml de mezcla de H₂O/manitol. En los días 11 a 13, las ratas recibieron de manera concomitante paclitaxel 2,5 mg/kg (Taxol) en 0,1 ml de dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich, lote #078K1428) y etopósido 1,5 mg/kg (VP-16) (Sigma Aldrich, lote #047K1162) diluido en disolvente especial (véanse los Procedimientos normalizados de trabajo) y HBSS.

20 Ratas adultas: Para el segundo ciclo de quimioterapia, ciclofosfamida 150 mg/kg a ratas anestesiadas (ketamina 50 mg/kg/xilacina 5 mg/kg) por vía intraperitoneal usando una jeringa de insulina de ½ cc 29G ½" (BD) en un volumen total de 0,1 ml de mezcla de H₂O/manitol el día 47. Para el segundo ciclo de quimioterapia, las ratas recibieron Taxol 10 mg/kg y VP-16 15 mg/kg en los días 45 a 48 tal como se describió anteriormente.

25 Se observan los resultados en las tablas 12-10 y 12-11. Específicamente, después de la primera tanda de quimioterapia (tabla 12-10 y figura 33), todas las ratas que recibieron ciclofosfamida, paclitaxel y etopósido solos o ciclofosfamida, paclitaxel y etopósido en combinación con el vehículo tuvieron alopecia intensa (+4). En cambio, todas las ratas que recibieron ciclofosfamida, paclitaxel y etopósido en combinación con calcitriol no mostraron ningún signo de alopecia, de manera similar al grupo de control. Se obtuvieron resultados similares después de la segunda tanda de quimioterapia, tal como se muestra en la tabla 12-11 (véase también la figura 34).

30

Tabla 12-10. Extensión de la alopecia en ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX), paclitaxel y etopósido después de la primera tanda de quimioterapia

GRUPO	ALOPECIA								
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/	Prob.	Grupos/ Prob.
1. Control (sin quimioterapia)	40					40	1 frente a 2	p <0,01	2 frente a 3 p = 1,000
2. CTX + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO					40	40	1 frente a 3	p <0,01	2 frente a 4 p <0,01
3. CTX + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + vehículo					40	40	1 frente a 4	p = 1,000	3 frente a 4 p <0,01
4. CTX + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + CALCITRIOL	40					40			

35

Tabla 12-11. Extensión de la alopecia en ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX), paclitaxel y etopósido después de la segunda tanda de quimioterapia

GRUPO	ALOPECIA								
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/	Prob.	
2. CTX + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO						33	33	2 frente a 3	p = 1,0000
3. CTX + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + vehículo						31	31	2 frente a 4	p <0,01

GRUPO	ALOPECIA							
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/	Prob.
4. CTX + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + CALCITRIOL	33					33	3 frente a 4	p <0,01

Además, este experimento indicó que la tasa de supervivencia de las ratas que recibieron la formulación tópica de calcitriol fue sustancialmente similar a la de las ratas que recibieron quimioterapia sola o en combinación con el vehículo. Tal como se muestra en la tabla 12-12, la tasa de supervivencia de aquellos animales tratados con ciclofosfamida, paclitaxel y etopósido en combinación con la formulación tónica de calcitriol (83%) fue similar a la de las ratas tratadas con quimioterapia sola (83%) y las ratas tratadas con quimioterapia y vehículo (78%).

Tabla 12-12. Tasa de supervivencia de ratas tratadas con ciclofosfamida (CTX), paclitaxel y etopósido después de dos tandas de quimioterapia

GRUPO	Curado % Total			Grupos/	Prob.	Grupos/	Prob.
	0	1+	2+				
1. Control (sin quimioterapia)	0	0	40				
2. CTX + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO	33	83	40	1 frente a 2	p <0,01	2 frente a 3	p = 0,5762
3. CTX + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + vehículo	31	78	40	1 frente a 3	p <0,01	2 frente a 4	p = 1,000
4. CTX + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + CALCITRIOL	33	83	40	1 frente a 4	p <0,01	3 frente a 4	p = 0,5762

En resumen, en el grupo ciclofosfamida, paclitaxel y etopósido, el calcitriol ofreció una protección del 100% frente a la AIQ en ambos ciclos y no interfirió en la tasa de curación que estaba en el intervalo del 78-83%.

E. Doxorubicina, paclitaxel y etopósido

Administración de quimioterapia

Ratas jóvenes: Del día 13 al 15, todas las ratas recibieron clorhidrato de doxorubicina (Sigma Aldrich, lote #038k1349) (ADM) 2,5 mg/kg en 0,1 ml de agua destilada por vía intraperitoneal usando una jeringa de insulina de ½ cc 29G ½" (BD). De manera concomitante, las ratas recibieron paclitaxel 2,5 mg/kg (Taxol) (Sigma Aldrich, lote #078k1428) y etopósido 1,5 mg/kg (VP-16) (Sigma Aldrich, lote #047k1162).

Ratas adultas: Para el segundo ciclo de quimioterapia, se iniciaron las quimioterapias anteriores en el día 47 al 49 en ratas anestesiadas (ketamina 50 mg/kg/xilacina 5 mg/kg) por vía intraperitoneal usando una jeringa de insulina de ½ cc 29G ½" (BD) en un total volumen de 0,1 ml. Las dosificaciones para el segundo ciclo fueron las siguientes: ADM 20 mg/kg, Taxol 10 mg/kg y VP-16 15 mg/kg.

Se observan los resultados en las tablas 12-12 y 12-14. Específicamente, después de la primera tanda de quimioterapia (tabla 12-13 y figura 35), todas las ratas que recibieron doxorubicina, paclitaxel y etopósido solos o doxorubicina, paclitaxel y etopósido en combinación con el vehículo tuvieron alopecia intensa (+4). En cambio, todas las ratas que recibieron doxorubicina, paclitaxel y etopósido en combinación con calcitriol no presentaron ningún signo de alopecia, de manera similar al grupo de control. Se obtuvieron resultados similares después de la segunda tanda de quimioterapia, tal como se muestra en la tabla 12-14 (véase también la figura 36).

Tabla 12-13. Extensión de la alopecia en ratas tratadas con doxorubicina (ADM), paclitaxel y etopósido después de la primera tanda de quimioterapia

GRUPO	ALOPECIA							
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/	Prob.
1. Control (sin quimioterapia)	40					40	1 frente a 2	p <0,01
2. ADM + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO				40	40	40	1 frente a 3	p <0,01
3. ADM + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + vehículo				40	40	40	1 frente a 4	p = 1,000
4. ADM + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + calcitriol	40					40	3 frente a 4	p <0,01

Tabla 12-14. Extensión de la alopecia en ratas tratadas con doxorubicina (ADM), paclitaxel y etopósido después de la segunda tanda de quimioterapia

GRUPO	ALOPECIA						
	0	1+	2+	3+	4+	Total	Grupos/ Prob.
2. ADM + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO						32 32	2 frente a 3 p = 1,0000
3. ADM + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + vehículo						33 33	2 frente a 4 p <0,01
4. ADM + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + CALCITRIOL	32					32	3 frente a 4 p <0,01

5 Además, este experimento indicó que la tasa de supervivencia de las ratas que recibieron la formulación tópica de calcitriol fue sustancialmente similar a la de las ratas que recibieron quimioterapia sola o en combinación con el vehículo. Tal como se muestra en la tabla 12-15, la tasa de supervivencia de aquellos animales tratados con doxorubicina, paclitaxel y etopósido en combinación con la formulación tópica de calcitriol (80%) fue similar a la de las ratas tratadas con quimioterapia sola (80%) y las ratas tratadas con quimioterapia y vehículo (83%).

10 Tabla 12-15. Tasa de supervivencia de ratas tratadas con doxorubicina (ADM), paclitaxel y etopósido después de dos tandas de quimioterapia

GRUPO	Curado % Total			Grupos/ Prob.	Grupos/ Prob.
	0	%	Total		
1. Control (sin quimioterapia)	0	0	40		
2. ADM + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO	32	80	40	1 frente a 2 p <0,01	2 frente a 3 p = 0,7745
3. ADM + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + vehículo	33	83	40	1 frente a 3 p <0,01	2 frente a 4 p = 0,1000
4. ADM + PACLITAXEL + ETOPÓSIDO + calcitriol	32	80	40	1 frente a 4 p <0,01	3 frente a 4 p = 0,7745

15 En resumen, en el grupo de doxorubicina, paclitaxel y etopósido, el calcitriol ofreció una protección del 100% frente a la AIQ en ambos ciclos y no interfirió en la tasa de curación que estaba en el intervalo del 80-83%.

Ejemplo 13. Estudio de toxicidad dérmica de 4 semanas de calcitriol tópico en minicerdos Gottingen®

20 Preparación de control, vehículo y artículo de prueba: El artículo de control fresco, cloruro de sodio al 0,9% para inyección, USP, se dispensó para su uso en el estudio semanalmente y se almacenó refrigerado. Se usaron el vehículo, una mezcla 40/60 en peso (p/p) de propilenglicol, USP y etanol (sin desnaturalizar, anhidro) 200 Proof USP, y el artículo de prueba, que contenía calcitriol, USP, con un peso específico de 0,875 tal como se recibió y no se realizó ningún ajuste para la pureza. El artículo de prueba se recibió a concentraciones de 5,07, 10,31 y 55,34 µg/ml. El artículo de prueba se administró puro (sin diluir). El vehículo y el artículo de prueba se dispensaron para su uso en el estudio semanalmente y se almacenaron refrigerados. En ocasiones, se distribuyó material de prueba adicional según fuese necesario durante el transcurso del estudio.

30 Administración: Antes de la administración, se recortó el pelo del lomo del animal. Los animales de control tenían dos sitios de prueba; se trató el sitio 1 con el vehículo y el sitio 2 con solución salina. Cada sitio medía 450 cm², dividido bilateralmente por la columna vertebral, y marcado en las esquinas con marcador indeleble. Los dos sitios de prueba para el grupo de control se dividieron equitativamente. Se hizo un recorte repetido del pelo según fue necesario. Se tuvo cuidado para evitar producir abrasión de la piel. El artículo de control, el vehículo y el artículo de prueba se administraron dos veces al día con separadas aproximadamente 6 horas durante 4 semanas (29 días consecutivos) durante el estudio por vía dérmica. Se aplicó la formulación uniformemente sobre el sitio de aplicación con una varilla de agitación de vidrio o un instrumento apropiado. Se retiró con delicadeza cualquier cantidad de material de prueba residual antes de la siguiente dosis con un paño Wypall, humedecido con agua del grifo. Si fue necesario, se secaron los sitios con un paño Wypall limpio y seco. La dosis administrada a todos los animales fue de 1800 mg de la formulación apropiada. Las concentraciones de dosis fueron de 5,07, 10,31 y 55,34 µg/ml y se administraron a un volumen de dosis de 2,1 ml. El artículo de control y el vehículo se administraron al grupo de control de la misma manera que a los grupos tratados. El volumen de dosificación para los animales de control fue de 1,0 ml del vehículo y 0,9 ml de solución salina. Debido a la intensidad de los signos clínicos observados, no se dosificó a todos los animales 55,34 µg/ml el día 23. La dosificación se reanudó para todos los animales el día 24.

45 Resultados: Este estudio se realizó para evaluar la posible toxicidad tras un tratamiento breve con dosis múltiples de una disolución tópica de calcitriol, cuando se administra dos veces al día mediante aplicación dérmica durante 4 semanas. A tres grupos de tratamiento de cuatro animales/sexo/grupo de minicerdo Gottingen® se les administró la

disolución tópica de calcitriol a concentraciones de dosis respectivas de 5,07, 10,31 y 55,34 $\mu\text{g/ml}$. Un grupo adicional de cuatro animales/sexo sirvió como control y recibió el vehículo, una mezcla 40/60 en peso (p/p) de propilenglicol, USP y etanol (sin desnaturalizar, anhidro) 200 Proof USP, y el artículo de control, cloruro de sodio al 0,9% para inyección, USP. El vehículo o la disolución tópica de calcitriol se administró a todos los grupos mediante aplicación dérmica, dos veces al día durante 29 días consecutivos, a un volumen de dosis de 4 mg/cm^2 sobre un sitio de prueba de 450 cm^2 .

Se realizaron observaciones de morbimortalidad, lesiones y la disponibilidad de alimentos y agua dos veces al día para todos los animales. Se realizaron observaciones clínicas semanalmente. Se midieron los pesos corporales y registraron semanalmente. Se obtuvo la puntuación de irritación dérmica después de cada dosis durante la semana 1 y luego dos veces a la semana (después de la segunda dosis) durante las semanas 2 a 4 para detectar cambios en el sitio de aplicación. Se realizaron exámenes oftalmoscópicos antes de la prueba y a todos los sobrevivientes antes de la necropsia terminal. Se realizaron exploraciones físicas antes de la prueba. Se realizaron exámenes electrocardiográficos antes de la prueba, antes de la dosis y de 1 a 2 horas después de la primera dosis el día 1 y durante la última semana de dosificación. Se recogieron muestras de sangre y orina para evaluaciones de análisis clínicos de todos los animales antes de la prueba y antes de la necropsia terminal. Se extrajeron muestras de sangre para la determinación de las concentraciones plasmáticas del artículo de prueba de todos los animales supervivientes en los puntos de tiempo designados en los días 1 y 27. Se determinaron los parámetros toxicocinéticos (TK) para el artículo de prueba a partir de los datos de concentración-tiempo en las especies de prueba. Al terminarse el estudio, se realizaron exámenes de necropsia, se registraron los pesos de los órganos y se examinaron microscópicamente tejidos seleccionados.

Se sacrificó un macho a la concentración de 55,34 $\mu\text{g/ml}$ *in extremis* el día 28 del estudio. Este animal se observó con actividad disminuida, inapetencia y temblores antes del sacrificio. Se consideró que la causa de la morbilidad de este animal eran los altos niveles de calcio en sangre que estaban cerca del nivel letal. Todos los minicerdos restantes sobrevivieron a su terminación programada el día 30 del estudio. Se observó una disminución de la actividad, inapetencia, vómitos y temblores en la mayoría de los minicerdos a la concentración de 55,34 $\mu\text{g/ml}$ durante las semanas 3 y 4 del estudio. Se observó irritación leve en machos y hembras a la concentración de 55,34 $\mu\text{g/ml}$ durante la última semana o dos del estudio. El peso corporal medio y los aumentos de peso corporal para los machos y hembras tratados a 5,07 y 10,31 $\mu\text{g/ml}$ fueron comparables a los controles. Todos los machos y hembras a la concentración de 55,34 $\mu\text{g/ml}$ perdieron una cantidad significativa de peso corporal durante las últimas 2 semanas del estudio y el peso corporal medio fue significativamente menor en machos y hembras durante este periodo de tiempo.

No se observaron anomalías oftalmoscópicas en ninguno de los animales en los exámenes oftalmoscópicos antes de la prueba y terminales. La disolución tópica de calcitriol no provocó anomalías cualitativas en el electrocardiograma, pero hubo un leve aumento de la frecuencia cardíaca media grupal en los intervalos antes de la dosis y tras la dosis terminales. Este aumento de la frecuencia cardíaca está relacionado indudablemente con el aumento marcado de los niveles de calcio en estos minicerdos durante el estudio. No hubo otros efectos relacionados con la dosis de la disolución tópica de calcitriol sobre parámetros cuantitativos del electrocardiograma. No se observaron alteraciones en la hematología, coagulación o análisis de orina relacionadas con la disolución tópica de calcitriol en machos o hembras en la evaluación terminal. Se observaron algunas alteraciones en la bioquímica clínica a la concentración de 55,34 $\mu\text{g/ml}$, la más notable fue los altos niveles de calcio observados que estaban cerca del nivel letal. Los otros cambios observados fueron menores valores de cloruro y mayores valores de colesterol, glucosa, nitrógeno ureico y triglicéridos.

Los hallazgos patológicos macroscópicos relacionados con la disolución tópica de calcitriol se limitaron a la mucosa estomacal de una hembra a una concentración de 55,34 $\mu\text{g/ml}$ que consistía en una leve superficie irregular. Se observó un aumento absoluto y relativo del peso del riñón y una disminución del peso del timo en ambos sexos a la concentración de 55,34 $\mu\text{g/ml}$ en comparación con los controles. Estuvieron presentes hallazgos microscópicos directos relacionados con la disolución tópica de calcitriol en huesos, riñones, corazón, piel tratada, timo y tiroides. Además, los hallazgos directos relacionados con la disolución tópica de calcitriol incluyeron cambios vasculares multicéntricos y mineralización mucosa multicéntrica. Se observaron hallazgos microscópicos indirectos relacionados con el artículo de prueba en el páncreas. Estos cambios microscópicos estuvieron presentes en ambos sexos y se limitaron a los animales a los que se les dosificó la concentración de 55,34 $\mu\text{g/ml}$.

Los cambios microscópicos de los huesos femoral, esternal y costal se limitaron al hueso cortical diafisario y a la cavidad ósea. Se caracterizaron por osteodistrofia y por la deposición de matriz basófila. Las observaciones microscópicas renales se caracterizaron por mineralización, degeneración/regeneración tubular y por una inflamación subaguda. Las observaciones microscópicas del miocardio fueron mineralización de miofibras, inflamación subaguda y cambios vasculares. Además, un macho y una hembra tenían mineralización endocárdica. Se observó mineralización multicéntrica de mucosa/epitelio en orden decreciente dentro de la mucosa del estómago, pulmones, laringe, tráquea, próstata, glándula mandibular salival y dentro de la vejiga urinaria. Los cambios vasculares relacionados con la disolución tópica de calcitriol fueron generalizados y afectaron principalmente a vasos sanguíneos de tamaño pequeño a medio. Se observaron principalmente dentro del corazón y la cavidad ósea

y esporádicamente en diferentes órganos/sistemas. Los cambios microscópicos de la piel tratada se caracterizaron por hiperqueratosis e hiperplasia epidérmica e inflamación perivascular de células mixtas con la dermis superficial. Los cambios microscópicos del timo, la tiroides y el páncreas se caracterizaron por reducción linfoide, hiperplasia e hipertrofia de células foliculares y necrosis unicelular, respectivamente.

5 Basándose en los resultados de este estudio, se consideró que el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) era de 10,31 µg/ml según la bioquímica clínica y los cambios microscópicos observados en la concentración de 55,34 µg/ml.

10 **Bibliografía**

Diker-Cohen T, Koren R, Liberman UA, Ravid A Vitamin D protects keratinocytes from apoptosis induced by osmotic shock, oxidative stress, and tumor necrosis factor." *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Dec;1010:350-3. (ClinicalTrials.gov, Mosby's Drug Consult, 13ª edición).

15 Genever PG, Maxfield, SJ, Kennovin GD, Maltman J, Bowgen CH, Raxworthy MJ, Skerry TM. Evidence for a novel glutamate-mediated signaling pathway in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* Marzo de 1999; 112 (3): 337-42.

20 Kiryu-Seo S, Gamo K, Tachibana T, Tanaka K, Kiyama H. Unique anti apoptotic activity of EAAC1 in injured motor neurons. *The EMBO Journal* (2006) 25, 3411-3421.

Nollen EA, Brunsing JF, Roelofsen H, Weber La, Kampinga HH. In vivo chaperon activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2069-79.

25 Rocchi P, Jugpal P, SoA, Sinneman S, Ettinger S, Fazli L, Nelson C, Gleave M. Small interference RNA targeting heat shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase 3 activation in vitro *BJU Int* 2006.

30 Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (4): 1111-22.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para administración tópica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de vitamina D para su uso en un método para prevenir o tratar la alopecia inducida por quimioterapia en un individuo, comprendiendo el método administrar de manera tópica al individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de vitamina D,

en la que

la composición comprende además propilenglicol y etanol absoluto anhidro, en la que el propilenglicol y el etanol anhidro están presentes respectivamente en cantidades de

el 35% (p/p) y el 65% (p/p) o

el 36% (p/p) y el 64% (p/p) o

el 37% (p/p) y el 63% (p/p) o

el 38% (p/p) y el 62% (p/p) o

el 39% (p/p) y el 61% (p/p) o

el 40% (p/p) y el 60% (p/p) o

el 41% (p/p) y el 59% (p/p) o

el 42% (p/p) y el 58% (p/p) o

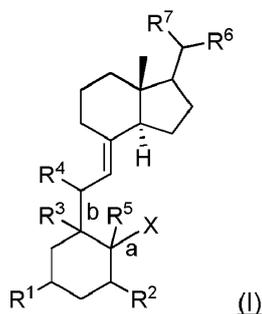
el 43% (p/p) y el 57% (p/p) o

el 44% (p/p) y el 56% (p/p) o

el 45% (p/p) y el 55% (p/p);

en la que dicho compuesto de vitamina D está formulado para administrarse a la epidermis mientras se evita sustancialmente la administración a la dermis, lo que significa una administración a y/o acumulación en la dermis de menos del 25% del compuesto de vitamina D en comparación con la administración a y/o acumulación del compuesto de vitamina D en la epidermis;

y en la que el compuesto de vitamina D está representado por la fórmula (I):



en la que

a y b son cada uno independientemente un enlace sencillo o doble;

X es -CH₂ cuando a es un enlace doble, o X es hidrógeno o un alquilo sustituido con hidroxilo cuando a es un enlace sencillo;

R¹ es hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo, tri-alquil-sililo o alquilo, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';

R² es hidrógeno, hidroxilo, -O-trialquilsililo o alquilo, alcoxilo o alquenoilo, opcionalmente sustituido con de

uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';

R³ está ausente cuando b es un doble enlace o R³ es hidrógeno, hidroxilo o alquilo, o R³ y R¹ pueden unirse junto con los átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo carbocíclico de 5-7 miembros cuando b es un enlace sencillo;

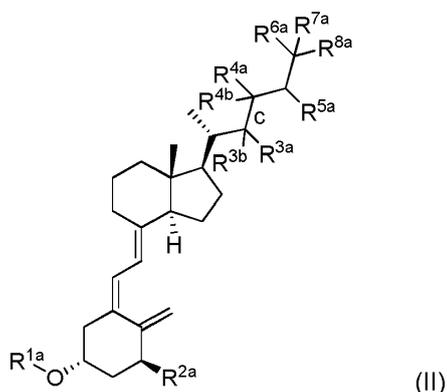
R⁴ está ausente cuando b es un enlace doble o hidrógeno, halógeno o hidroxilo cuando b es un enlace sencillo;

R⁵ está ausente cuando a es un doble enlace o R⁵ es hidrógeno, halógeno o hidroxilo cuando a es un enlace sencillo;

R⁶ es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocíclico, alquil-O-alquilo, alquil-CO₂-alquilo opcionalmente sustituido con de uno a cinco, restos hidroxilo, oxo, halógeno, alcoxilo, arilo, heteroarilo, ciano, nitro o -NR'R'';

R⁷ es alquilo opcionalmente sustituido con de uno a tres restos hidroxilo, halógeno, alcoxilo, arilo, heteroarilo, ciano, nitro o -NR'R'', y

R' y R'' son cada uno, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alquilo o alcoxilo, y sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que el compuesto de vitamina D está preferiblemente representado por la fórmula (II):



en la que

c es un enlace sencillo o doble;

R^{1a} es hidrógeno o alquilo, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';

R^{2a} es hidrógeno, hidroxilo, -O-trialquilsililo o alquilo, alcoxilo o alquenilo, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';

R^{3a} y R^{4a} están ausentes cuando c es un doble enlace, o son cada uno independientemente hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxilo o alquilo opcionalmente sustituido con de uno a tres restos hidroxilo o halógeno cuando c es un enlace sencillo; y

R^{3b}, R^{4b}, R^{5a}, R^{6a}, R^{7a} y R^{8a} son cada uno, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxilo o alquilo opcionalmente sustituido con de uno a tres restos hidroxilo o halógeno, o dos cualesquiera de R^{6a}, R^{7a} y R^{8a} pueden unirse para formar un anillo carbocíclico de 3-7 miembros y sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica comprende el 40% (p/p) de propilenglicol y el 60% (p/p) de etanol absoluto anhidro (200 Proof, EE.UU.).

3. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto de vitamina D presenta una característica seleccionada de las siguientes:

(i) el compuesto de vitamina D presenta un perfil de regulación génica similar o idéntico como una cantidad equivalente de calcitriol en queratinocitos normales;

(ii) el compuesto de vitamina D fomenta la expresión de uno o más genes cuyos niveles de expresión se fomentan por una cantidad equivalente de calcitriol;

5 (iii) el compuesto de vitamina D inhibe la expresión de uno o más genes cuyos niveles de expresión se inhiben por una cantidad equivalente de calcitriol;

(iv) el compuesto de vitamina D modula la expresión de ARNm de HSPA2 o HSF4, ARNm de HSPB1 o DNAJC6 en queratinocitos normales;

10 (v) el compuesto de vitamina D modula la expresión de SLC1A1, KCNB2, proteína oKCNN4 o proteína SLC1A3 en queratinocitos normales;

15 (vi) el compuesto de vitamina D induce la sobreexpresión en queratinocitos normales de uno o más de: GST, queratina 1, queratina 17, galectina 1, S100 A9 (calprotectina) o S100 A13.

4. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el individuo es un primate, preferiblemente un humano.

20 5. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la alopecia no ha comenzado en el individuo.

6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el individuo se somete o está a punto de someterse a quimioterapia.

25 7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que la composición farmacéutica se caracteriza además por una función seleccionada de las siguientes:

30 (1) la composición farmacéutica se administra al individuo antes de la quimioterapia o de manera concurrente con la quimioterapia;

(2) la composición farmacéutica se administra al individuo después del comienzo de la quimioterapia, pero antes del comienzo de la alopecia;

35 (3) la composición farmacéutica no reduce sustancialmente la eficacia de la quimioterapia;

(4) la quimioterapia es quimioterapia sistémica; y

40 (5) la quimioterapia incluye uno o más de: antraciclinas (adriamicina/doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina), 5-FU, tamoxifeno, irinotecán, paclitaxel (Taxol), carboplatino, etopósido, Cytoxan/ciclofosfamida, cisplatino, erlotinib (Tarceva), gemcitabina, estaurosporina, vincristina, imatinib (Gleevec), gefitinib (Iressa), sorafenib, dasatinib, dactinomomicina, hexametamelamina (HMM, altretamina), ifosfamida, bleomicina, metotrexato, docetaxel (Taxotere), vindesina, vinorebina, topotecán, amsacrina, citarabina, busulfano, melfalán, vinblastina, lomustina (CCNU), tiotepa, gemcitabina, carmustina (BCNU), mitroxantrona, mitomicina C, procarbazona, 6-mercaptopurina, estreptozotocina, fludarabina, raltitrexato (Tomudex), capecitabina, y equivalentes de los mismos.

50 8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el compuesto de vitamina D se administra de manera tópica al individuo a un volumen de dosificación equivalente a aproximadamente 0,1 µg de calcitriol/cm².

9. Composición farmacéutica para administración tópica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de vitamina D para prevenir o tratar la alopecia inducida por quimioterapia,

55 en la que

la composición comprende además propilenglicol y etanol absoluto anhidro, en la que el propilenglicol y el etanol absoluto anhidro están presentes respectivamente en cantidades de

60 el 35% (p/p) y el 65% (p/p) o

el 36% (p/p) y el 64% (p/p) o

el 37% (p/p) y el 63% (p/p) o

65 el 38% (p/p) y el 62% (p/p) o

el 39% (p/p) y el 61% (p/p) o

el 40% (p/p) y el 60% (p/p) o

5 el 41% (p/p) y el 59% (p/p) o

el 42% (p/p) y el 58% (p/p) o

10 el 43% (p/p) y el 57% (p/p) o

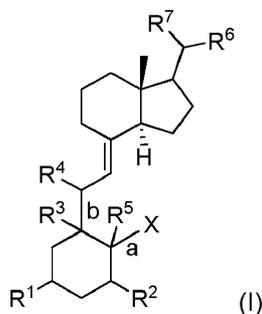
el 44% (p/p) y el 56% (p/p) o

el 45% (p/p) y el 55% (p/p);

15 y

en la que dicha cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de vitamina D, cuando se administra conjuntamente con un agente quimioterápico, no interfiere sustancialmente en la eficacia del agente quimioterápico, y en la que el compuesto de vitamina D está representado por la fórmula (I):

20



en la que

25 a y b son cada uno independientemente un enlace sencillo o doble;

X es -CH₂ cuando a es un enlace doble, o X es hidrógeno o un alquilo sustituido con hidroxilo cuando a es un enlace sencillo;

30 R¹ es hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo, tri-alquilsililo o alquilo, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';

35 R² es hidrógeno, hidroxilo, -O-trialquilsililo o alquilo, alcoxilo o alquenoilo, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';

R³ está ausente cuando b es un doble enlace o R³ es hidrógeno, hidroxilo o alquilo, o R³ y R¹ pueden unirse junto con los átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo carbocíclico de 5-7 miembros cuando b es un enlace sencillo;

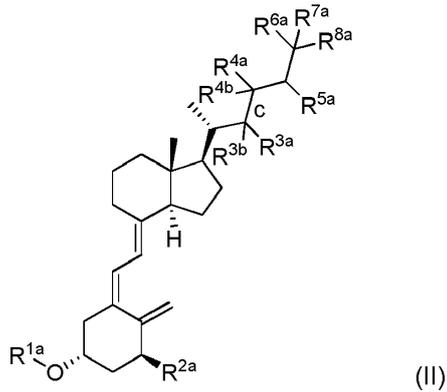
40 R⁴ está ausente cuando b es un enlace doble o hidrógeno, halógeno o hidroxilo cuando b es un enlace sencillo;

45 R⁵ está ausente cuando a es un doble enlace o R⁵ es hidrógeno, halógeno o hidroxilo cuando a es un enlace sencillo;

R⁶ es alquilo, alquenoilo, alquinoilo, cicloalquilo, heterocíclico, alquil-O-alquilo, alquil-CO₂-alquilo opcionalmente sustituido con de uno a cinco, restos hidroxilo, oxo, halógeno, alcoxilo, arilo, heteroarilo, ciano, nitro o -NR'R'';

50 R⁷ es alquilo opcionalmente sustituido con de uno a tres restos hidroxilo, halógeno, alcoxilo, arilo, heteroarilo, ciano, nitro o -NR'R''; y

55 R' y R'' son cada uno, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alquilo o alcoxilo, y sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que el compuesto de vitamina D está preferiblemente representado por la fórmula (II):



en la que

5

c es un enlace sencillo o doble;

R^{1a} es hidrógeno o alquilo, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';

10

R^{2a} es hidrógeno, hidroxilo, -O-trialquilsililo o alquilo, alcoxilo o alquenilo, opcionalmente sustituido con de uno a tres restos halógeno, hidroxilo, ciano o -NR'R'';

15

R^{3a} y R^{4a} están ausentes cuando c es un doble enlace, o son cada uno independientemente hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxilo o alquilo opcionalmente sustituido con de uno a tres restos hidroxilo o halógeno cuando c es un enlace sencillo; y

20

R^{3b}, R^{4b}, R^{5a}, R^{6a}, R^{7a} y R^{8a} son cada uno, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxilo o alquilo opcionalmente sustituido con de uno a tres restos hidroxilo o halógeno, o dos cualesquiera de R^{6a}, R^{7a} y R^{8a} pueden unirse para formar un anillo carbocíclico de 3-7 miembros y sus sales farmacéuticamente aceptables.

10.

Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el compuesto de vitamina D es 1,25-dihidroxitamina D3; 1,25-dihidroxi-16-en-23-in-colecalciferol; 1 α -hidroxivitamina D3; 1 α ,24-dihroxivitamina D3 o MC 903.

25

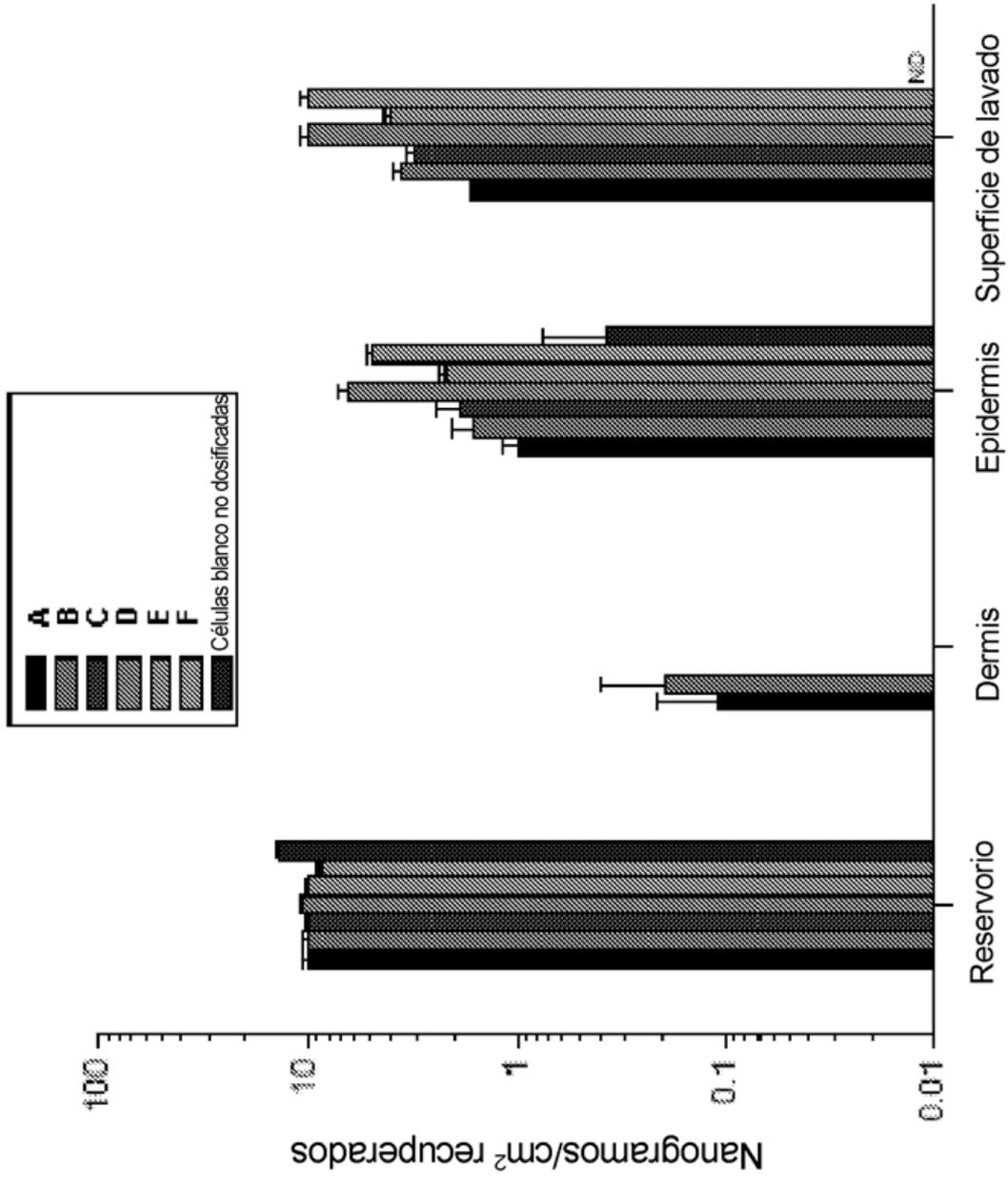
11.

Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en la que el compuesto de vitamina D es 1,25-dihidroxitamina D3.

30

12.

Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el compuesto de vitamina D está en una concentración de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 ó 400 μ g/ml.



Fuente de muestras

Figura 1

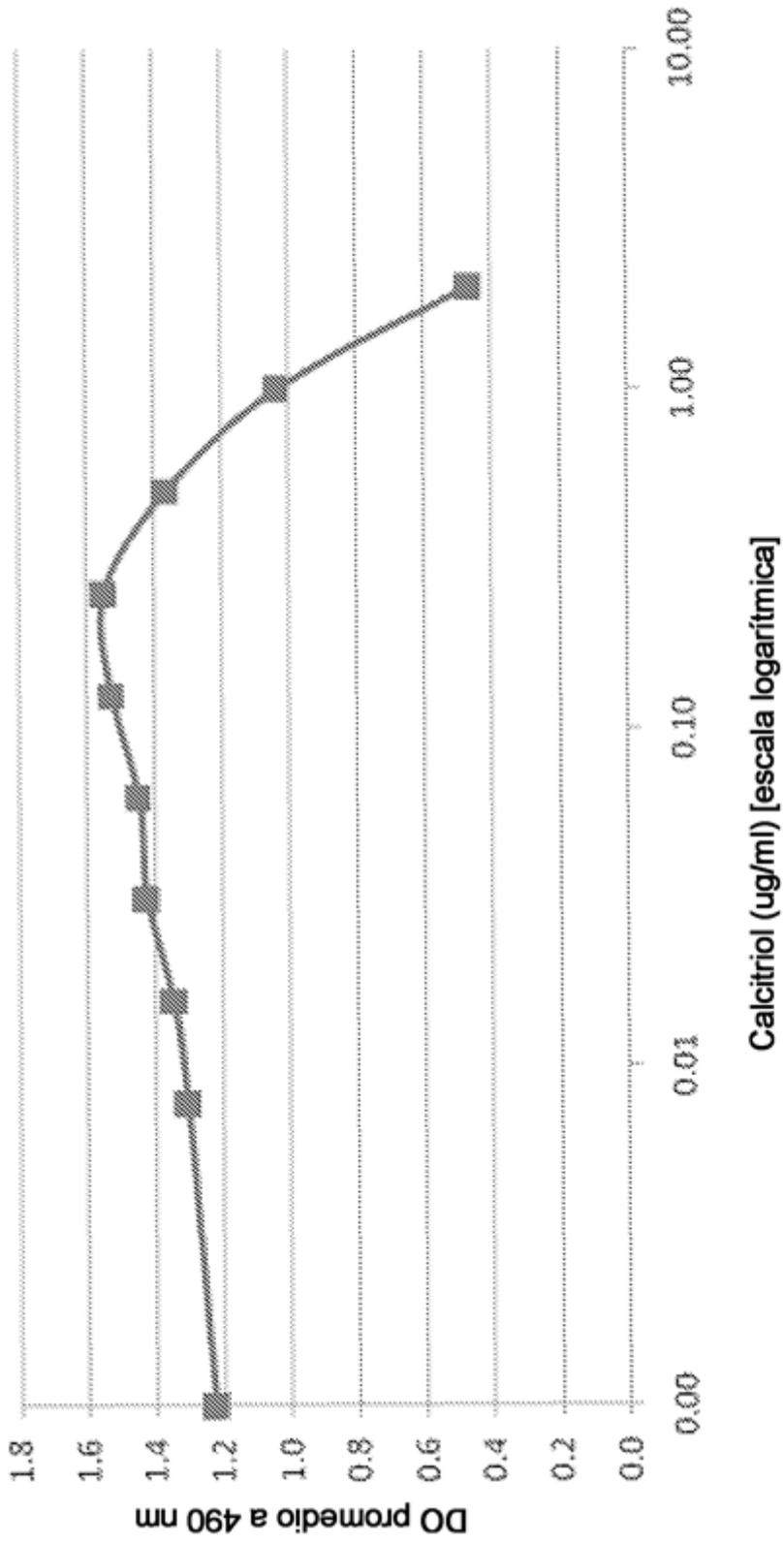


Figura 2

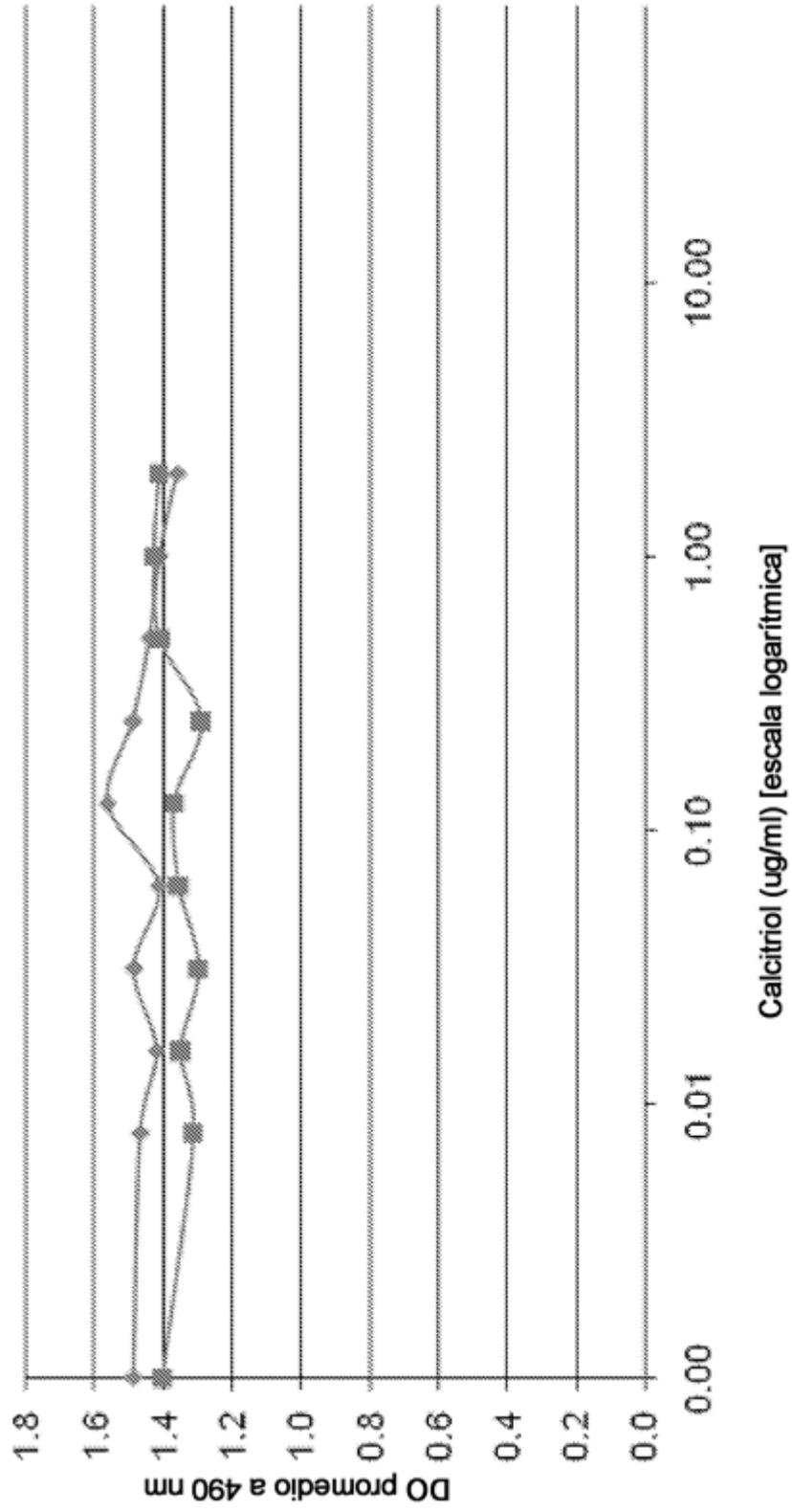
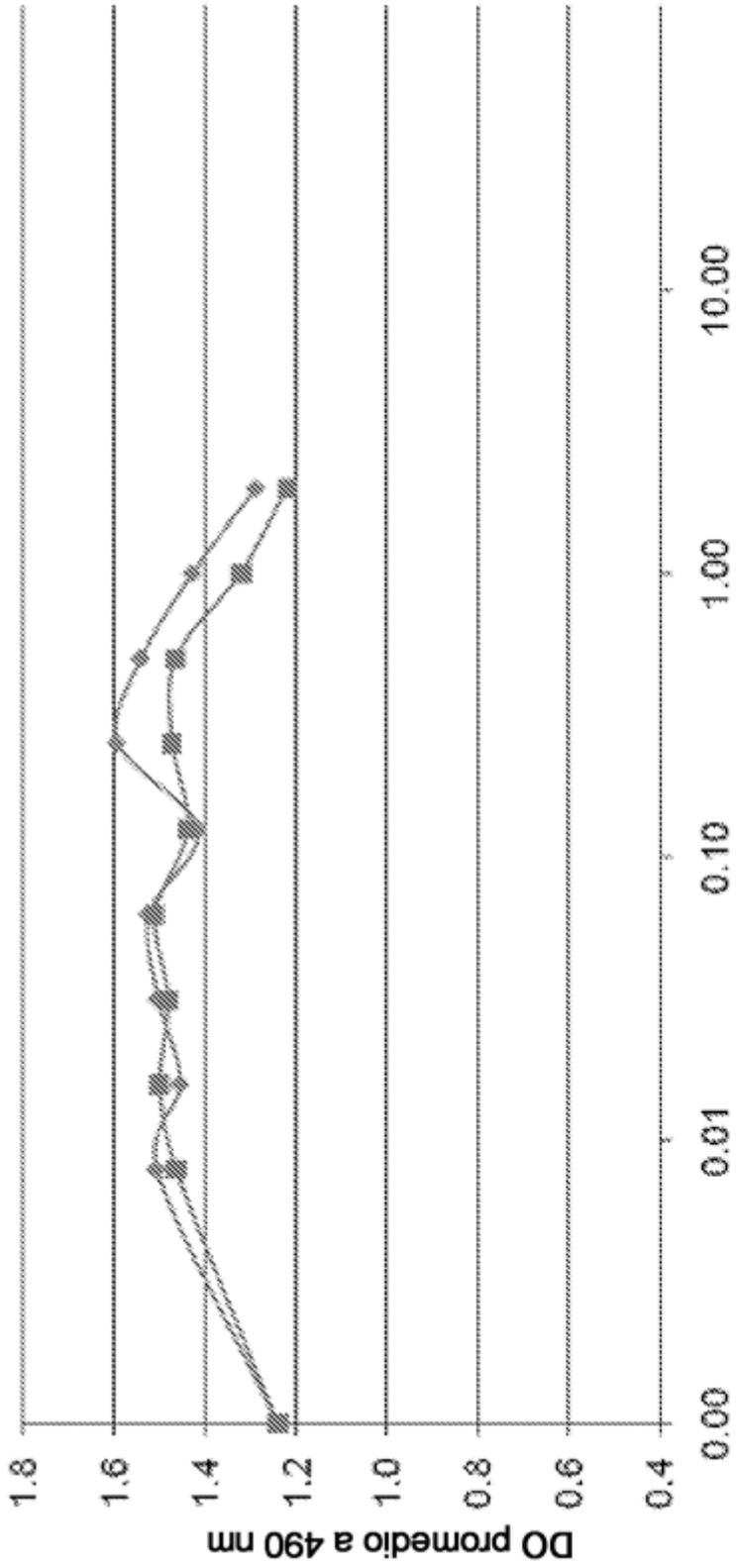


Figura 3



FÁrmaco calcitriol (ug/ml) [escala logarítmica]

Figura 4A

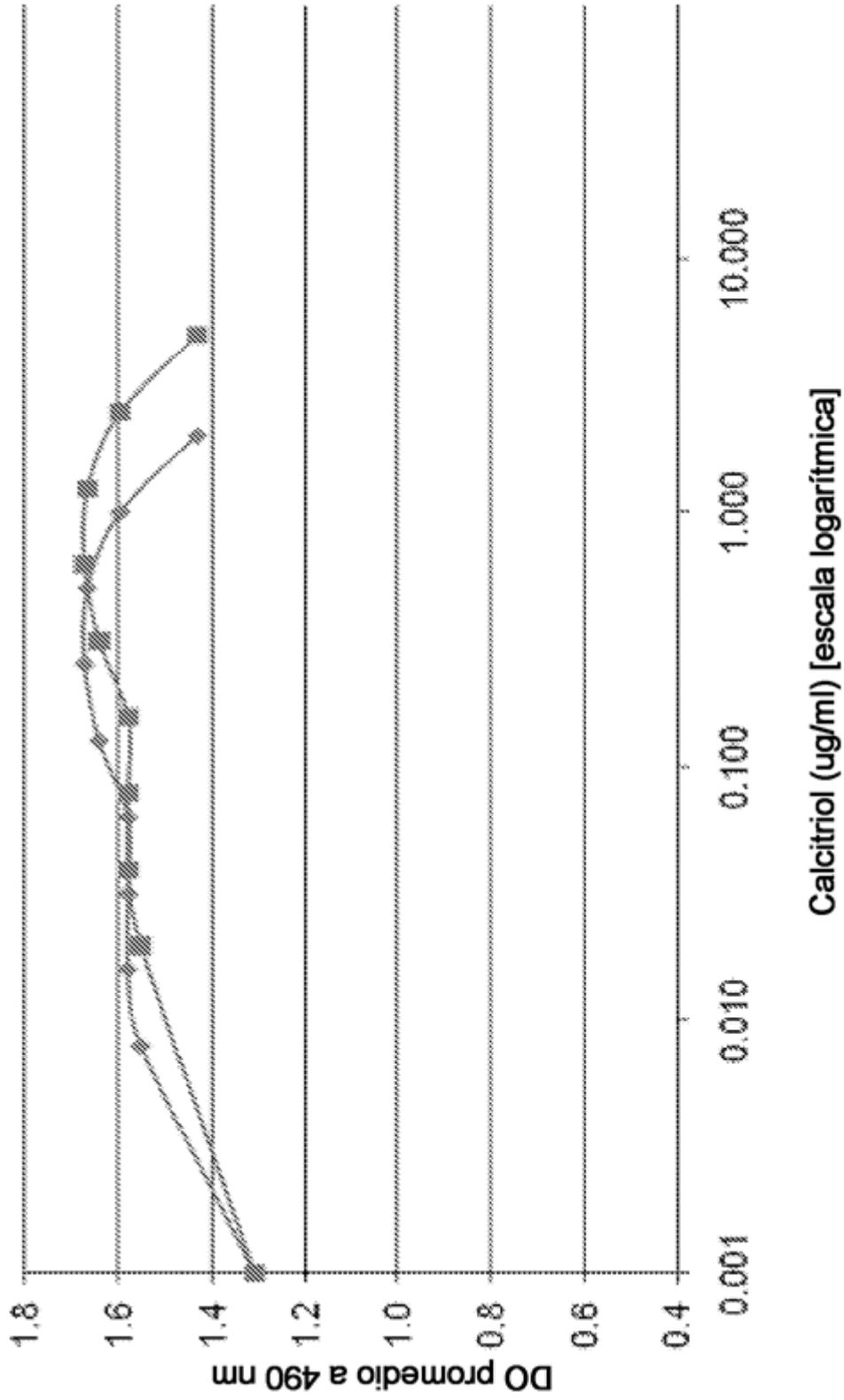


Figura 4B

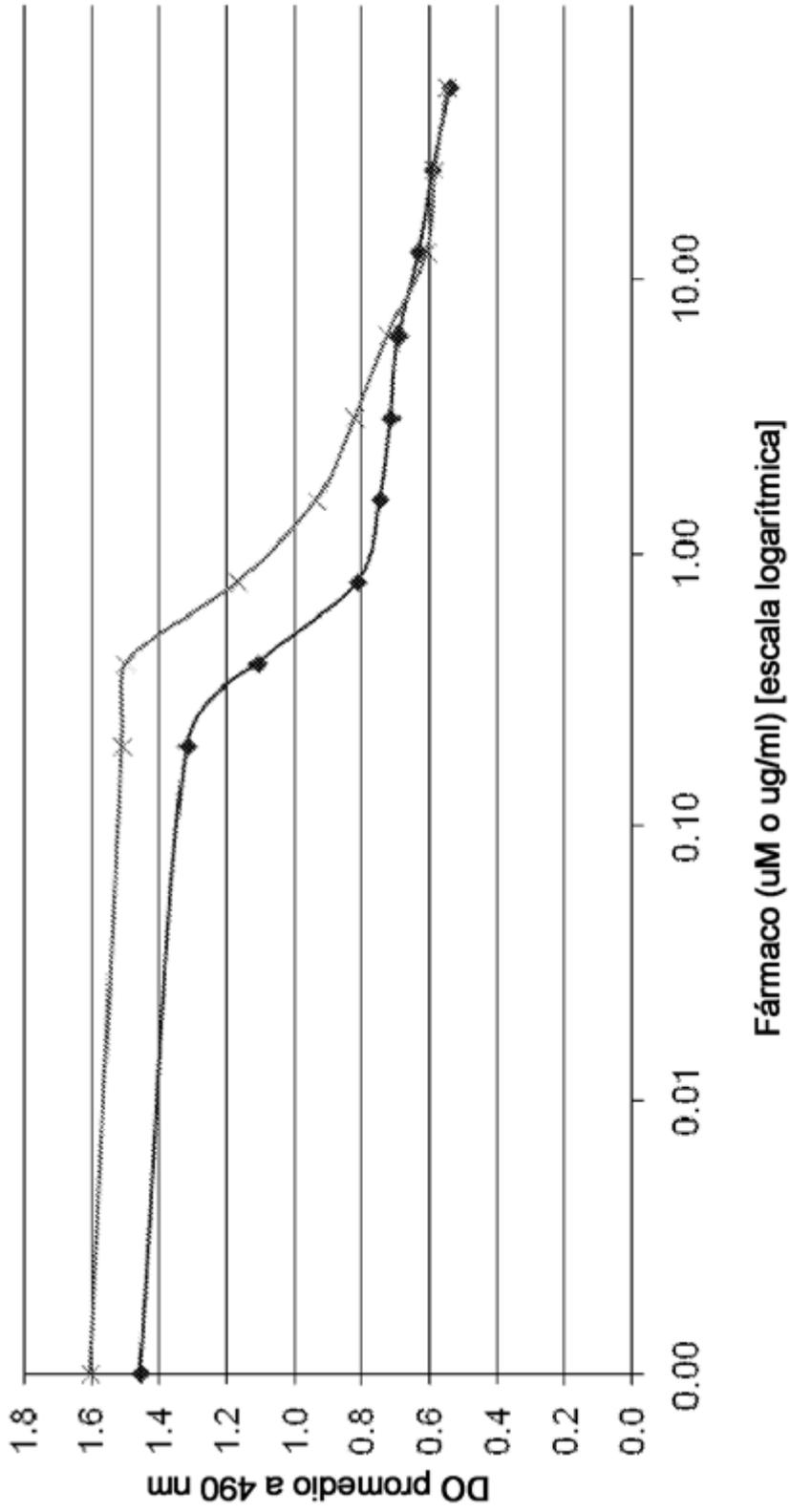


Figura 5

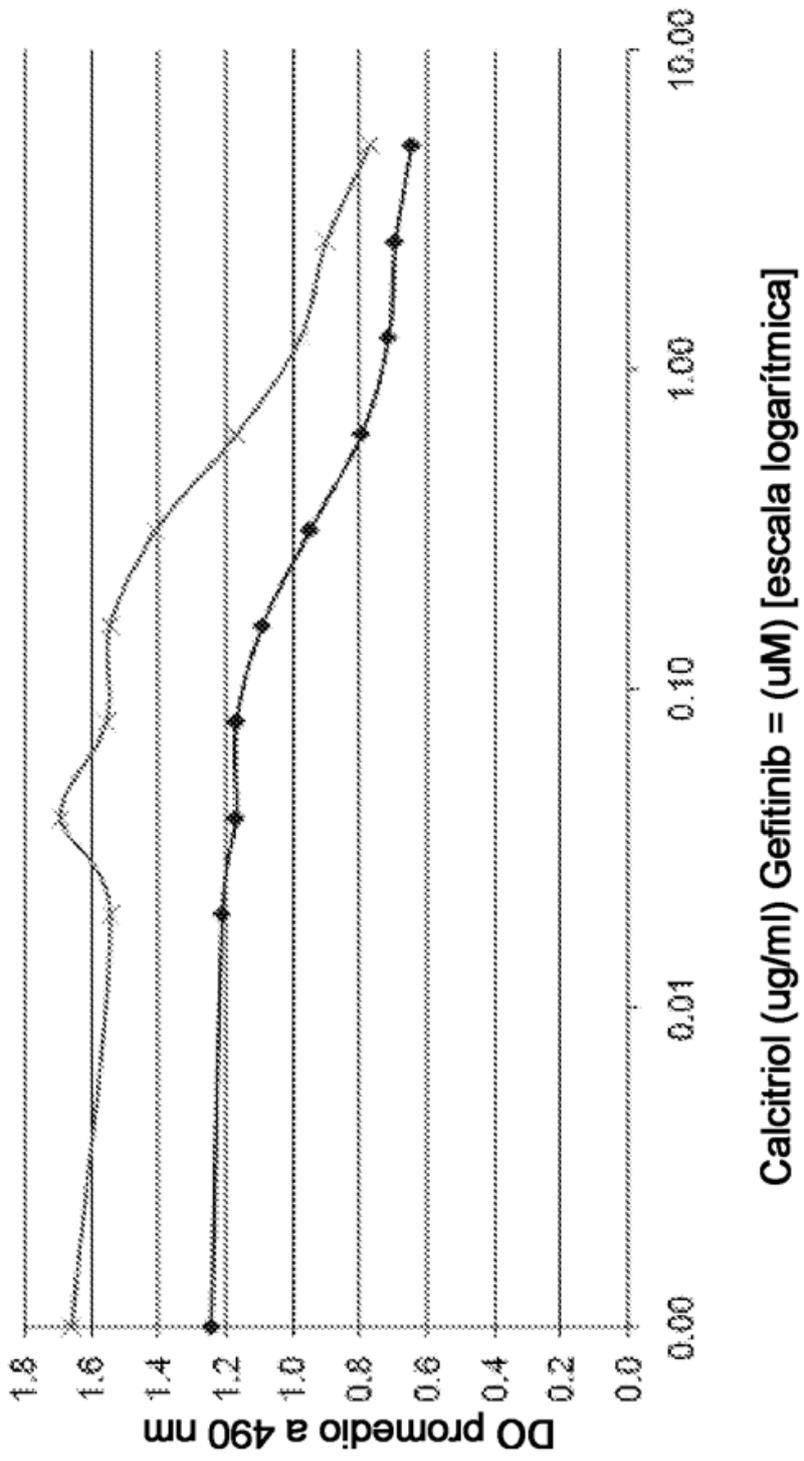
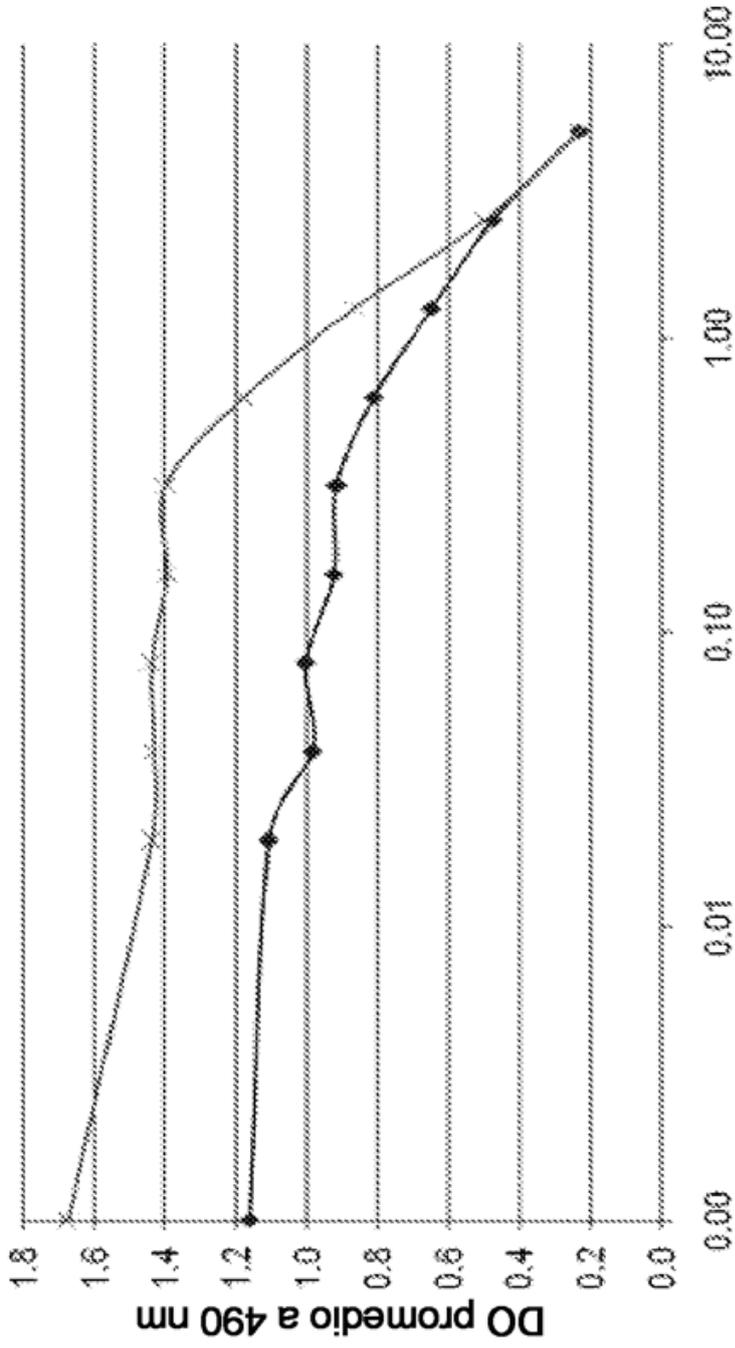


Figura 6



Calcitriol = ($\mu\text{g/ml}$) Sorafinib = (μM) [escala logarítmica]

Figura 7

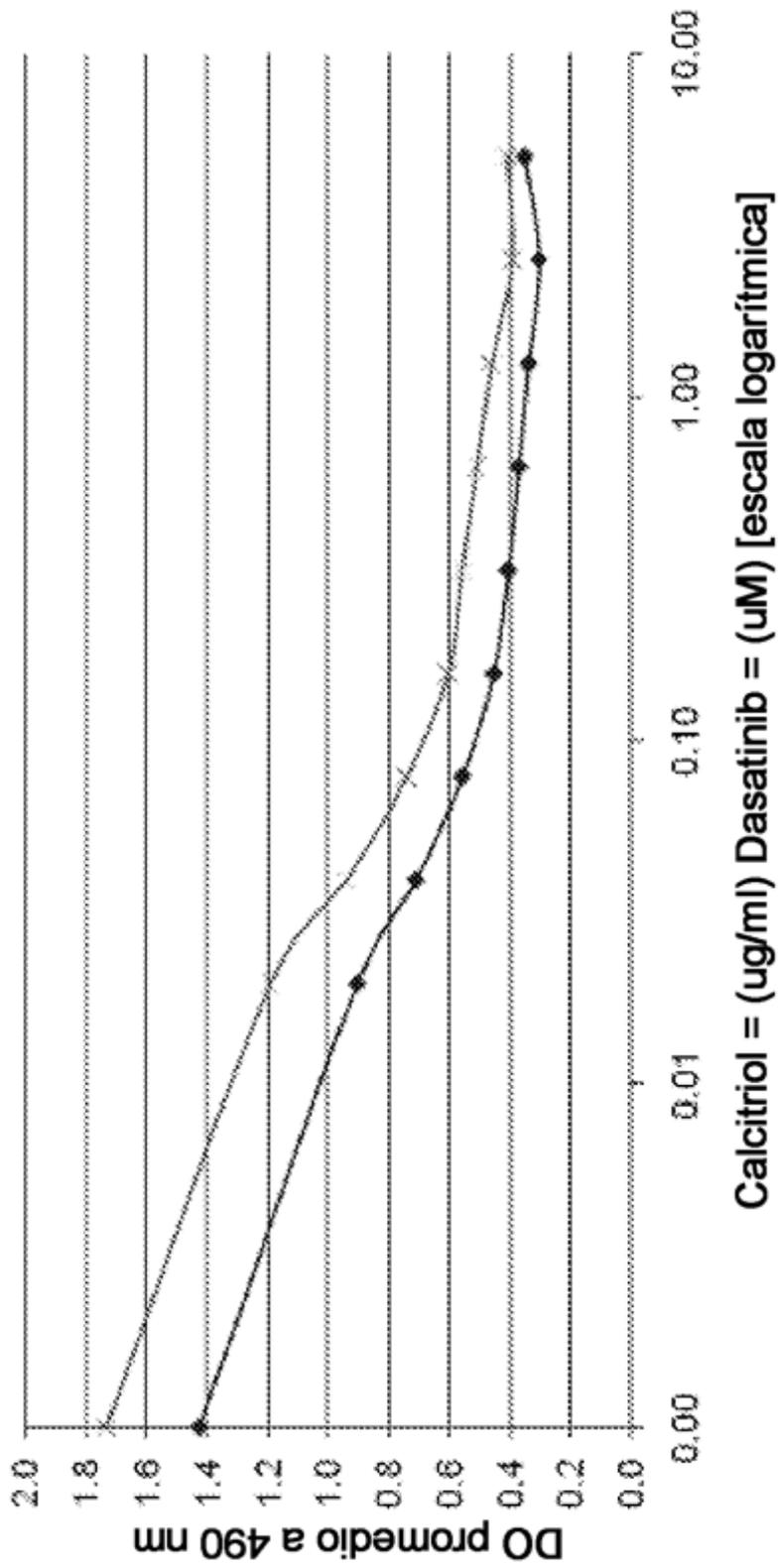


Figura 8

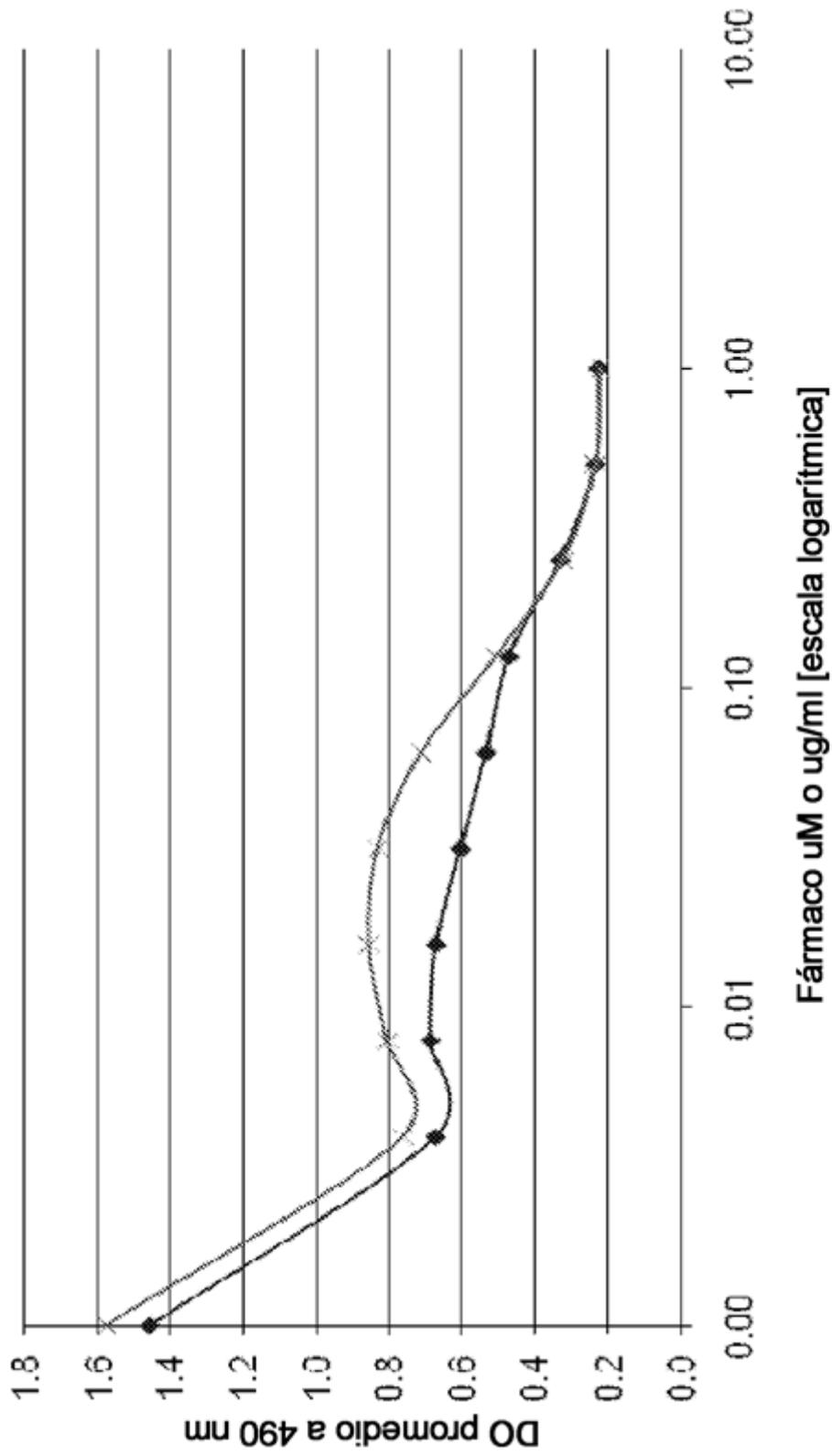


Figura 9

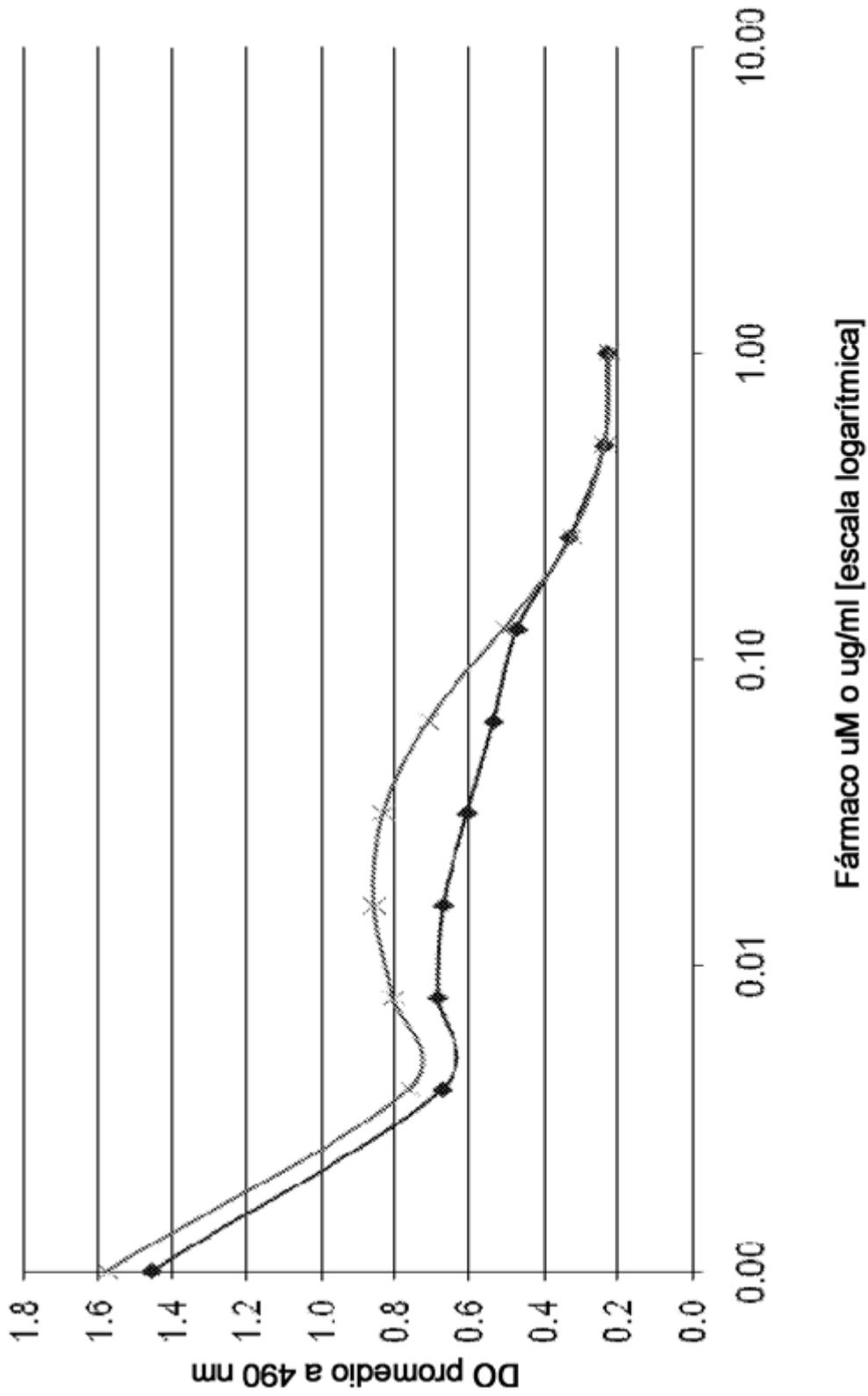


Figura 10

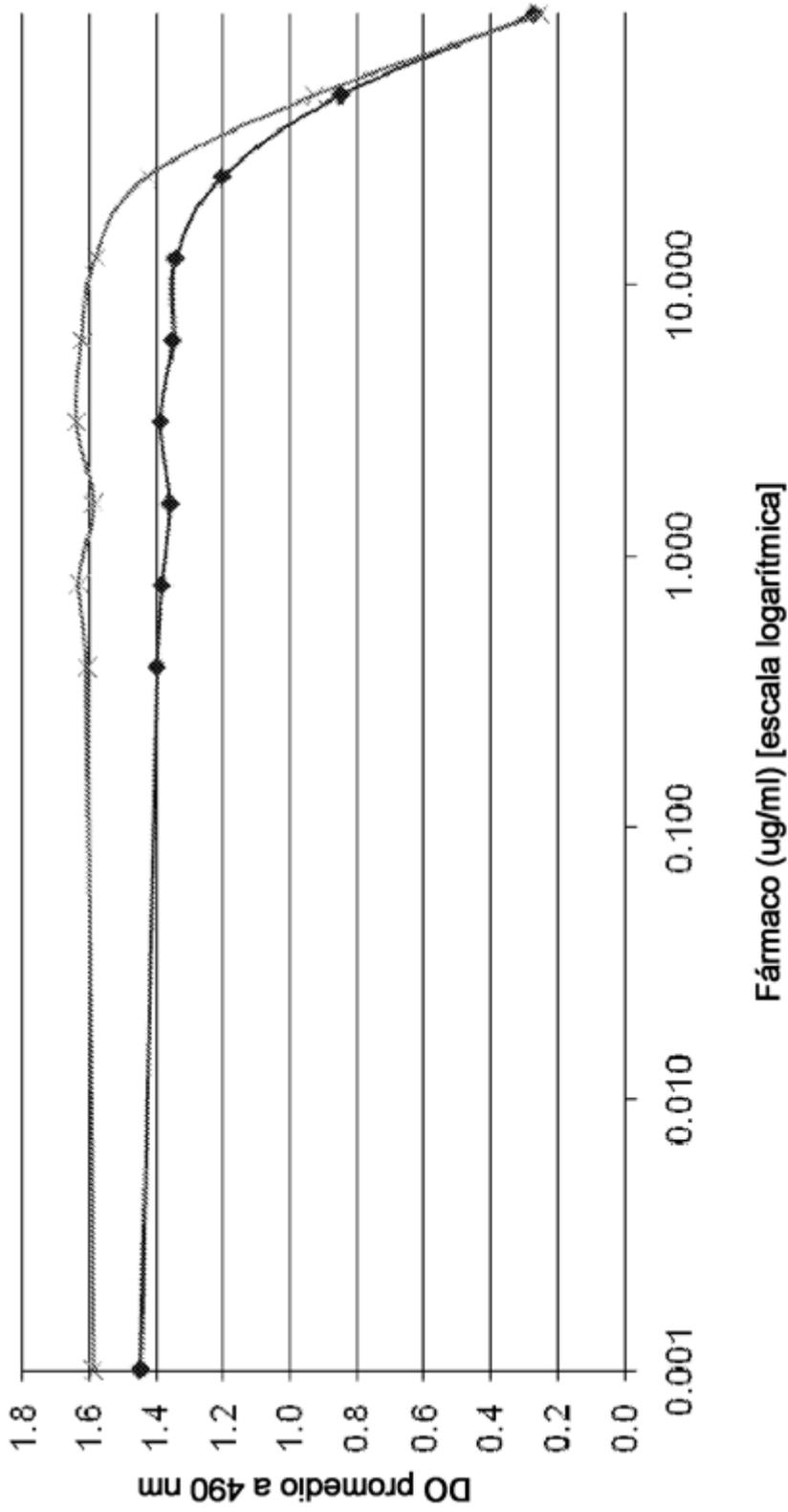


Figura 11

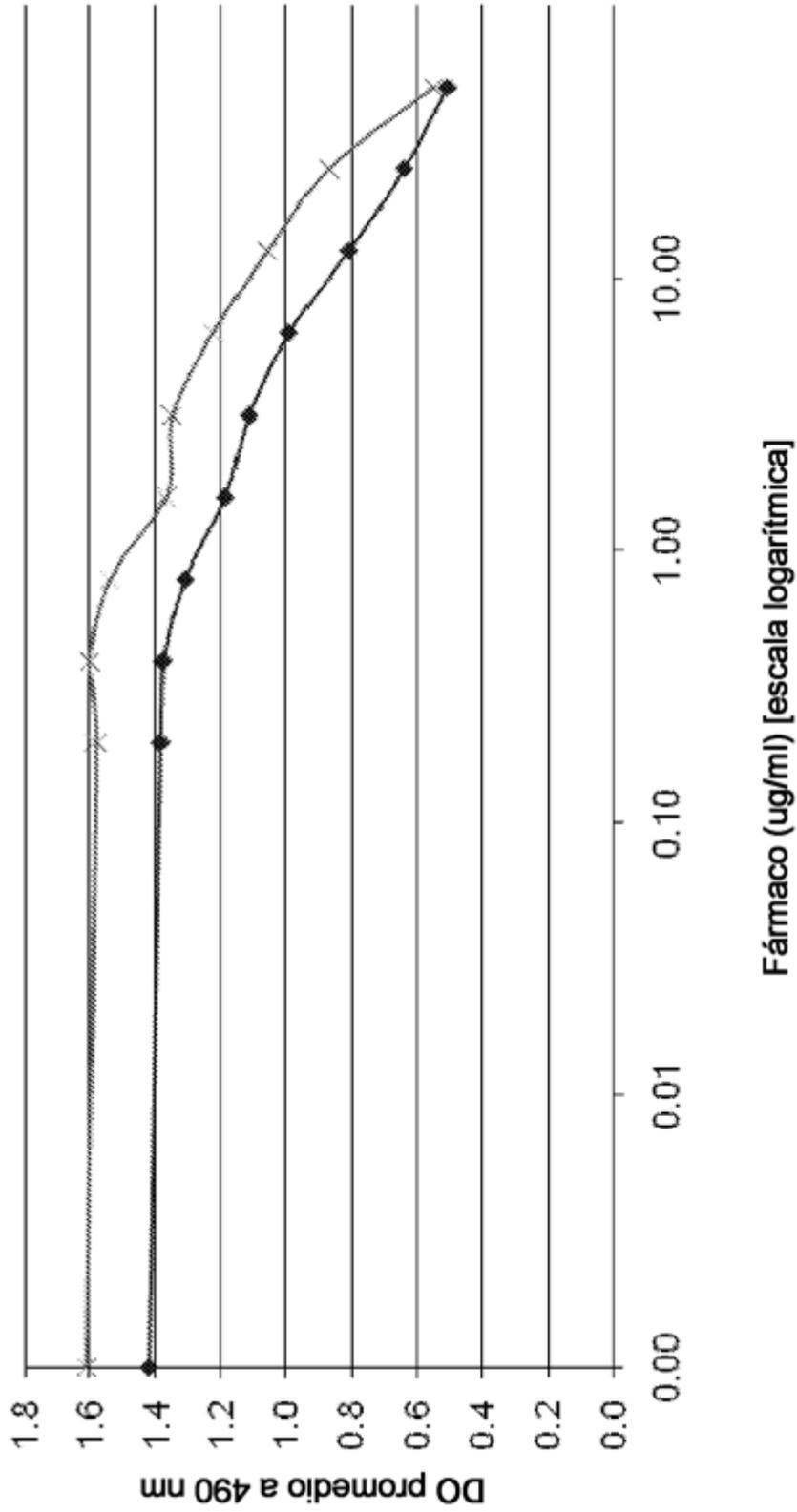


Figura 12

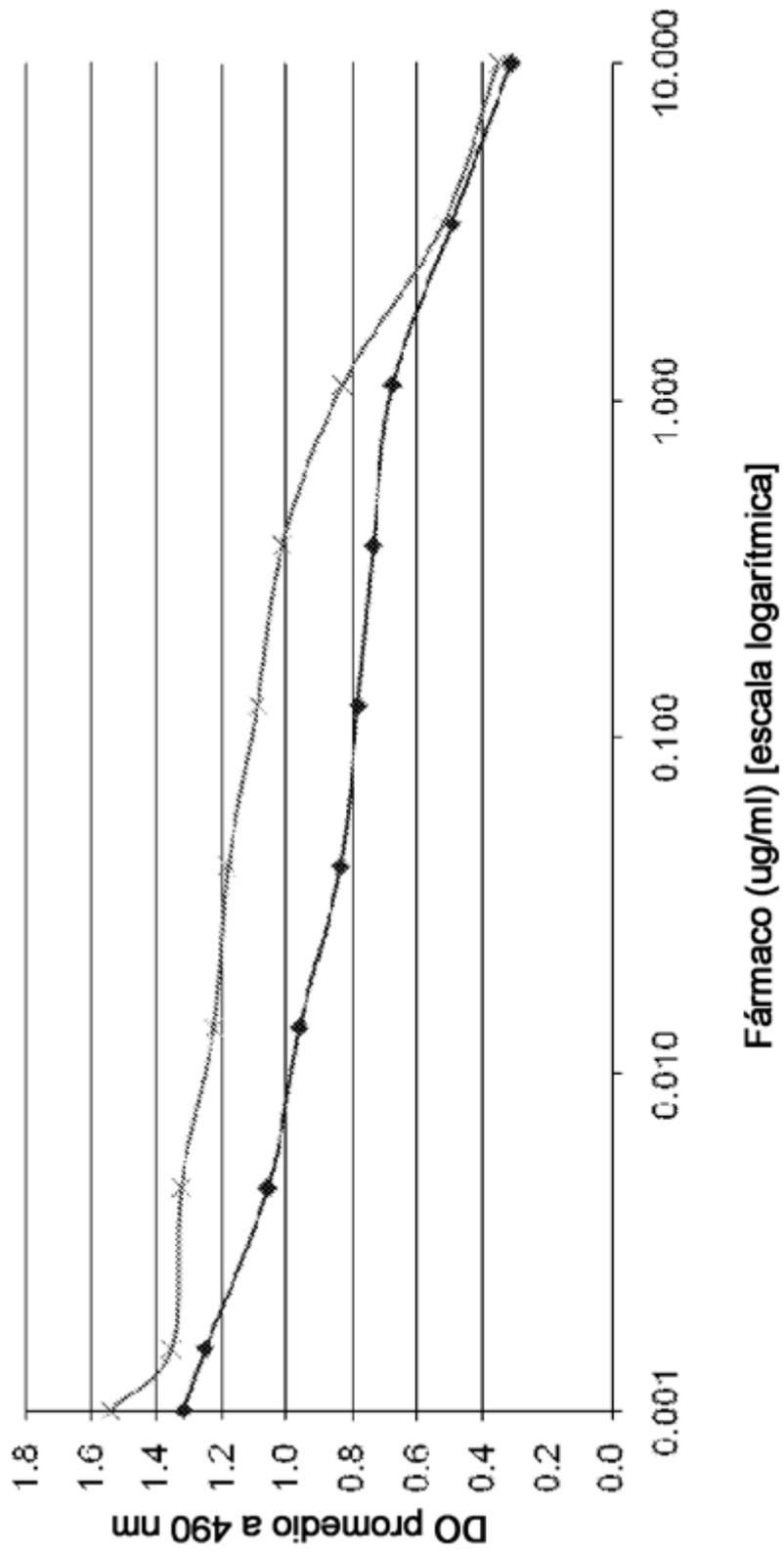


Figura 13

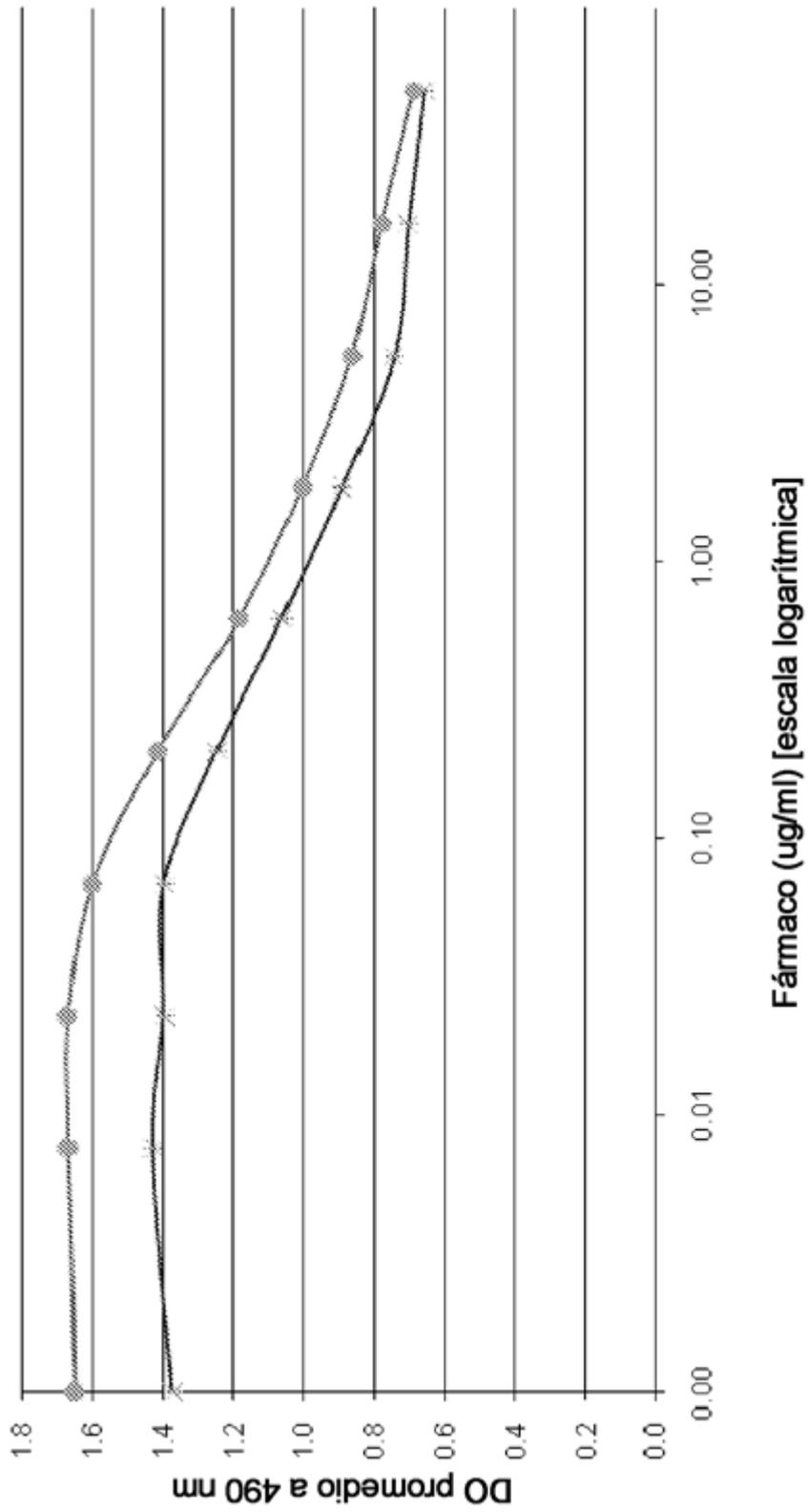


Figura 14

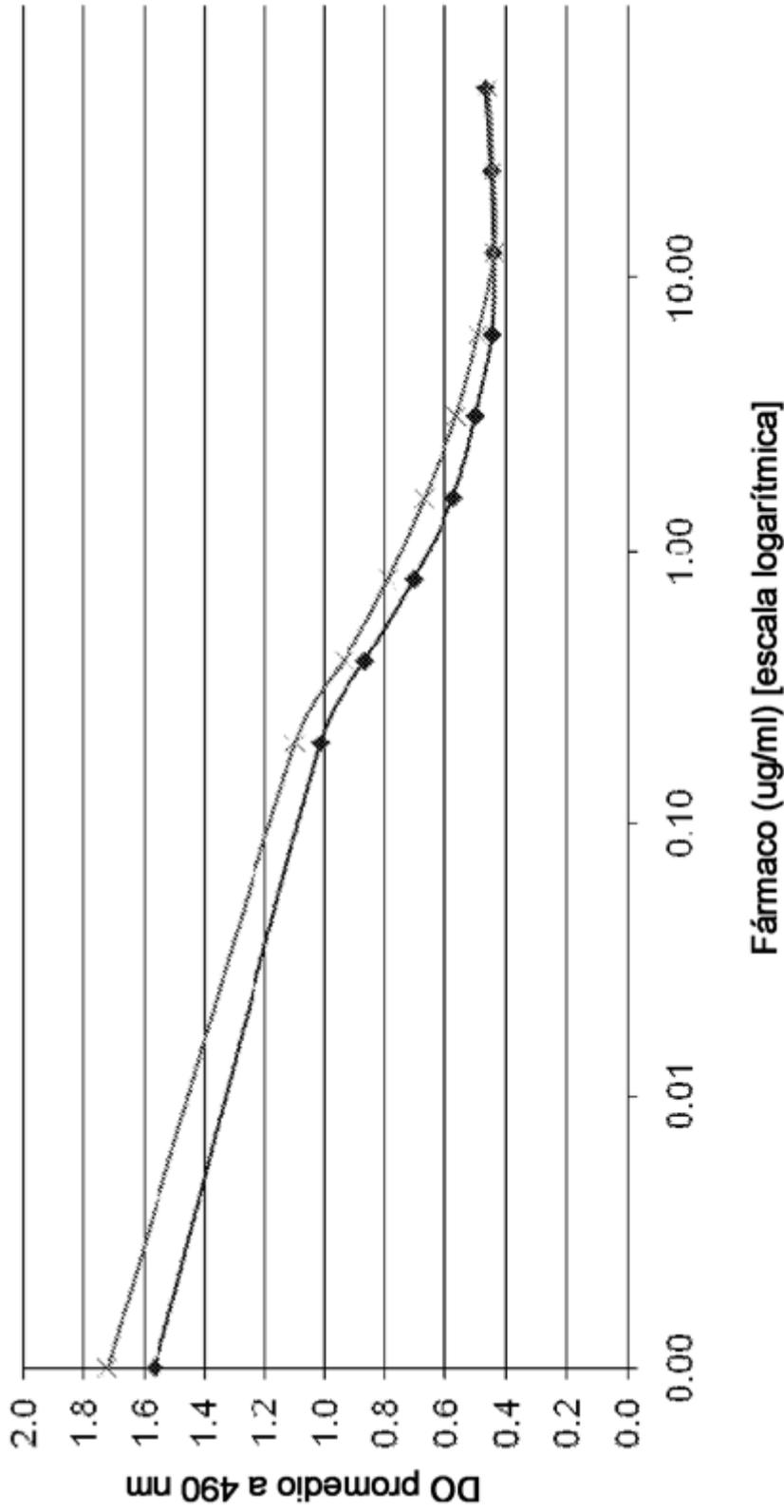


Figura 15

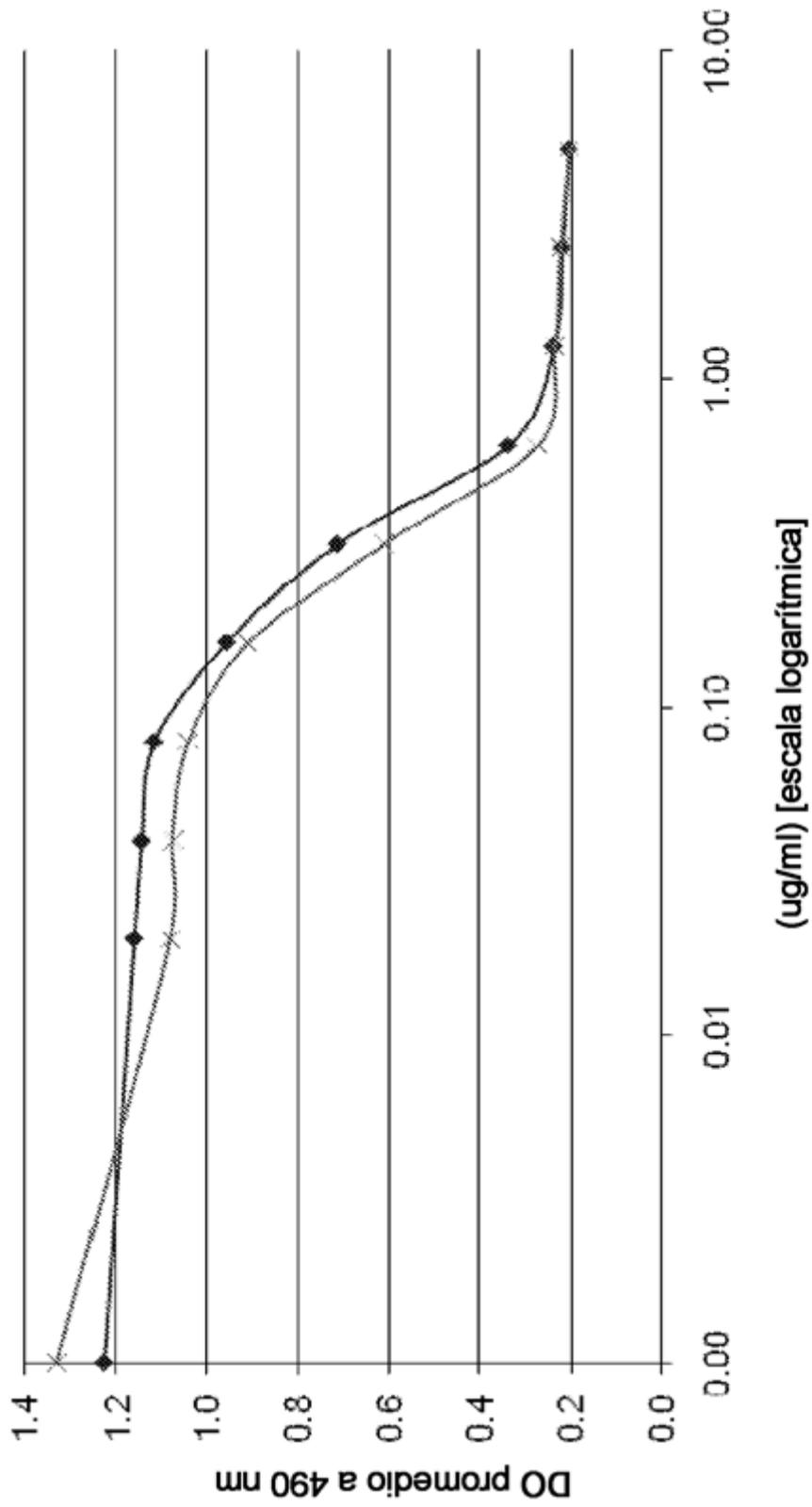


Figura 16

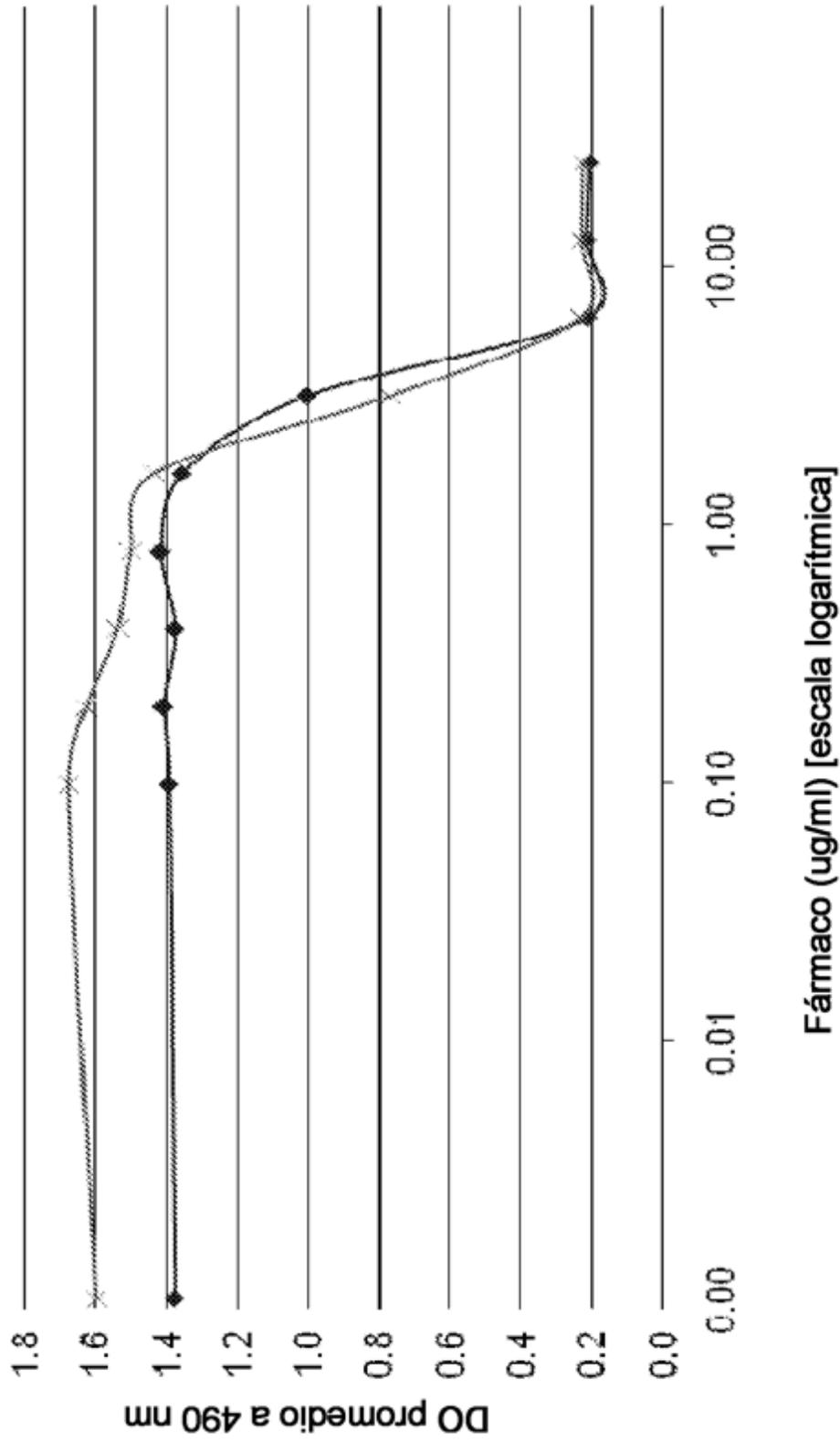


Figura 17

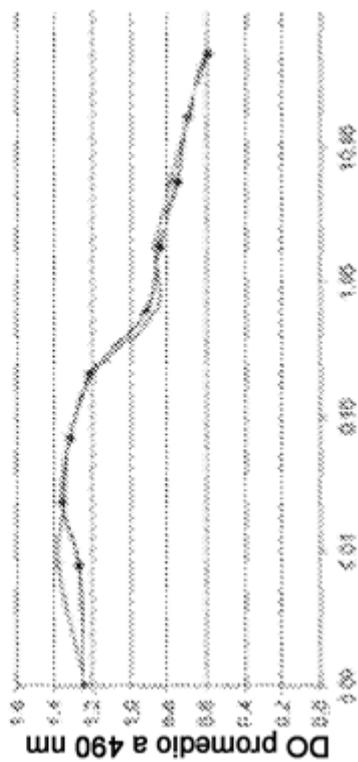
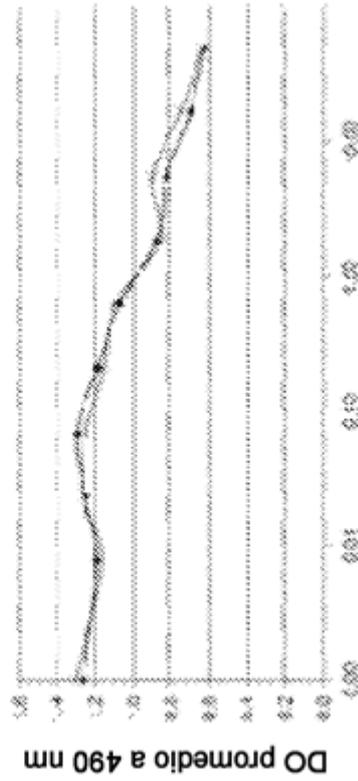
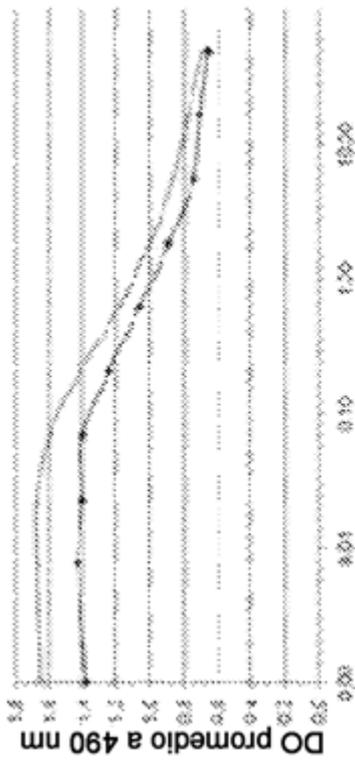
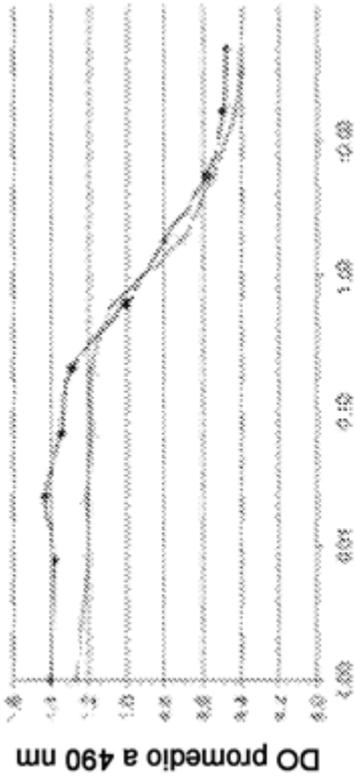


Figura 18

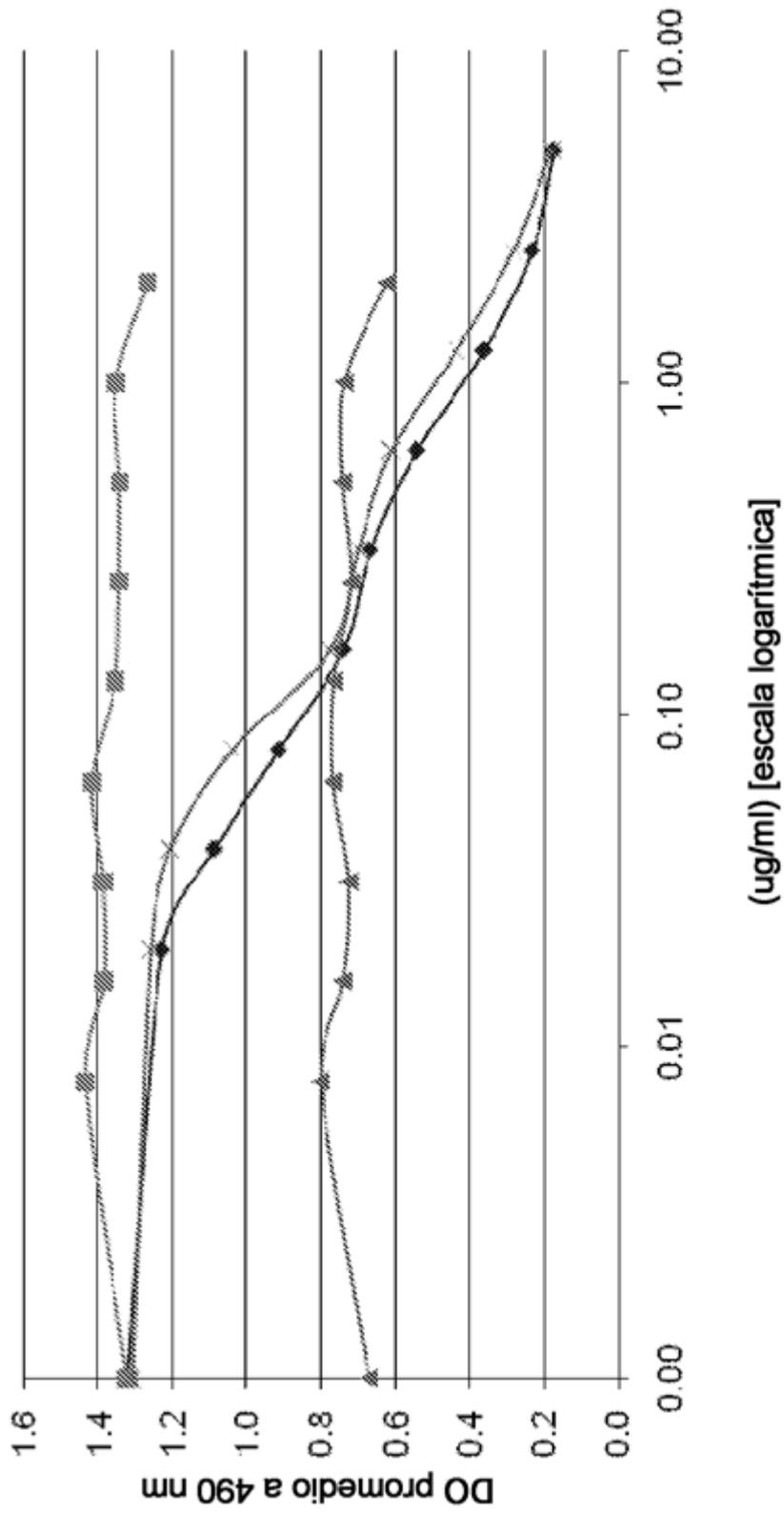


Figura 19

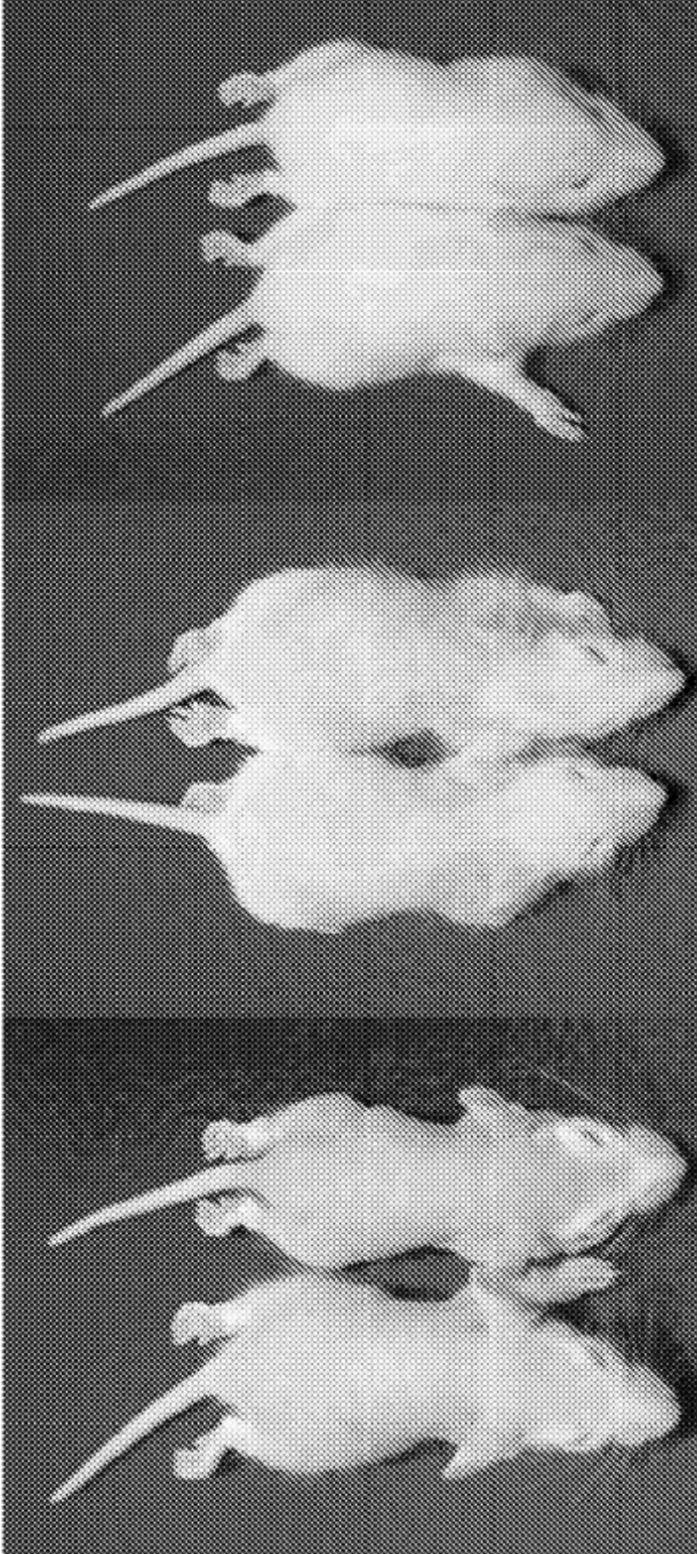


Figura 20A

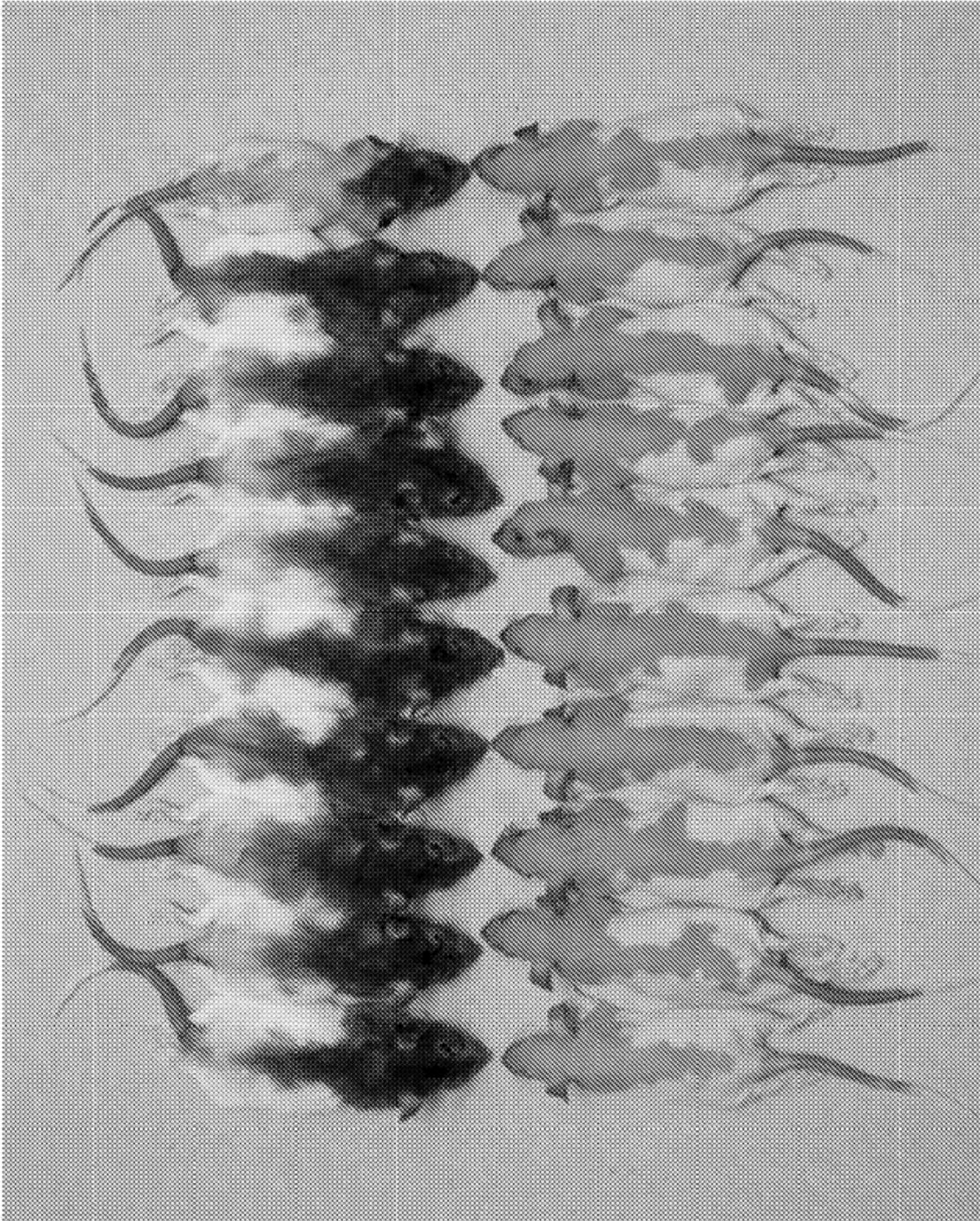


Figura 20B

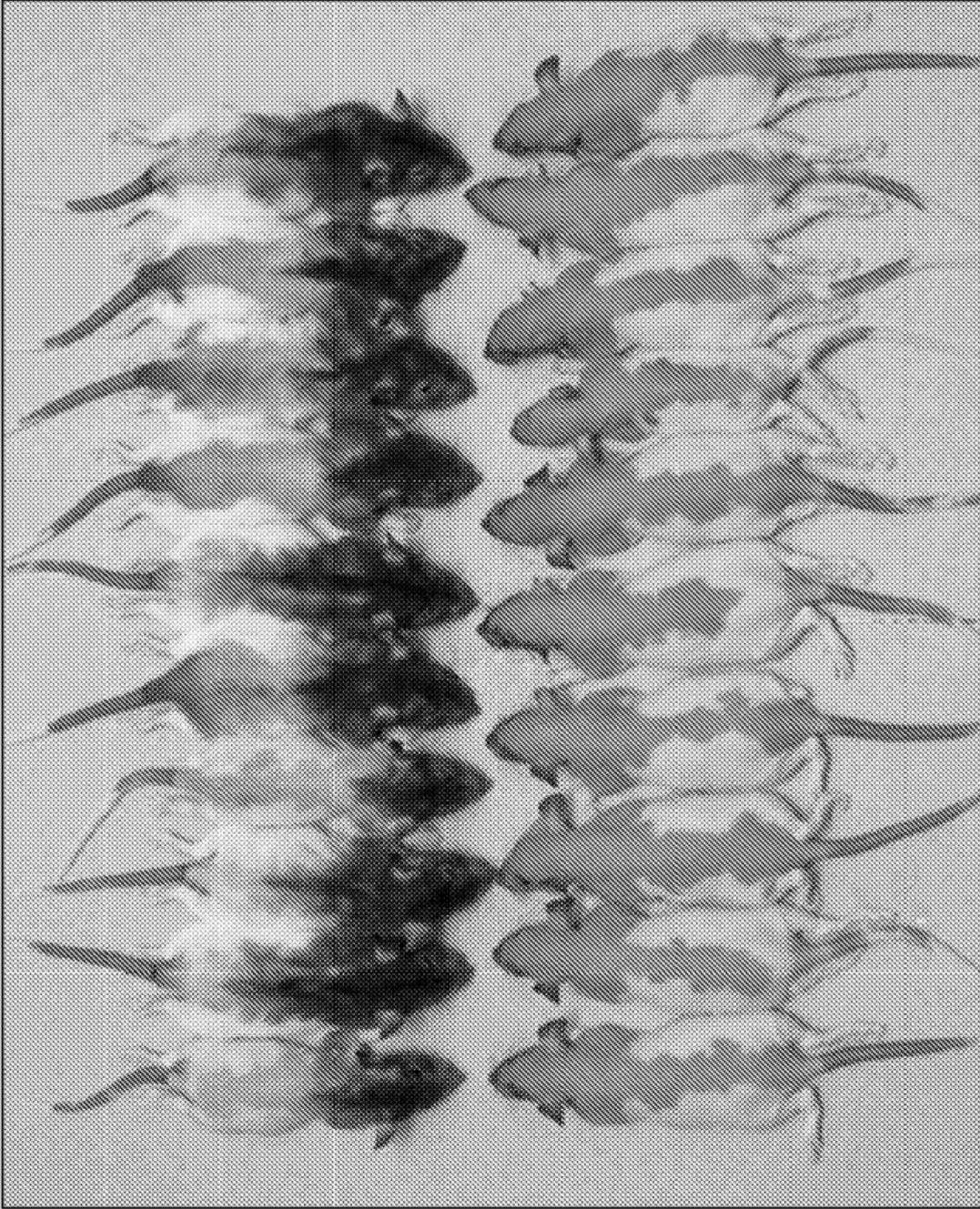


Figura 21

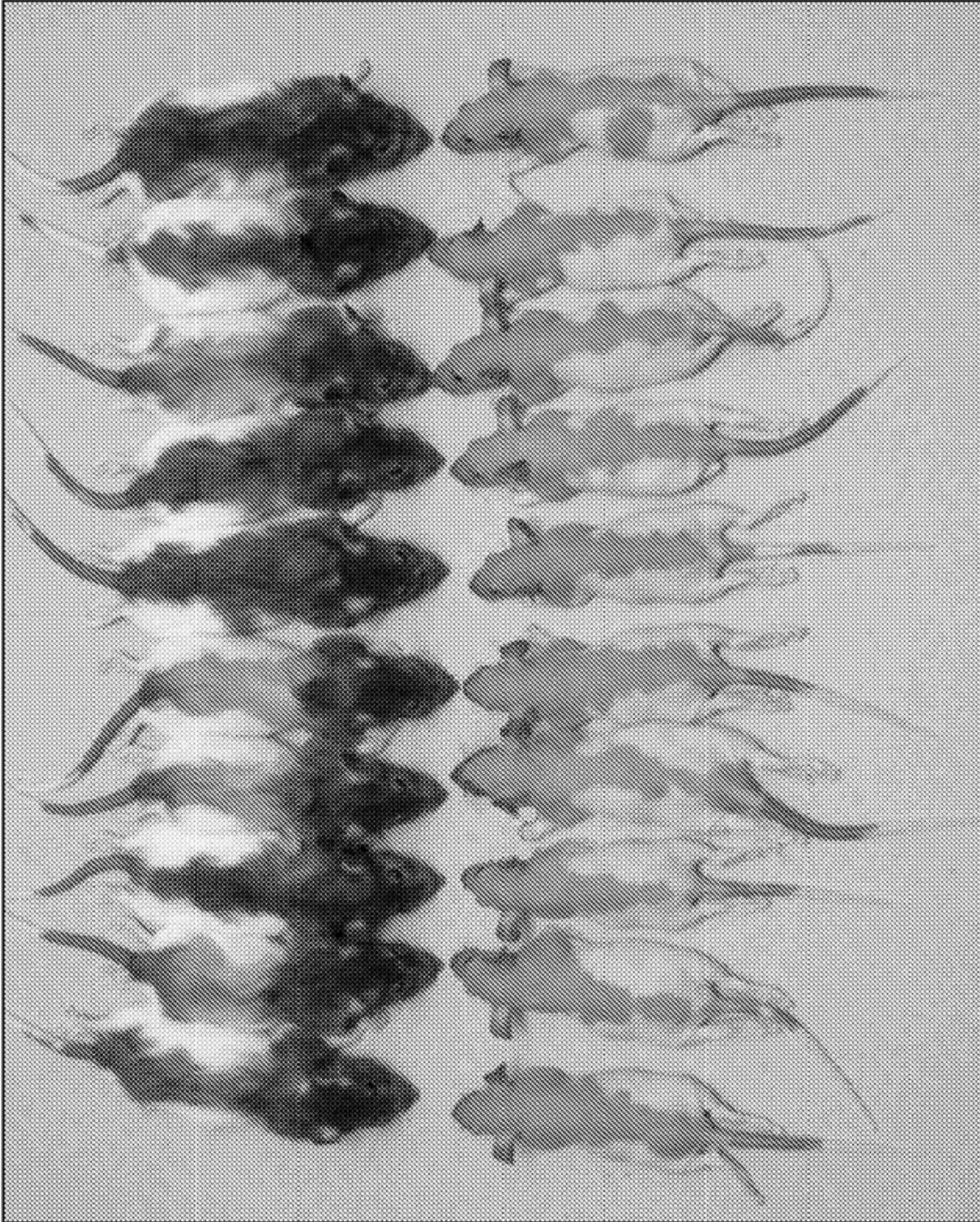


Figura 22A

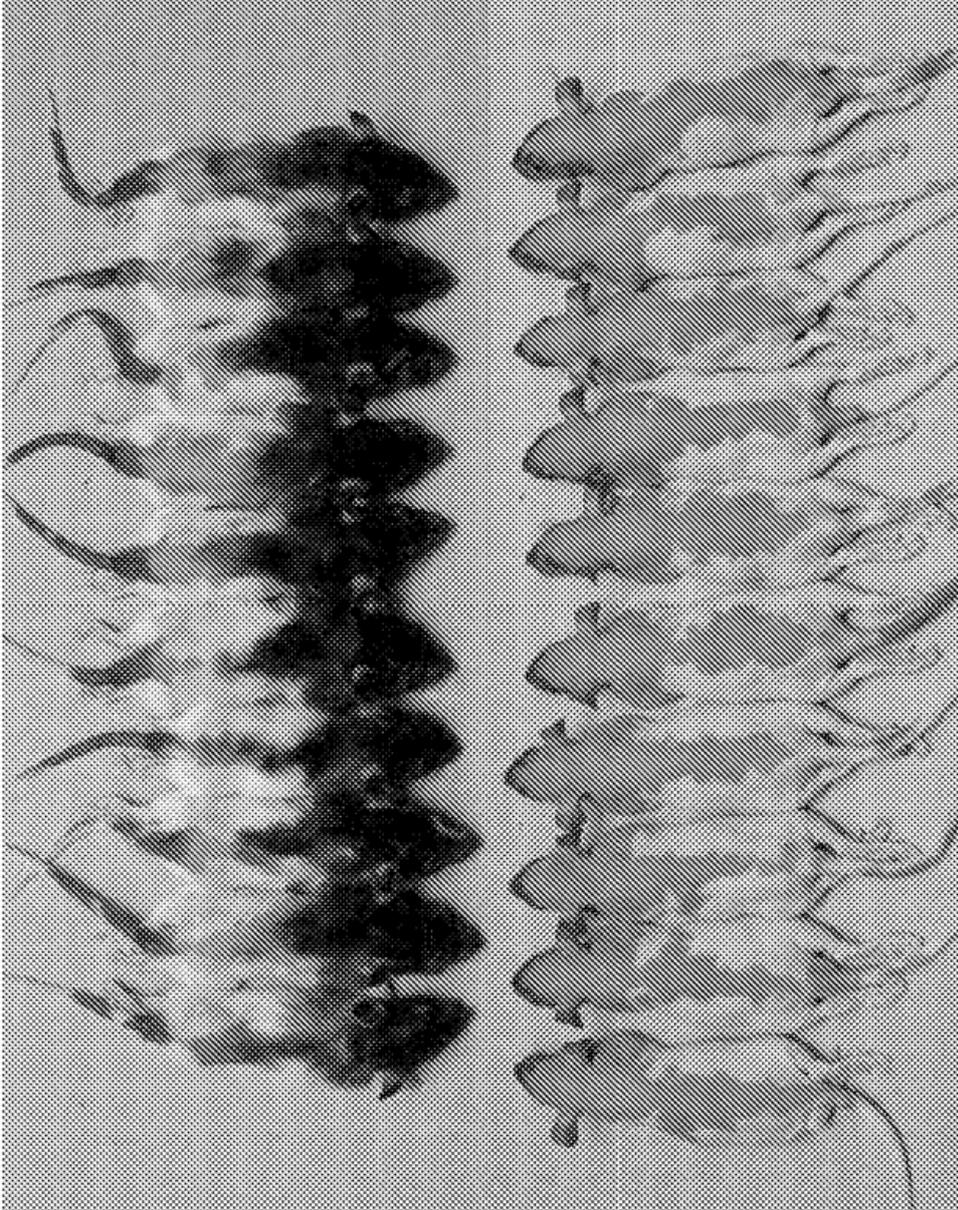


Figura 22B

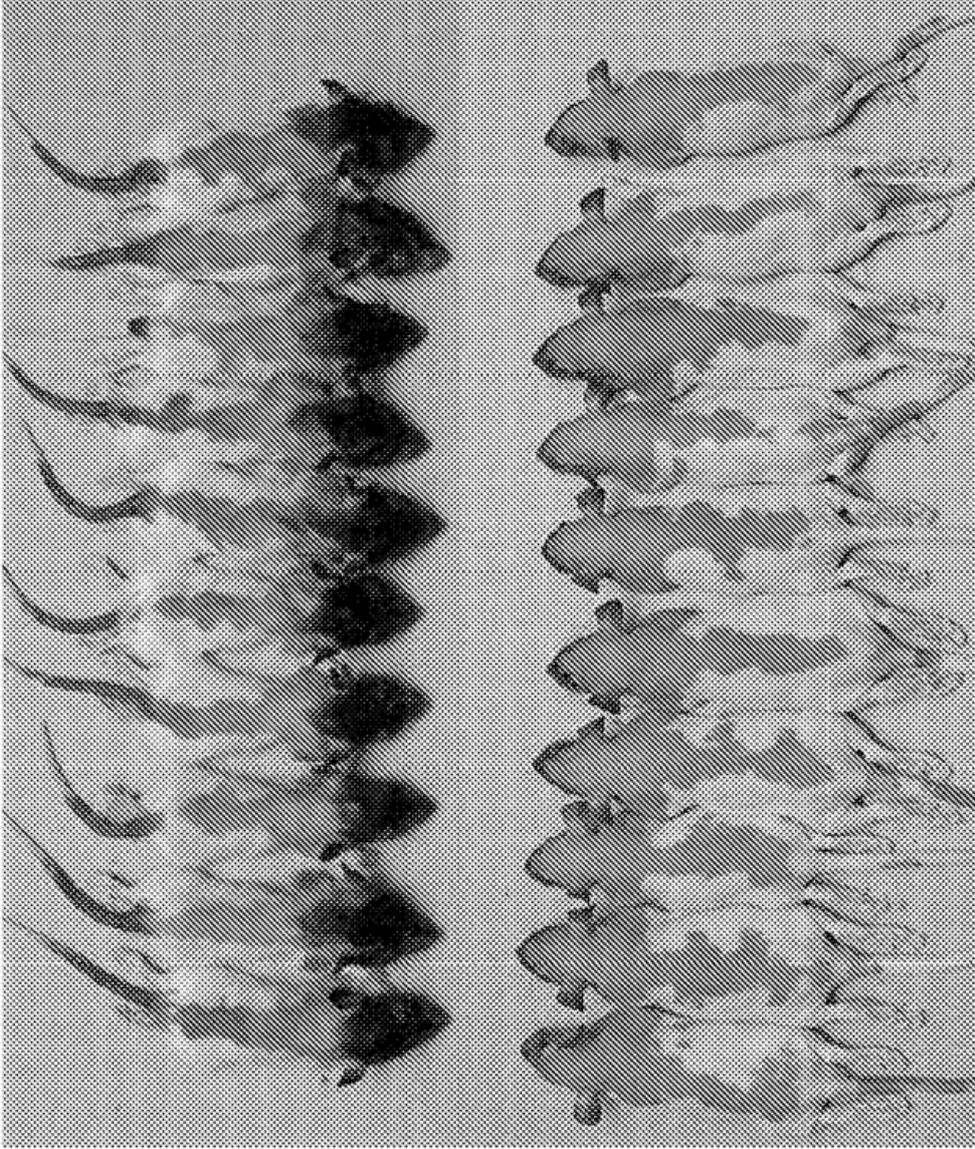


Figura 22C

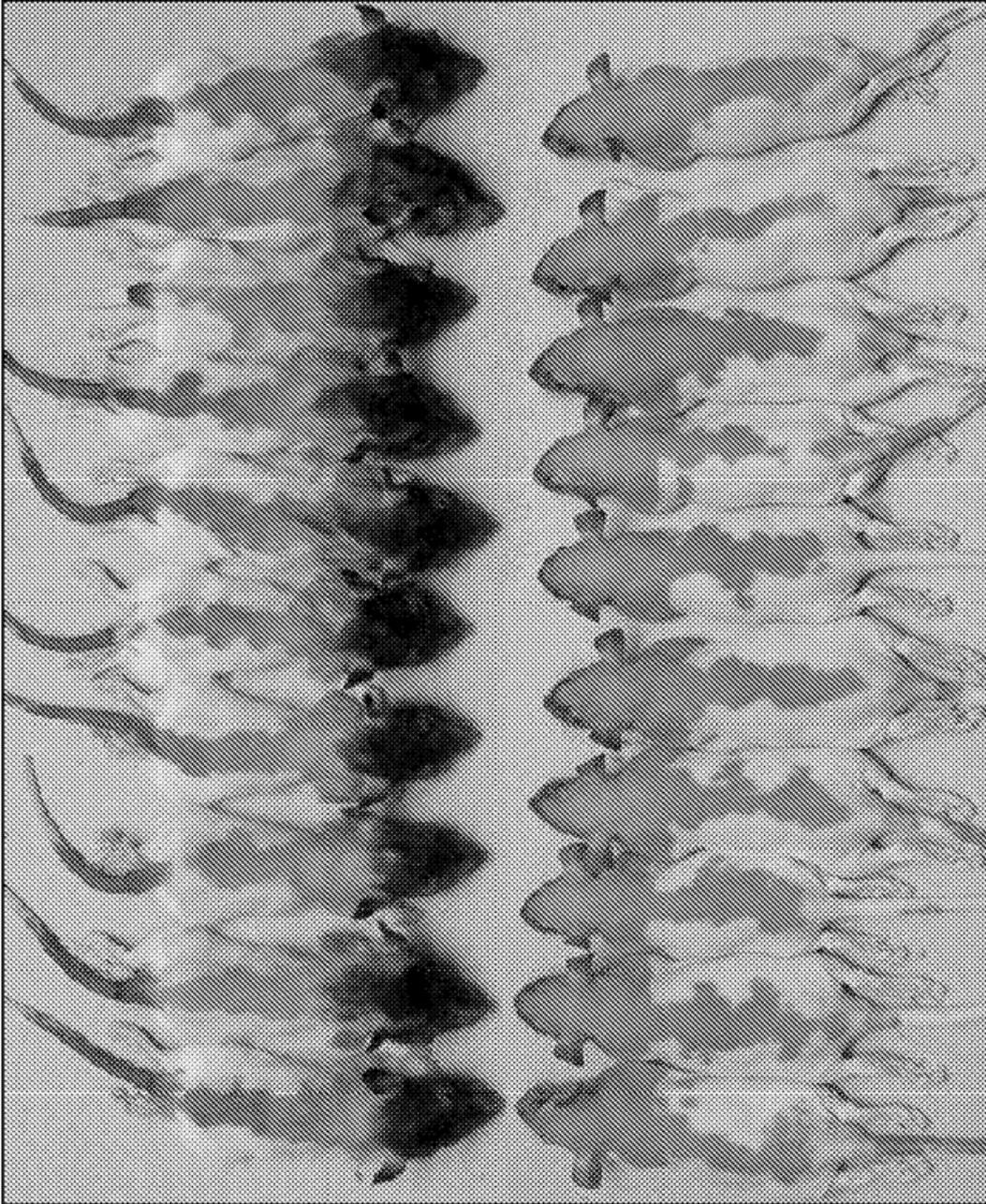


Figura 23

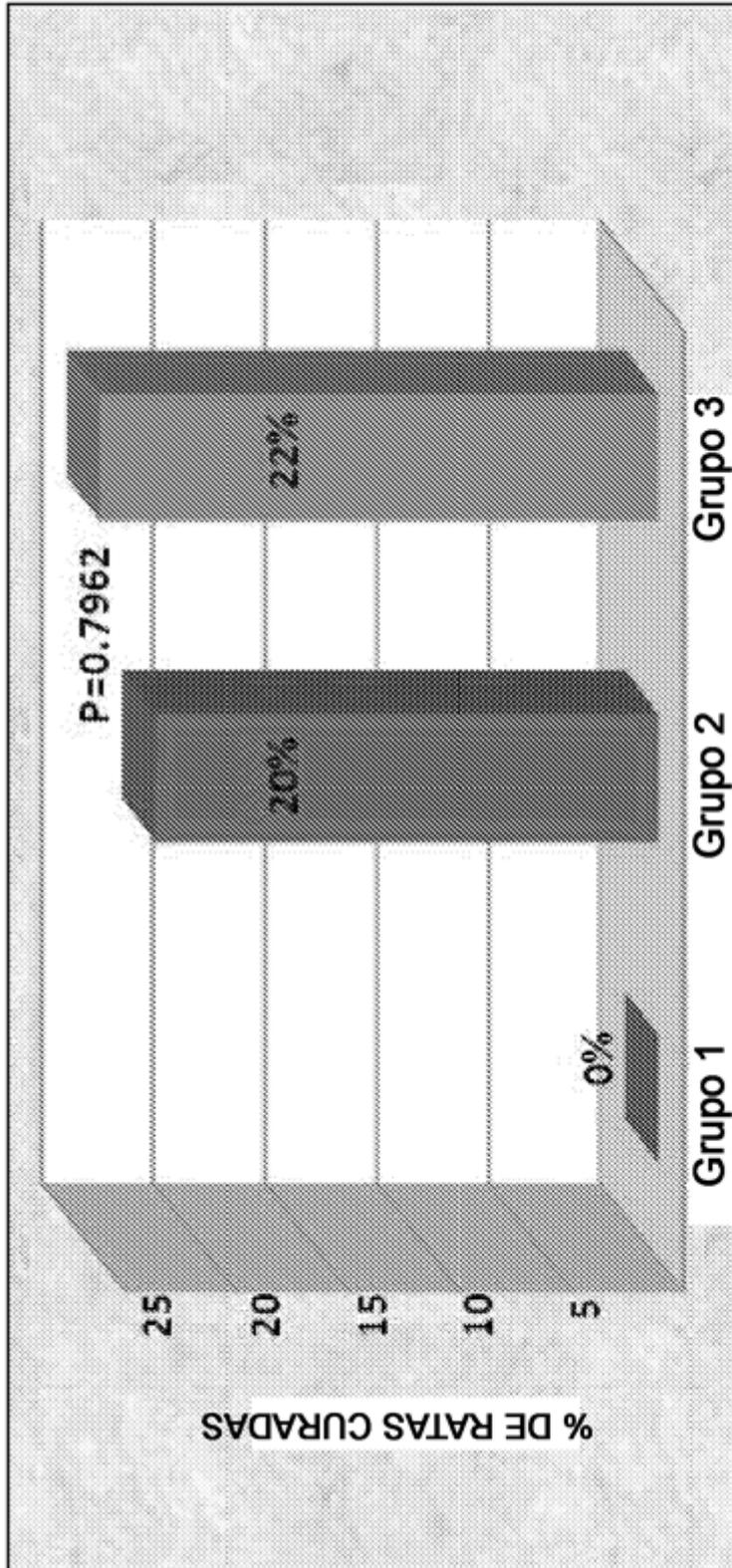


Figura 24

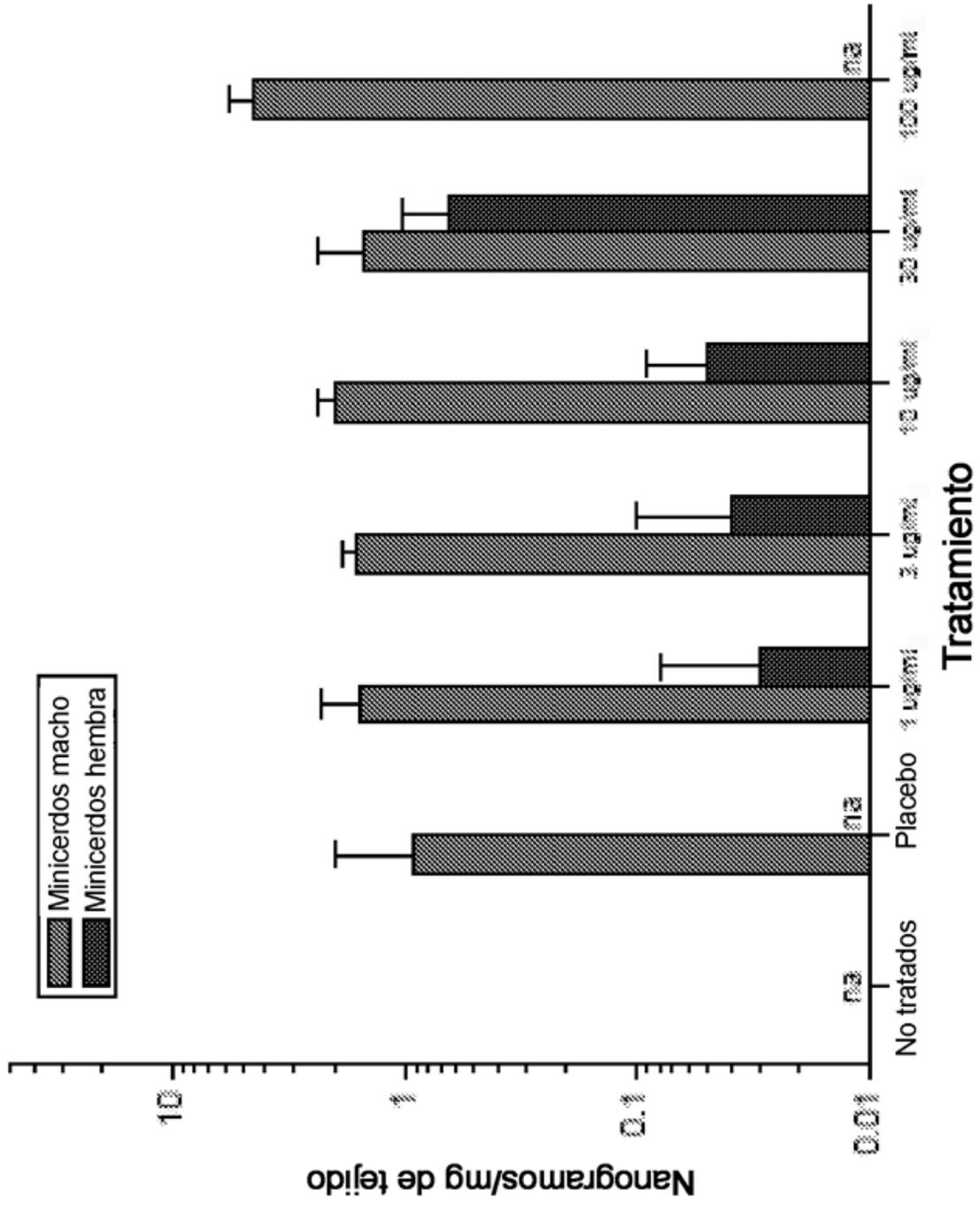
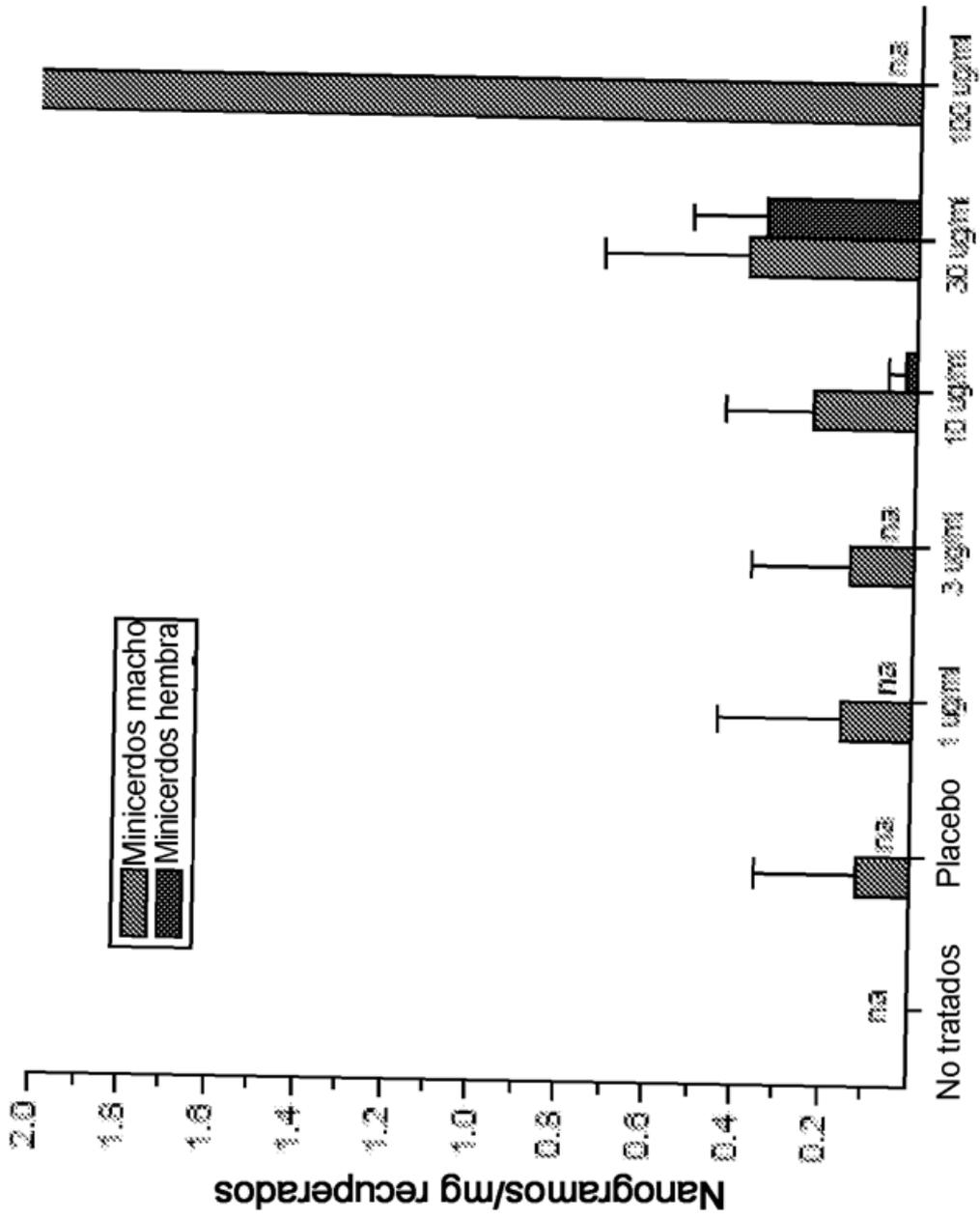


Figura 25A



Tratamiento
Figura 25B

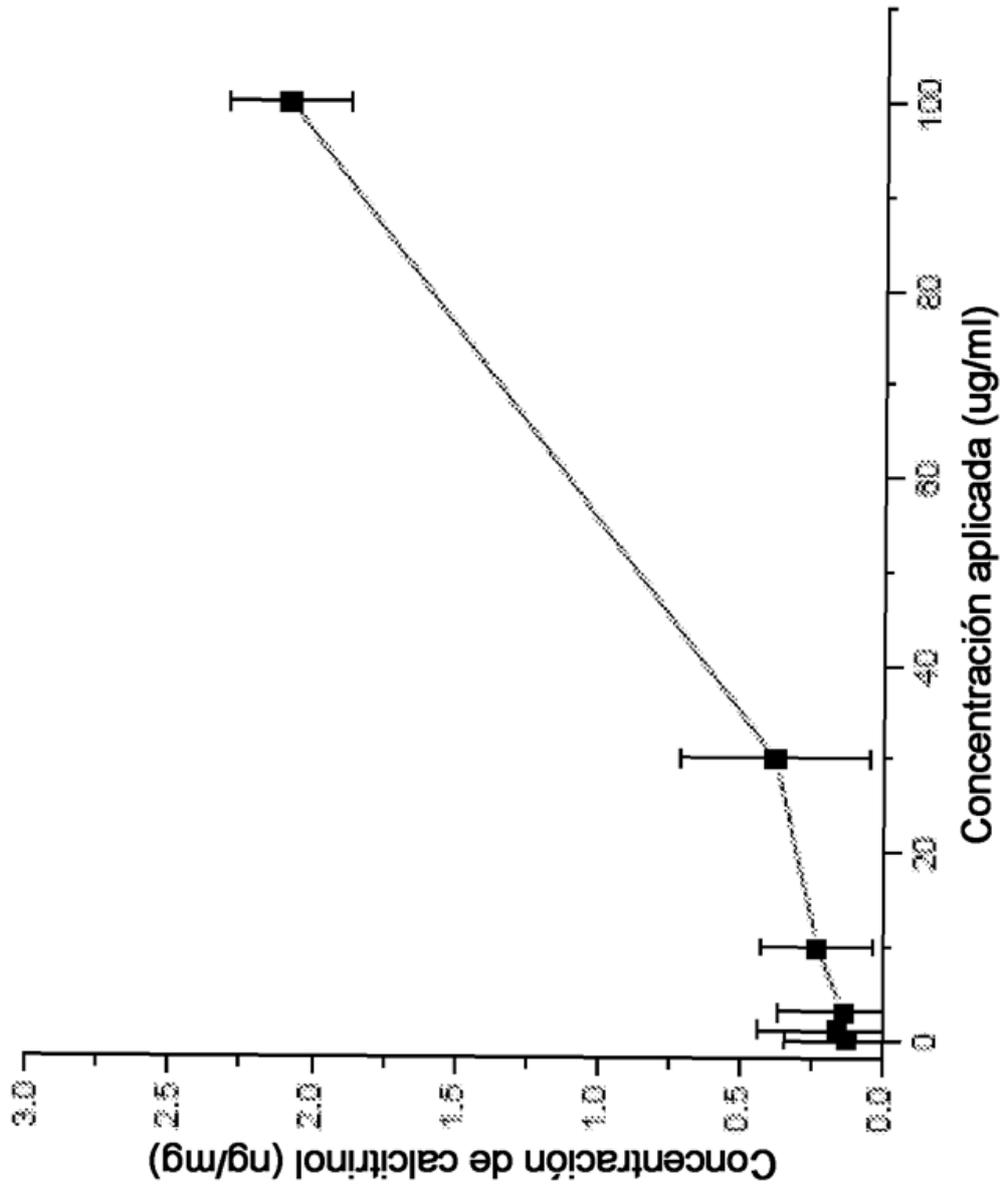
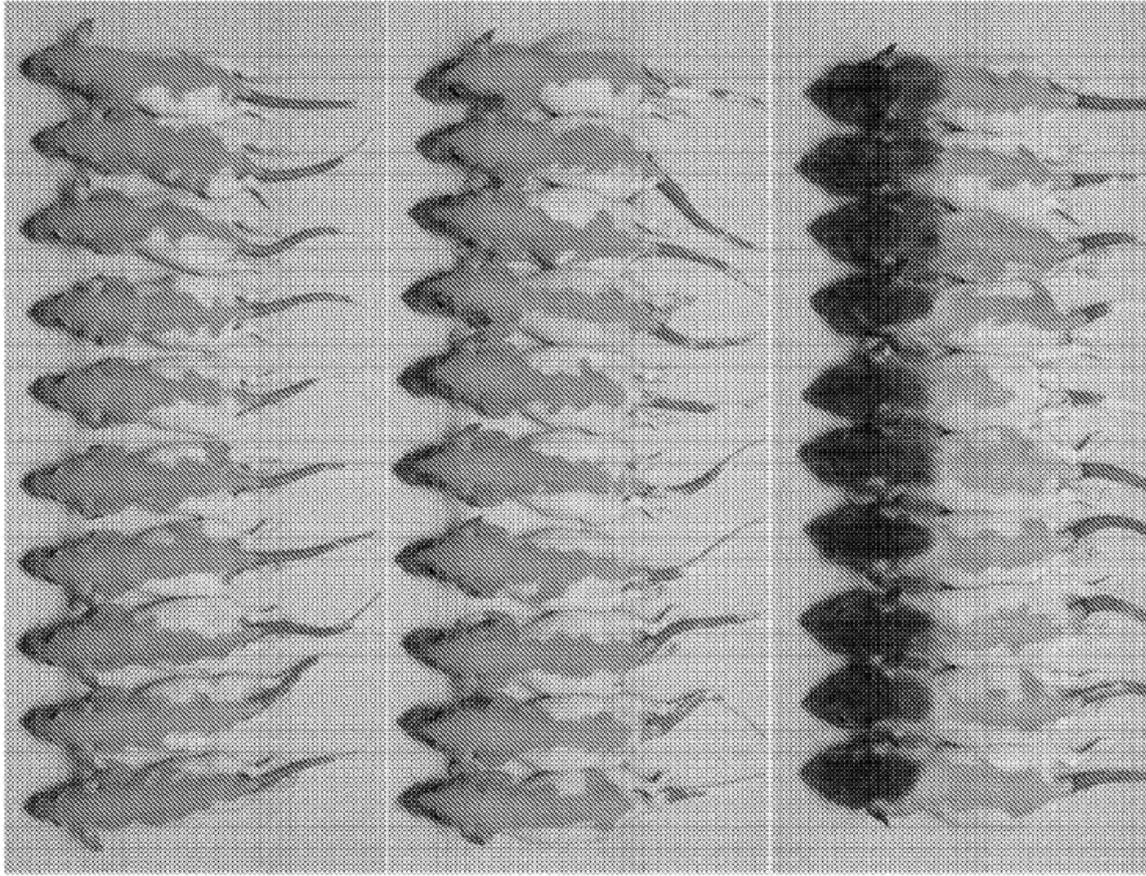


Figura 26



A

B

C

Figura 27

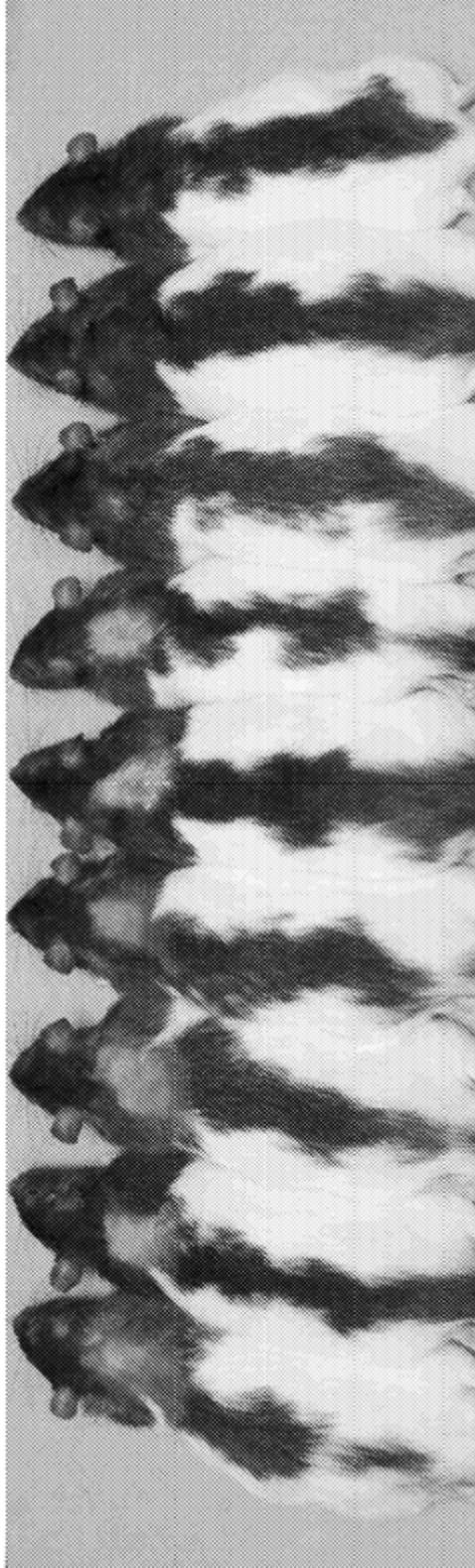
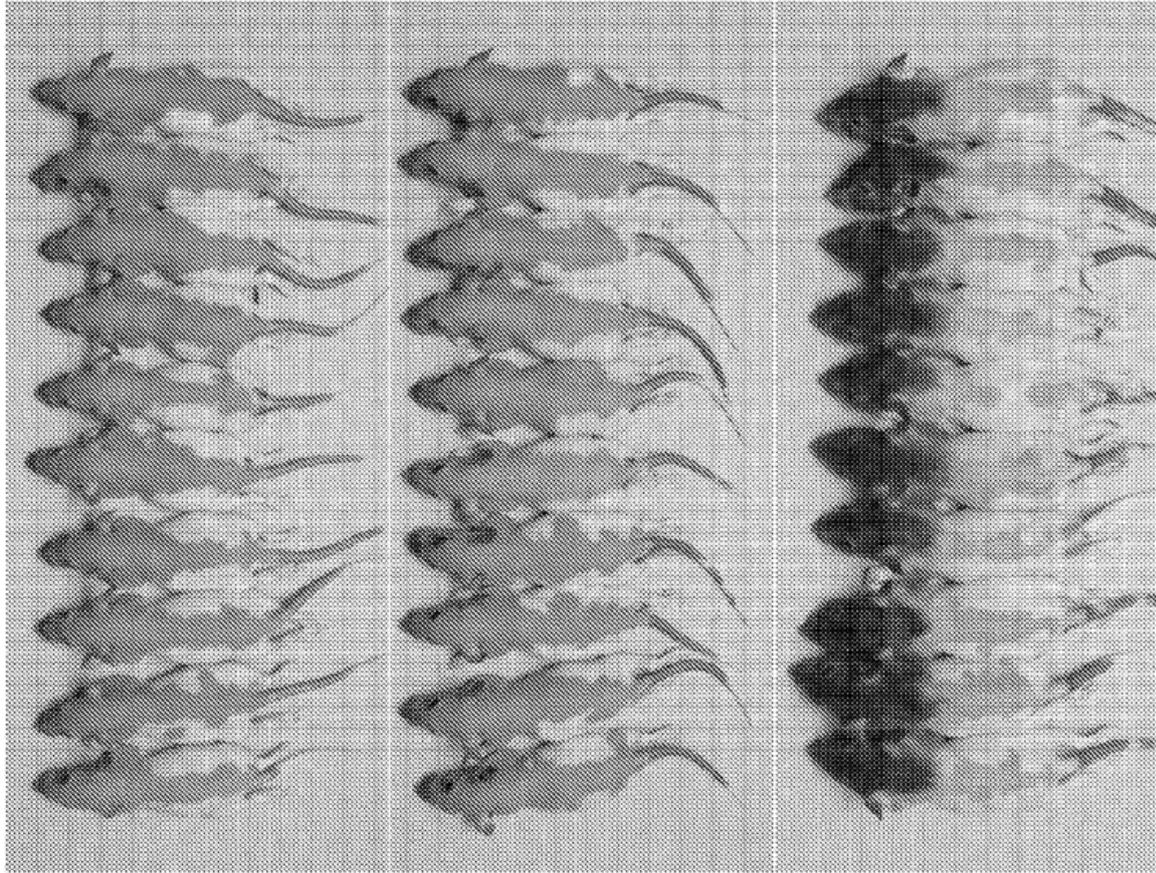


Figura 28



A

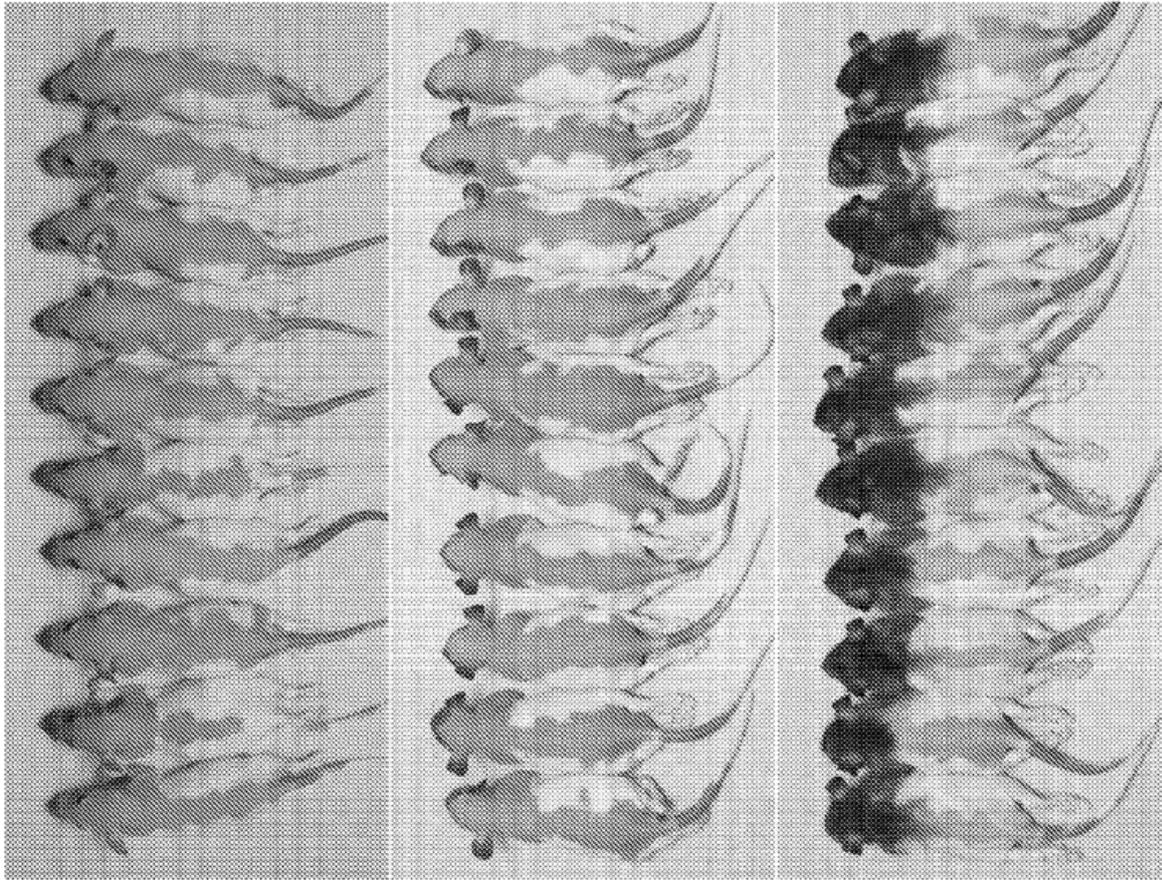
B

C

Figura 29



Figura 30



A

B

C

Figura 31

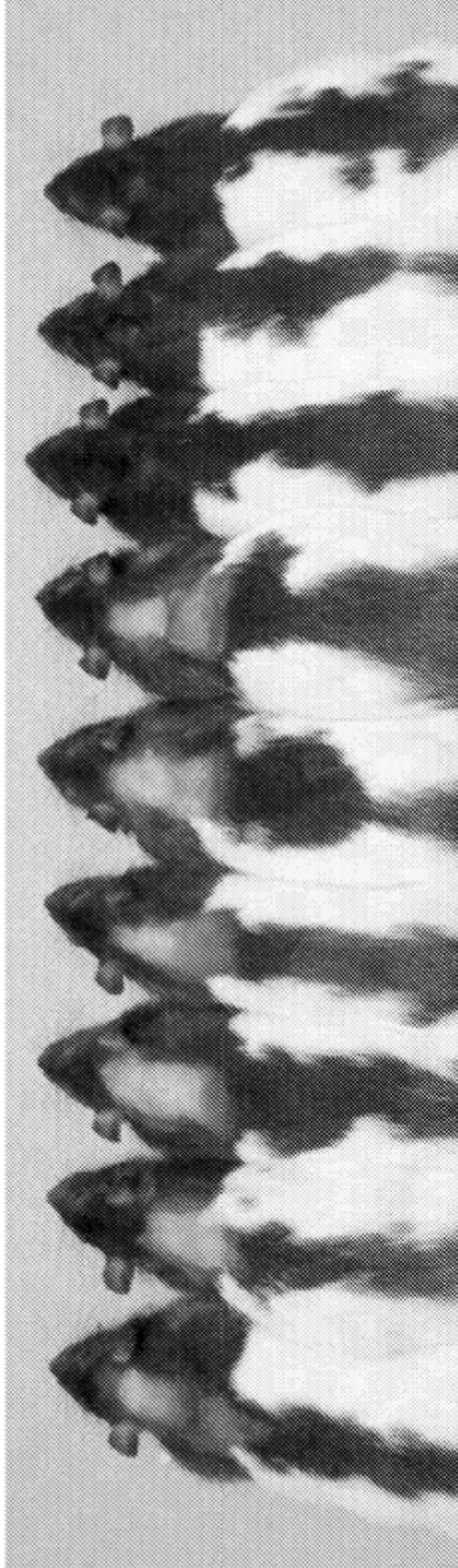
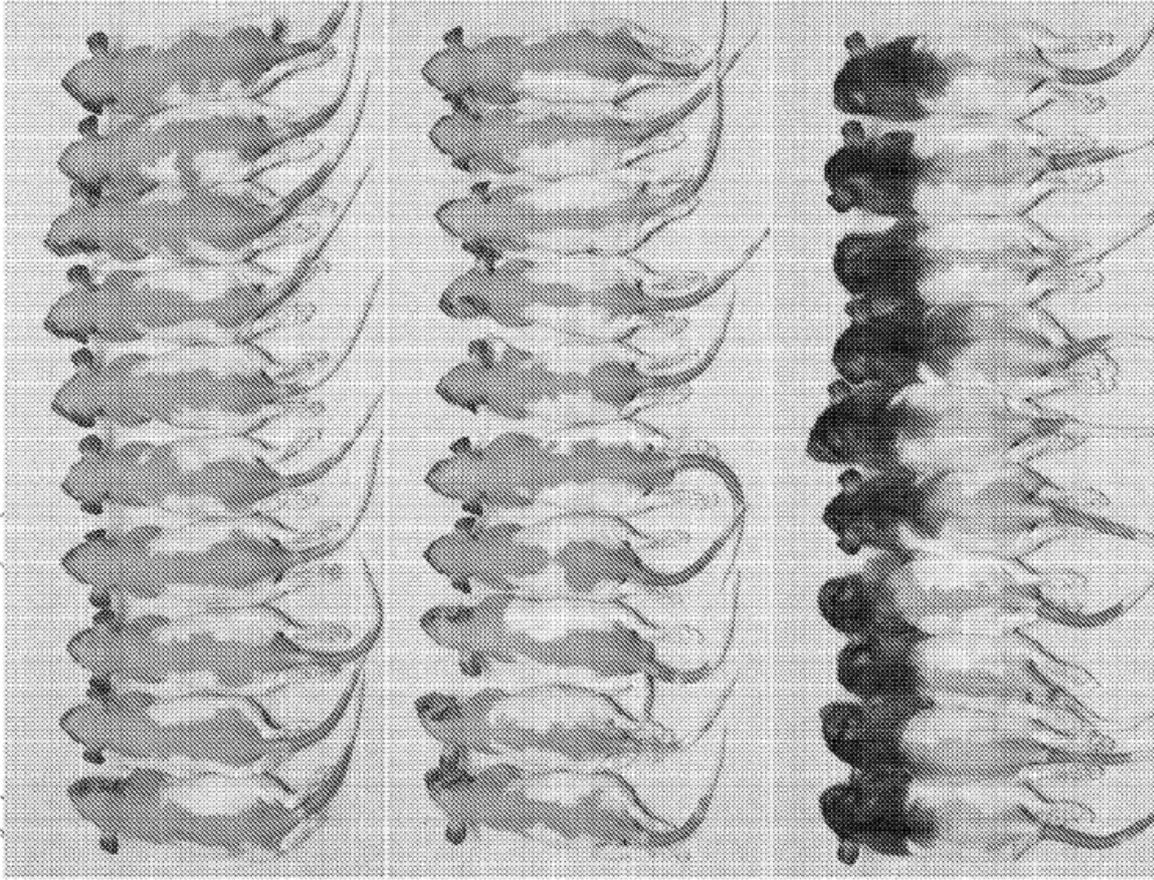


Figura 32



A

B

C

Figura 33

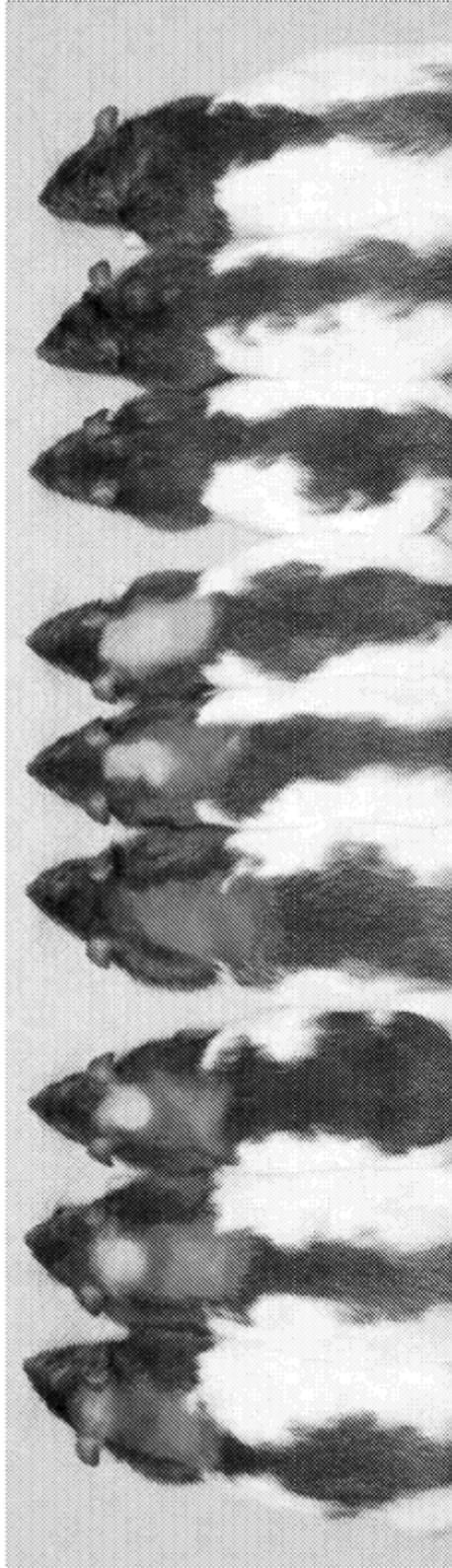
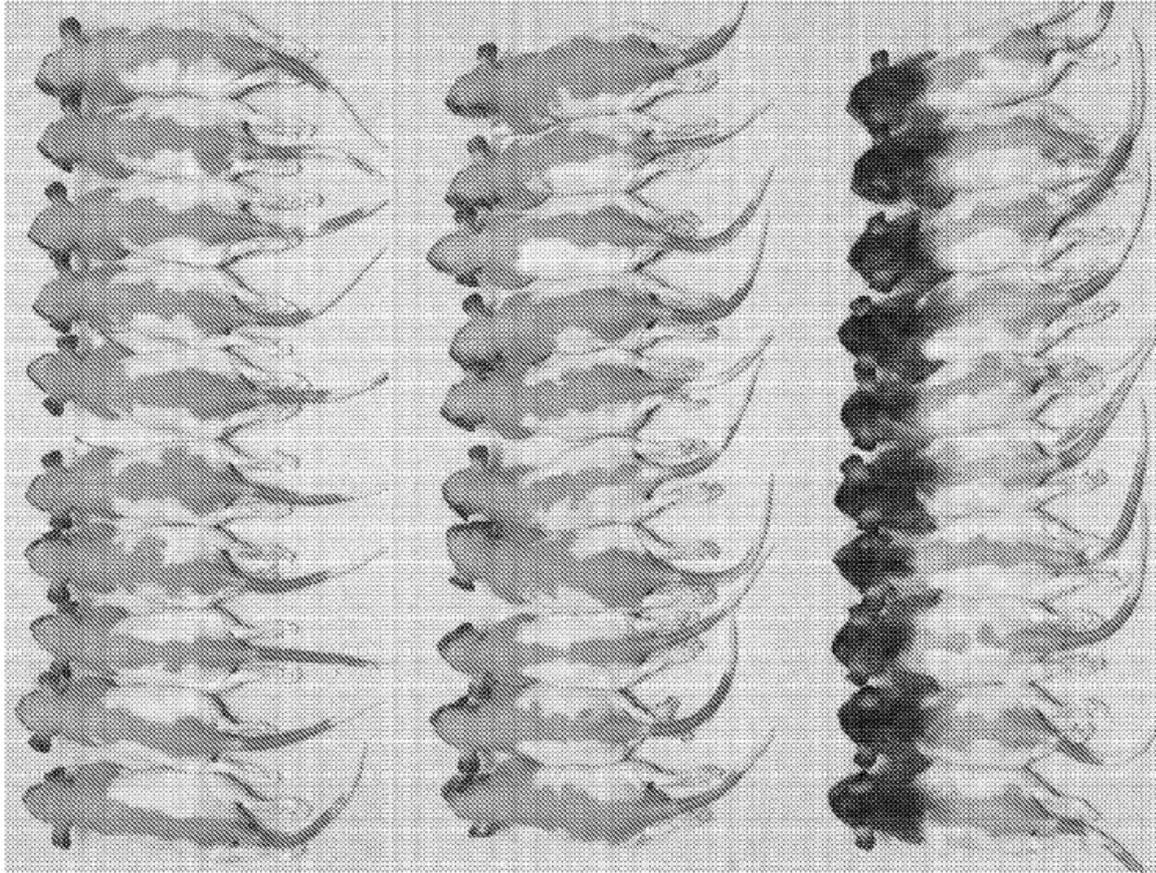


Figura 34



A

B

C

Figura 35

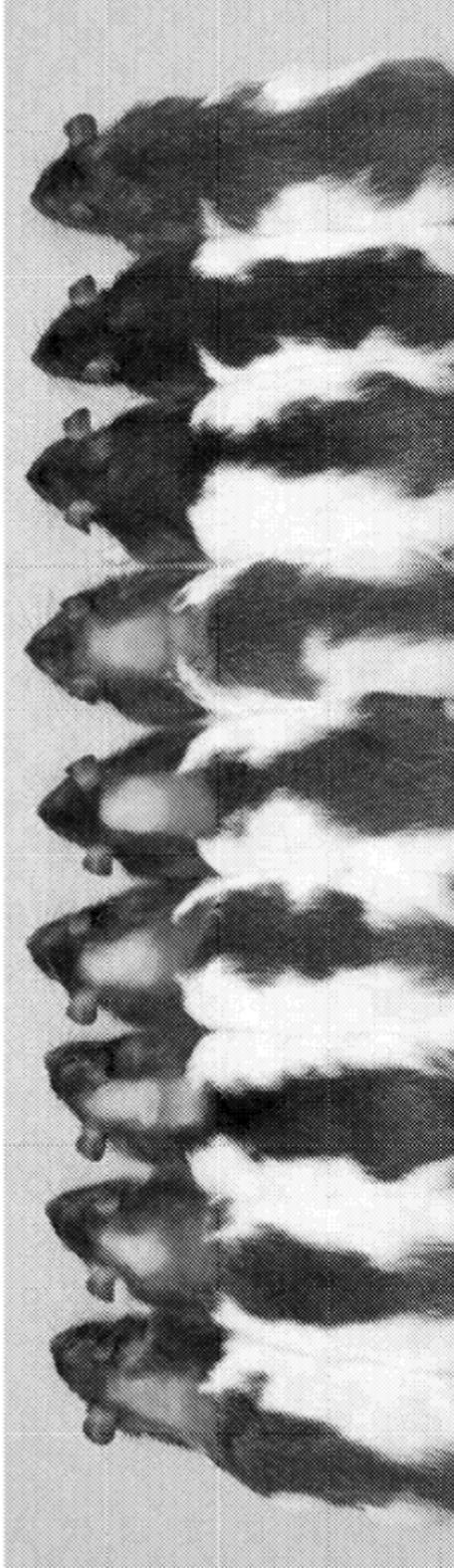


Figura 36