



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 934**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 38/13 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04019695 .8**

96 Fecha de presentación : **19.08.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1759700**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54

Título: **Uso de un inhibidor de PDE5 para tratar y prevenir trastornos hipopigmentarios.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.12.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.12.2009

73

Titular/es: **Switch Biotech, L.L.C.**
22 Lexington Drive
Conway, Arkansas 72034, US

72

Inventor/es: **Peuker, Heidemarie**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 330 934 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de un inhibidor de PDE5 para tratar y prevenir trastornos hipopigmentarios.

- 5 La invención se refiere al uso de los inhibidores de PDE5 tadalafilo o sildenafil, o de un isómero de los mismos, o de una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para tratar y/o prevenir trastornos hipopigmentarios seleccionados de vitíligo e hipopigmentación posinflamatoria.

Estado de la técnica

- 10 En la piel o el pelo, los melanocitos son la única fuente del pigmento melanina. La melanina se sintetiza dentro de los melanocitos y posteriormente se transfiere a los queratinocitos circundantes. El color de la piel se determina en gran parte por la cantidad y el tipo de melanina dentro de la epidermis. En general, la disfunción de los melanocitos o la pérdida de los propios melanocitos conducen a la pérdida de pigmentación. Es probable que los mecanismos
15 para la destrucción de los melanocitos sean múltiples y complejos, posiblemente un compuesto de varios procesos normales que influyen la función, proliferación y/o supervivencia de los melanocitos. Por tanto, el patomecanismo de los trastornos hiperpigmentarios está en buena parte poco claro.

- 20 El vitíligo, por ejemplo, es un trastorno de la pigmentación que afecta hasta el 2% de la población mundial. Es un tipo específico de leucoderma manifestado característicamente por la despigmentación de la epidermis, se describe mejor como un trastorno progresivo adquirido que destruye selectivamente algunos o todos los melanocitos. La enfermedad vitíligo se caracteriza por máculas blancas lechosas en la piel debidas tanto a la falta del pigmento melanina como a la completa ausencia de melanocitos en la unión dermo-epidérmica de áreas de vitíligo. El vitíligo tiende a ser progresivo durante la vida de los individuos afectados. Otros trastornos de la hipopigmentación que se producen
25 por un defecto en la producción o transferencia de melanina incluyen el síndrome de Chediak-Higashi, síndrome de Hermansky-Pudlak, los síndromes de Waardenburg I-IV, el síndrome de Angelman y de Prader-Willi. En cambio, el albinismo se caracteriza por defectos genéticos que impiden la síntesis de melanina. El piebaldismo se caracteriza por la ausencia de melanina al nacer debido a una deficiencia de melanocitos. Durante la embriogénesis, los melanocitos dejan de completar su migración de la cresta neural a la epidermis. En el vitíligo, algunos melanocitos pueden encontrarse en la epidermis de lesiones tempranas que sólo están parcialmente despigmentadas. En lesiones posteriores que se despigmentaron totalmente, hay una ausencia completa de melanocitos. Por tanto, hay una falta de conocimiento
30 sobre la patofisiología y los mecanismos que subyacen la mayoría de los trastornos pigmentarios.

En este momento todavía hay varias hipótesis para explicar las posibles causas del vitíligo:

- 35 1) Enfermedad autoinmunitaria: los autoanticuerpos específicos para antígenos de la superficie de células melanocíticas están presentes en la circulación de la mayoría de los pacientes con vitíligo. Estos anticuerpos son inusuales en personas con enfermedades de la piel no pigmentarias. Se muestra que los anticuerpos del vitíligo tienen la capacidad funcional de destruir células del pigmento *in vitro* y pueden hacerlo por dos
40 mecanismos diferentes: citotoxicidad dependiente del complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo.
- 2) Autodestrucción de melanocitos como consecuencia de biosíntesis de melanina anómala: la hipótesis auto-citotóxica se basa en la observación de que el fenol y alguno de sus derivados pueden destruir células del pigmento. La tirosina, el sustrato de la tirosinasa es por sí mismo un derivado del fenol, se oxida en mel-
45 anina mediante una compleja serie de reacciones oxidativas. Algunos productos intermedios pueden formar radicales. Se cree que la síntesis de melanina está confinada dentro del melanosoma para prevenir que estos precursores de la melanina difundan en la célula en la que pueden perturbar rutas metabólicas esenciales.
- 50 3) Sobreproducción de neurotransmisores que conduce a muerte de melanocitos: los melanocitos son células derivadas de la cresta neural. Una disfunción de la función nerviosa puede participar en la patogénesis del vitíligo como se muestra por un balance alterado de neuropéptidos en la piel vitiliginosa. Los neuropéptidos pueden inducir dendricidad de los melanocitos y participar en la regulación de la adhesión al sustrato celular, motilidad celular y forma. Los neuropéptidos también pueden regular la síntesis de melanina o
55 afectar la transferencia de melanosomas a queratinocitos circundantes.
- 4) Más recientemente también se trata que infecciones virales, además de estrés oxidativo y causas hormonales, participan en la formación de la enfermedad.
- 60 5) Aunque la patogénesis del vitíligo es todavía desconocida, hay una predisposición genética demostrada por el hecho de que el 40% de los pacientes con vitíligo tienen una historia familiar positiva para esta enfermedad.
- 6) Una combinación de alguna o todas las teorías anteriores.
- 65

Actualmente no existen tratamientos satisfactorios para trastornos pigmentarios. Por ejemplo, en la actualidad no hay terapia específica para el vitíligo disponible sin efectos secundarios y no están en desarrollo programas terapéuticos

innovadores. Ninguna terapia individual predecible produce buenos resultados en todos los pacientes y las respuestas son sumamente variables: la fotoquimioterapia sistémica (PUVA) da resultados satisfactorios solo en algunos estados de enfermedad tempranos, sin embargo, el tratamiento requiere tiempo y tiene un alto riesgo de desarrollar cáncer después de un tratamiento prolongado. Otras terapias comprenden esteroides sistémicos, por ejemplo prednisona, hidrocortisona o triamcinolona, que sin embargo tampoco son adecuados para un tratamiento prolongado. En algunos casos, el trasplante de piel ha dado resultados positivos. En casos extremos en los que el área despigmentada se ha vuelto muy grande se realiza la despigmentación química total de la piel para lograr una coloración homogénea de la piel.

Similarmente, no existe tratamiento específico y satisfactorio para la pitiriasis alba, una dermatitis hipopigmentada común que se produce principalmente en niños en edad escolar. Normalmente, este trastorno queda sin tratar ya que los tratamientos con corticosteroides o ácido retinoico o tratamiento con PUVA no son muy eficaces.

Algunos trastornos pigmentarios, como el vitíligo, sólo tienen manifestaciones en la piel limitadas a las alteraciones de la pigmentación. Sin embargo, estos trastornos representan no obstante graves problemas psicológicos para los pacientes ya que los bordes afilados de las áreas despigmentadas son fácilmente evidentes para otras personas, especialmente cuando se producen en la cara. El vitíligo puede ser desfigurante y estigmatizante, produciendo así problemas psicológicos significativos debido a la reducida aceptación social. Por tanto, el vitíligo normalmente persiste para el resto de la vida.

Por tanto, existe la necesidad de un tratamiento específico de trastornos hipopigmentarios, preferentemente el vitíligo.

El documento WO-A-03063875 desvela el uso de inhibidores de PDE5, que incluyen sildenafil y tadalafil, para el tratamiento o la prevención de fibrosis o cicatrización de la piel.

Divulgación de la presente invención

Sorprendentemente se encontró que los inhibidores de PDE5 son adecuados para el tratamiento y la prevención de trastornos hipopigmentarios, especialmente el vitíligo. Los inhibidores de PDE5 útiles en la presente invención son tadalafil y sildenafil.

La fosfodiesterasa 5 o PDE5 es un miembro de una superfamilia de enzimas hidrolizantes de nucleótidos cíclicos que escinde específicamente monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) que es un segundo mensajero. Los inhibidores de PDE5 se han propuesto originalmente por ser útiles en el tratamiento de hipertensión y angina, sin embargo, la atención principal es ahora su uso en el tratamiento de disfunción eréctil. Otras actividades sugeridas de los inhibidores de PDE5 son la inversión del vaciado gástrico, reducción de la tensión arterial e hipertensión pulmonar (véase Rotella D.P. 2001, *Drugs of the Future*, 26: 153-162). Nunca se ha propuesto que los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento y/o la prevención de trastornos hipopigmentarios.

Hasta ahora se conoce una gama de inhibidores de PDE5 con posibilidades de uso probadas o sugeridas como medicamento. Tales inhibidores de PDE5 son:

Derivados de dihidrotriazolohidropurinona que se desvelan en el documento WO 01/07441;

derivados de purinona que se describen en el documento WO 94/00453;

derivados de pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona que se describen en los documentos EP 0636626; WO 96/28429; WO 96/28448; WO 94/28902; US 5.294.612 y EP 0995751;

derivados de 1,6-dihidro-7H-pirazolo-[3,4-d]pirimidin-4-ona que se describen en los documentos EP 0201188; WO 88/00192; EP 0995750; EP 1057829; EP 1092720; WO 01/127101; WO 01/27112; WO 01/27113 y WO 00/27848;

derivados de imidazotriazinona que se describen en los documentos WO 99/24433, WO 99/67244; y EP 1092719;

derivados de imidazoquinazolinona que se describen en el documento WO 99/64004;

derivados de pirazolopiridopirimidina que se describen en Krupinski y col. 2001, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 2461-2464;

derivados de pirrolopirimidinona que se desvelan en el documento WO 01/60825;

derivados de quinazolinona y piridopirimidona que se desvelan en los documentos WO 93/12095 y WO 94/05661 y JP 8104679; JP 07330777 y JP 07267961;

derivados de pirimidina condensada que se desvelan en Lee y col. 1995, *J. Med. Chem.* 38: 3547-3557, documentos WO 98/06722, WO 02/26745; DE 19752952; WO 99/55708; DE 19943815; DE 19944604; Jonas y col. 2002, *Chem. Abstr.* 136: 85819; documentos WO 99/43674; WO 00/59912; WO 98/17668; WO 02/18389; US 5.436.233;

ES 2 330 934 T3

EP 728759; US 5.525.604; WO 93/07124; WO 96/26940; WO 95/06648; WO 98/08848; WO 99/43679; WO 99/43674; DE 19942474; WO 01/12608; WO 00/15222 y WO 02/20489;

derivados de pirimidina que se describen en los documentos WO 01/19802; WO 01/83460; WO 98/23597; EP 0640599, WO 96/05176, WO 98/07430, WO 99/42452, WO 01/05770 y WO 00/56719;

derivados de isoquinolina que se desvelan en los documentos WO 98/38168, WO 00/12503; EP 128462 y JP 12281654.

derivados de hexahidropirazino-pirido-indol-1,4-diona que se desvelan en los documentos WO 95/19978, WO 97/03675, US 6.143.746, WO 96/32003, WO 95/19978, WO 97/03985, WO 01/80860, WO 01/808686, WO 00/66114, WO 02/10166, WO 02/28858, WO 97/43287, US 6.306.870. US 6.043.252 y WO 01/87038;

derivados de diamida de ácido antranílico que se desvelan en los documentos WO 95/18097 y WO 99/54284,

derivados de piridocarbazolona que se describen en los documentos WO 98/53819, WO 99/26946, WO 00/32195 y WO 99/28319,

derivados de indol y bencimidazol que se desvelan en los documentos WO 96/32379, WO 99/51574, WO 98/15530, WO 97/24334, WO 99/00373, WO 00/39099, WO 99/00373, WO 00/34277, JP 101824549, WO 97/03070, WO 99/00350, WO 00/39099, WO 00/39097, WO 99/0372 y WO 99/21831,

derivados de pirazoloquinolina y pirazolopiridina que se desvelan en los documentos US 5.488.055 y WO 96/28159,

imidazopiridopirazinonas que se desvelan en los documentos WO 00/43392 y DE 19510965,

derivados de ftalimida de quinazolindiona que se desvelan en los documentos WO 01/44228 y WO 00/20412,

derivados de ciclobutenodiona que se desvelan en los documentos WO 00/51973, WO 00/63170, WO 00/63160 y WO 94/29277,

inhibidores de PDE1/5 duales que se desvelan en los documentos WO 91/19717 y WO 97/19947,

(véase Haning y col. Progress in Medicinal Chemistry, 2003, 41: 249-306 para una revisión sobre inhibidores de PDE5).

Los inhibidores de PDE5 para el uso según la presente invención incluyen: la pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona, sildenafililo, desvelada en el documento EP-A-0463756, y sales e hidratos de la misma.

Los inhibidores de PDE5 que puede usarse según la invención incluyen

(6R,12aR)-6-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-metil-12,3,4,6,7,12,12a-octa-hidropirazino[2',1':6,1]pirido[3,4-b]indol-1,4-diona (tadalafililo) y metilendioxfenil-pirazino[2',1':6,1]pirido[3,4-b]indol-1,4-diona; 4-etoxi-2-fenilcicloheptilimidazol; (6-bromo-3-metoximetilimidazo[1,2-a]pirazin-8-il)metilamina; 8-[(fenilmetil)tio]-4-(1-morfolinil)-2-(1-piperazinil)pirimidino[4,5-d]pirimidina; (+)-cis-5-metil-2-[4-(trifluorometil)bencil]-3,4,5,6a,7,8,9 5-metil-3,4,5,6a,7,8,9,9a-octahidrociclopent[4,5]imidazo[2,1-b]purin-4-ona; 5-[2-etoxi-5-(4-metil-1-piperazinilsulfonil)fenil]-1-metil-3-n-propil-1,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona (sildenafililo) y las sales farmacológicamente aceptables de estos compuestos.

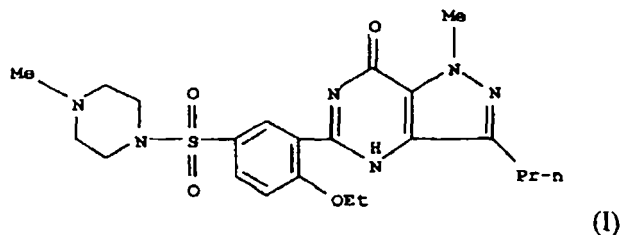
Los inhibidores de PDE5 preferidos incluyen:

5-[2-etoxi-5-(4-metil-1-piperazinilsulfonil)fenil]-1-metil-3-n-propil-1,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona (sildenafililo) también conocida como 1-[[3-(4,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-4-etoxifenil]sulfonil]-4-metilpiperazina (véase el documento EP-A-0463756); véase el Ejemplo 1 de la presente invención)

(6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-hexahidro-2-metil-6-(3,4-metilendioxfenil)-pirazino[2',1':6,1]pirido[3,4-b]indol-1,4-diona (tadalafililo; IC-351; véase el Ejemplo 2 de la presente solicitud), es decir, el compuesto de los ejemplos 78 y 95 de la solicitud internacional publicada WO95/19978, además del compuesto de los ejemplos 1, 3, 7 y 8 del documento WO95/19978;

ES 2 330 934 T3

Un inhibidor de PDE5 particularmente preferido de la presente invención es sildenafil, que tiene la siguiente estructura:

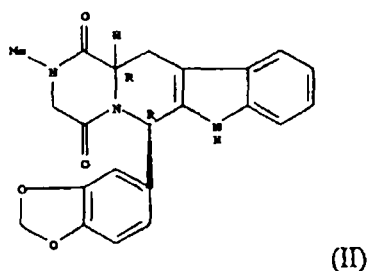


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en particular la sal citrato.

Nombres alternativos para el sildenafil son 5-[2-etoxi-5-(4-metil-1-piperazinilsulfonil)fenil]-1-metil-3-n-propil-1,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona y 1-[[3-(4,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-4-etoxifenil]sulfonil]-4-metil-piperazina. La síntesis del compuesto es muy conocida para un experto y se describe, por ejemplo, en el documento EP 0 463 756B1. El n° CAS es 139755-83-2.

La sal preferida de sildenafil que puede usarse según la invención es citrato de sildenafil.

El otro inhibidor de PDE5 particularmente preferido de la presente invención es tadalafil, que tiene la siguiente estructura:



Nombres alternativos para el tadalafil son pirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-b]indole-1,4-diona, 6-(1,3-benzodioxol-5-il)-2,3,6,7,12,12a-hexahidro-2-metil-, (6R,12aR)- y pirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-b]indol-1,4-diona, 6-(1,3-benzodioxol-5-il)-2,3,6,7,12,12a-hexahidro-2-metil-, (6R-trans)- y (6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-hexahidro-2-metil-6-(3,4-metilenedioxifenil)pirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-b]indol-1,4-diona y Cialis; GF 196960; IC 351 y ICOS 351. La síntesis del compuesto es muy conocida para un experto y se describe, por ejemplo, en el documento WO 95/19978. El n° de registro CAS es 171596-29-5.

La idoneidad de cualquier inhibidor de PDE5 particular puede determinarse fácilmente mediante la evaluación de su potencia y selectividad usando procedimientos bibliográficos seguida de una evaluación de su toxicidad, absorción, metabolismo, farmacocinética, etc., según la práctica farmacéutica habitual.

Preferentemente, los inhibidores de PDE5 tienen una CI_{50} inferior a 100 nanomolar, más preferentemente inferior a 50 nanomolar, todavía más preferentemente inferior a 10 nanomolar.

Los valores de CI_{50} para los inhibidores de PDE5 pueden determinarse usando metodología bibliográfica establecida, por ejemplo, como se describe en los documentos EP0463756 y EP0526004.

Preferentemente, los inhibidores de PDE5 usados en la invención son selectivos para la enzima PDE5. Preferentemente son selectivos respecto a PDE3, más preferentemente respecto a PDE3 y PDE4. Preferentemente, los inhibidores de PDE5 de la invención tienen una relación de selectividad superior a 100, más preferentemente superior a 300, respecto a PDE3 y más preferentemente respecto a PDE3 y PDE4. El término "tener una relación de selectividad para la enzima z superior a x ... respecto a la enzima y", como se usa en este documento, pretende designar que un compuesto/sustancia caracterizado por tal término tiene una preferencia superior a x veces por la enzima z que por la enzima y.

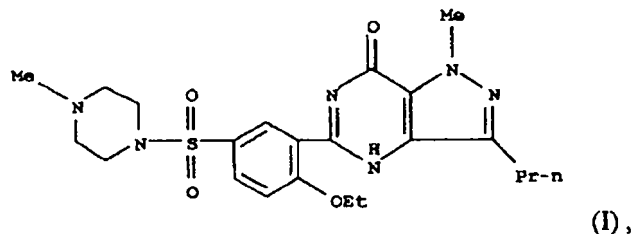
El experto puede determinar fácilmente las relaciones de selectividad. Los valores de CI_{50} para la enzima PDE3 y PDE4 pueden determinarse usando metodología bibliográfica establecida, véase S. A. Ballard y col., Journal of Urology, 1998, vol. 159, páginas 2164-2171.

Sorprendentemente, los inhibidores de PDE5, tales como sildenafil y tadalafil, pueden usarse para tratar trastornos hipopigmentarios, especialmente el vitíligo. Por tanto, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de

ES 2 330 934 T3

PDE5 seleccionado de sildenafil y tadalafil o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir trastornos hipopigmentarios seleccionados de vitíligo e hipopigmentación posinflamatoria, especialmente el vitíligo.

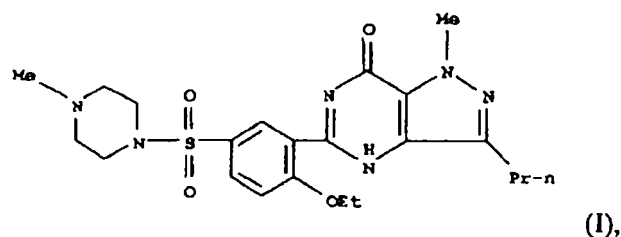
Sorprendentemente se encontró que compuestos según la fórmula (I):



o isómeros de los mismos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son útiles en el tratamiento y la prevención de trastornos hipopigmentarios, especialmente el vitíligo.

Además, sorprendentemente se encontró que un inhibidor de PDE5, especialmente el sildenafil, es especialmente adecuado para el tratamiento y la prevención de enfermedades hipopigmentarias que tienen un componente inflamatorio y/o autoinmunitario y/o en las que la activación y proliferación de células T desempeña una función, se prefiere especialmente el vitíligo. Tal componente inflamatorio y/o autoinmunitario puede formar parte de la enfermedad hipopigmentaria o puede estar además de la misma.

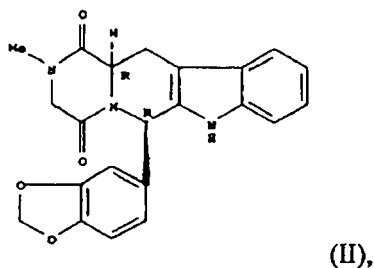
Por tanto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto según la fórmula (I):



o un isómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir trastornos hipopigmentarios seleccionados de vitíligo e hipopigmentación posinflamatoria, especialmente el vitíligo.

En una realización preferida, el compuesto es sildenafil o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en particular la sal citrato.

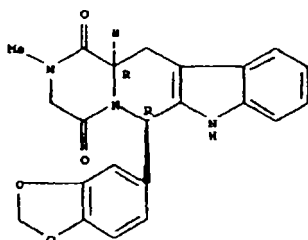
Sorprendentemente se encontró que compuestos según la fórmula (II)



o isómeros de los mismos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son útiles en el tratamiento y la prevención de trastornos hipopigmentarios, especialmente el vitíligo.

Además, sorprendentemente se encontró que un inhibidor de PDE5, especialmente el tadalafil, es especialmente adecuado para el tratamiento y la prevención de enfermedades hipopigmentarias que tienen un componente inflamatorio y/o autoinmunitario y/o en las que la activación y proliferación de células T desempeña una función, se prefiere especialmente el vitíligo. Tal componente inflamatorio y/o autoinmunitario puede formar parte de la enfermedad hipopigmentaria o puede estar además de la misma.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto según la fórmula (II):



(II),

o un isómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir trastornos hipopigmentarios seleccionados de vitíligo e hipopigmentación posinflamatoria, especialmente el vitíligo.

En una realización preferida, el compuesto es tadalafilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El trastorno hipopigmentario se selecciona de hipopigmentación posinflamatoria y vitíligo. En la realización más preferida, el trastorno hipopigmentario es el vitíligo.

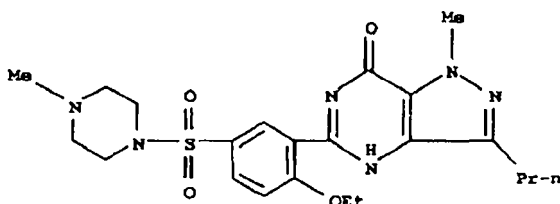
Los procedimientos de producción de los compuestos según la presente invención son muy conocidos para el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en el contenido de los documentos citados anteriormente.

Preferentemente, el medicamento según la presente invención se prepara en una forma adecuada para uso tópico, preferentemente en forma de una pomada, un gel, una escayola, una emulsión, una loción, una espuma, una crema, una crema de una fase mixta o sistema de emulsión anfifílico (fase mixta de aceite/agua-agua/aceite), un liposoma, un transfersoma, una pasta o un polvo, o una disolución o suspensión.

En una realización, el compuesto va a aplicarse tópicamente o sistémicamente o mediante una combinación de las dos vías, preferentemente tópicamente.

Los objetos de la presente invención también se resuelven mediante una composición que comprende un inhibidor de PDE5 que puede usarse según la invención y uno o más principios activos adicionales adecuados para el tratamiento y/o la prevención de trastornos hipopigmentarios. Preferentemente, tal composición se usa como un fármaco.

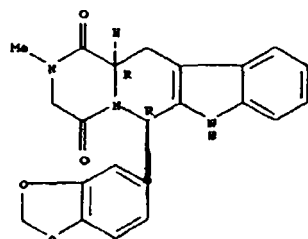
En una realización preferida, los objetos de la presente invención se resuelven mediante una composición que comprende un compuesto según la fórmula (I)



(I),

o un isómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más principios activos adicionales adecuados para el tratamiento y/o la prevención de trastornos hipopigmentarios.

En una realización preferida, los objetos de la presente invención también se resuelven mediante una composición que comprende un compuesto según la fórmula (II)



(II),

o un isómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más principios activos adicionales adecuados para el tratamiento y/o la prevención de trastornos hipopigmentarios. Preferentemente, tal composición se usa como un fármaco.

5 En una realización, el principio activo adicional se selecciona del grupo que está constituido por ciclosporina A, ciclosporina G, ciclosporina B, ciclosporina C, ciclosporina D, dihidro-ciclosporina D, ciclosporina E, ciclosporina F, ciclosporina H, ciclosporina I, ASM-240, pimecrolímús, tacrolímús, derivados de 13-desmetilo de tacrolímús (L-685487), L-683519 y/o derivados de 17-etilo de tacrolímús, preferentemente pimecrolímús, tacrolímús o ciclosporina A, lo más preferentemente tacrolímús; esteroides, en particular betametasona, 17-valerato de betametasona, fluocinolona, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, clobetasol, propionato de clobetasol, halobetasol, hidrocortisona, cortisona, desonida, prednisolona, parametasona, metilprednisolona, dexametasona, deflazacort; análogos de vitamina D, en particular calcipotriol; pseudocatalasa; levamisol, fluorouracilo; alfa-MSH; clofazimina; tiambutosina BP; cloroquina; penicilamina; brea; minoxidil; inosiplex; mecloretamina; ciclofosfamida; anapsos; antioxidantes como *Gingko biloba*, cantaxantina, beta-caroteno, alfa-tocoferol, una combinación de alfa-tocoferol, ubiquinona, seleno-metionina y metionina; pentoxifilina; vitaminas y oligoelementos, en particular vitamina B12, ácido fólico, vitamina C, vitamina E, sales de cobre, extracto de placenta humana, jelina y fenilalanina.

Preferentemente, la composición según la presente invención se formula para uso tópico, más preferentemente en forma de una pomada, un gel, una escayola, una emulsión, una loción, una espuma, una crema, una crema de una fase mixta o sistema de emulsión anfifílico (fase mixta aceite/agua-agua/aceite), un liposoma, un transfersoma, una pasta o un polvo, o una disolución o suspensión.

Los objetos de la presente invención se resuelven además mediante el uso de la composición según la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos hipopigmentarios seleccionados de vitíligo e hipopigmentación posinflamatoria.

Trastornos hipopigmentarios

Los trastornos hipopigmentarios son trastornos no malignos de la piel en mamíferos, incluyendo seres humanos, que se caracterizan por una disminución en la pigmentación de la piel en comparación con individuos sanos. Tal disminución en la pigmentación puede producirse localmente, como por ejemplo en formas leves de vitíligo, o puede afectar a toda la piel. Tal disminución en la pigmentación puede dar como resultado la pérdida total de pigmentación, como por ejemplo en áreas de la piel afectadas de pacientes con vitíligo, o puede dar como resultado una piel “más clara”, pero todavía pigmentada, como en la pitiriasis alba. Los trastornos hipopigmentarios pueden tener un componente inflamatorio y/o uno autoinmunitario. Como se usa en este documento, el término “tener un componente inflamatorio” pretende designar cualquier afección que va acompañada localmente o temporalmente de síndromes característicos de una reacción inflamatoria, tales como la inducción de ciertas citocinas, en particular IL-2R (sIL-2R), IL-6 y IL-8 soluble, y el aumento de los niveles de células inflamatorias, en particular células T y macrófagos, en sitios de lesiones o alrededor de lesiones. Tal componente inflamatorio y/o autoinmunitario puede formar parte del trastorno hipopigmentario o puede estar además del mismo.

El término “temporalmente acompañado” puede significar que el componente inflamatorio precede al trastorno hipopigmentario, es concomitante con el mismo o lo sigue.

El término “componente autoinmunitario” en un organismo pretende designar cualquier afección que se caracteriza por una reacción del propio sistema inmunitario del organismo contra el propio organismo o tejidos o células u otros componentes del mismo. Un ejemplo de una reacción tal es la producción de autoanticuerpos que son anticuerpos que están dirigidos a alguno de un tejido o célula del propio organismo u otros componentes corporales.

Ejemplos de trastornos hipopigmentarios son albinismo, vitíligo, hipopigmentación posinflamatoria, piebaldismo, pitiriasis alba, hipomelanos, leucodermas, hipopigmentación que se produce, por ejemplo, después de excoiaciones externamente inducidas, por ejemplo, excoiaciones químicas con fenol, o láser o criocirugía de la piel, síndrome de Chediak-Higashi, síndrome de Hermansky-Pudlak, el síndrome de Angelman y de Prader-Willi. Un trastorno hipopigmentario especialmente preferido de la presente invención es el vitíligo.

Ejemplos de trastornos hipopigmentarios en los que la activación y la proliferación de células T desempeñan una función son hipopigmentación posinflamatoria y vitíligo, preferentemente el vitíligo.

El tratamiento según la presente invención se refiere a la curación completa o parcial del trastorno hipopigmentario en mamíferos, incluyendo seres humanos, además de a la detención o ralentización de la progresión de un trastorno hipopigmentario. Por tanto, los compuestos de la presente invención son adecuados para la prevención de un trastorno hipopigmentario en mamíferos, incluyendo seres humanos.

El tratamiento de vitíligo según la presente invención se refiere a la curación completa o parcial del trastorno vitíligo; es decir, la repigmentación completa o parcial de máculas blancas existentes en pacientes con vitíligo, además de a la detención o ralentización de la extensión de las áreas de máculas blancas en pacientes con vitíligo. La prevención del vitíligo según la presente invención se refiere a la prevención de la aparición del fenotipo del vitíligo en personas sin afectar hasta la fecha. Preferentemente, tales personas sin afectar son personas con mayor riesgo de vitíligo; es decir, personas con una historia familiar de vitíligo.

*Composiciones farmacéuticas**Sales farmacéuticamente aceptables*

5 Ejemplos de sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, las sales de adición de ácido inorgánicas y orgánicas no tóxicas tales como el acetato derivado de ácido acético, el aconato derivado de ácido aconítico, el ascorbato derivado de ácido ascórbico, el benenosulfonato derivado de ácido benenosulfónico, el benzoato derivado de ácido benzoico, el cinamato derivado de ácido cinámico, el citrato derivado de ácido cítrico, el embonato derivado de ácido embónico, el enantato derivado de ácido enántico, el formiato derivado de ácido fórmico, el fumarato derivado de ácido fumárico, el glutamato derivado de ácido glutámico, el glicolato derivado de ácido glicólico, el clorhidrato derivado de ácido clorhídrico, el bromhidrato derivado de ácido bromhídrico, el lactato derivado de ácido láctico, el maleato derivado de ácido maleico, el malonato derivado de ácido malónico, el mandelato derivado de ácido mandélico, el metanosulfonato derivado de ácido metanosulfónico, el naftalen-2-sulfonato derivado de ácido naftalen-2-sulfónico, el nitrato derivado de ácido nítrico, el perclorato derivado de ácido perclórico, el fosfato derivado de ácido fosfórico, el ftalato derivado de ácido ftálico, el salicilato derivado de ácido salicílico, el sorbato derivado de ácido sórbico, el estearato derivado de ácido esteárico, el succinato derivado de ácido succínico, el sulfato derivado de ácido sulfúrico, el tartrato derivado de ácido tartárico y el tolueno-p-sulfonato derivado de ácido p-toluenosulfónico. Tales sales pueden formarse mediante procedimientos muy conocidos y descritos en la técnica.

20 Otros ácidos, tales como ácido oxálico, que no pueden considerarse farmacéuticamente aceptables pueden ser útiles en la preparación de sales útiles como productos intermedios en la obtención de un compuesto químico de la invención y su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

25 En otra realización, los compuestos de la invención se usan en su forma de base libre según la presente invención.

Las sales metálicas de un compuesto químico de la invención incluyen sales de metales alcalinos, tales como la sal de sodio de un compuesto químico de la invención que contiene un grupo carboxi.

30 Los compuestos químicos de la invención pueden proporcionarse en formas sin solvatar o solvatadas junto con un disolvente farmacéuticamente aceptable tal como agua y etanol. Las formas solvatadas también pueden incluir formas hidratadas tales como el monohidrato, el dihidrato, el semihidrato, el trihidrato y el tetrahidrato. En general, las formas solvatadas se consideran equivalentes a las formas sin solvatar para los fines de esta invención.

Administración y formulación

35 La producción de medicamentos que contienen los inhibidores de PDE5 de la invención, sus metabolitos activos o isómeros y las sales según la invención y su aplicación puede realizarse según procedimientos farmacéuticos muy conocidos.

40 Aunque los inhibidores de PDE5 de la invención que pueden usarse según la invención para uso en terapia pueden administrarse en forma de los compuestos químicos brutos, se prefiere introducir el principio activo, opcionalmente en forma de una sal fisiológicamente aceptable, en una composición farmacéutica junto con uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos, tampones, diluyentes y/u otros auxiliares farmacéuticos tradicionales. Tales sales de los inhibidores de PDE5 de la invención pueden ser anhidras o solvatadas.

45 En una realización preferida, la invención proporciona medicamentos que comprenden un compuesto que puede usarse según la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado del mismo, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para los mismos y, opcionalmente, otros componentes terapéuticos y/o profilácticos. El (Los) vehículo(s) deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de la formulación y no nocivos para el receptor de los mismos.

50 Los medicamentos de la invención pueden ser aquellos adecuados para administración por vía oral, rectal, bronquial, nasal, tópica, bucal, sublingual, transdérmica, vaginal o parenteral (incluyendo inyección o infusión cutánea, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intracerebral, intraocular), o aquellos en una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación, incluyendo polvos y administración de aerosol líquido, o mediante sistemas de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de sistemas de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el compuesto de la invención, matrices que pueden estar en forma de artículos moldeados, por ejemplo películas o microcápsulas.

60 Por tanto, los compuestos que pueden usarse según la invención, junto con un adyuvante, vehículo o diluyente convencional, puede ponerse en forma de un medicamento y dosificaciones unitarias del mismo. Tales formas incluyen sólidos, y en particular comprimidos, cápsulas rellenas, formas en polvo y gránulos, y líquidos, en particular disoluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones, elixires y cápsulas rellenas con los mismos, todas para uso oral, supositorios para administración rectal y disoluciones inyectables estériles para uso parenteral. Tal medicamento y formas farmacéuticas unitarias del mismo pueden comprender componentes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y tales formas farmacéuticas unitarias pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del principio activo acorde al intervalo de dosificación diario que va a emplearse.

ES 2 330 934 T3

El compuesto que puede usarse según la invención puede administrarse en una amplia variedad de formas farmacéuticas orales y parenterales. Será obvio para aquellos expertos en la materia que las siguientes formas farmacéuticas pueden comprender como componente activo cualquiera de un compuesto que puede usarse según la invención o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto que puede usarse según la invención.

Para preparar un medicamento a partir de un compuesto que puede usarse según la invención, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser o bien sólidos o bien líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar de diluyentes, aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes de disgregación de comprimidos, o un material de encapsulación.

En polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido. En los comprimidos, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Los vehículos adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión y manteca de cacao. El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulación como vehículo proporcionando una cápsula en la que el componente activo, con o sin vehículos, está rodeado por un vehículo que, por tanto, está en asociación con él. Similarmente están incluidos sellos y pastillas para chupar. Los comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, sellos y pastillas para chupar pueden usarse como formas sólidas adecuadas para administración por vía oral.

Para preparar supositorios, una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicérido de ácido graso o manteca de cacao, se funde primero y el componente activo se dispersa homogéneamente en ella, como mediante agitación. Entonces, la mezcla homogénea fundida se vierte en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y, por tanto, solidifica. Las composiciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que contienen, además del principio activo, tales vehículos como se conoce en la técnica que son apropiados. Las preparaciones líquidas incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, agua o disoluciones de agua-propilenglicol. Por ejemplo, las preparaciones líquidas para inyección parenteral pueden formularse como disoluciones en disolución acuosa de polietilenglicol.

Por tanto, el compuesto químico según la presente invención puede formularse para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua) y puede presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas previamente llenadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes de dosis múltiples con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo obtenido mediante aislamiento aséptico de sólido estéril o mediante liofilización de la disolución para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua sin pirógeno estéril, antes de uso.

Las disoluciones acuosas adecuadas para uso oral pueden prepararse disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes adecuados, aromas, estabilizantes y espesantes, según se desee. Las suspensiones acuosas adecuadas para uso oral pueden prepararse dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, u otros agentes de suspensión muy conocidos.

También se incluyen preparaciones en forma sólida que pretenden convertirse, poco antes de uso, en preparaciones en forma líquida para administración por vía oral. Tales formas líquidas incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromas, estabilizadores, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes y agentes solubilizantes.

En una realización de la presente invención, el medicamento va a aplicarse tópica o sistémicamente o mediante una combinación de las dos vías.

En una realización especialmente preferida de la presente invención, el medicamento va a aplicarse tópicamente. Esto reduce los posibles efectos secundarios y limita el tratamiento necesario a las áreas afectadas.

Preferentemente, el medicamento se prepara en forma de una pomada, un gel, una escayola, una emulsión, una loción, una espuma, una crema, una crema de una fase mixta o sistema de emulsión anfílico (fase mixta de aceite/agua-agua/aceite), un liposoma, un transfersoma, una pasta o un polvo.

Las pomadas y cremas pueden formularse, por ejemplo, con una base acuosa o aceitosa con la adición de agentes espesantes y/o de gelificación adecuados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa o aceitosa y en general también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes.

Para administración tópica, los compuestos de la presente invención pueden administrarse en una formulación que contiene del 0,001% al 10% en peso del compuesto, preferentemente entre el 0,01% y el 10% en peso del compuesto, incluso más preferido entre el 0,1% y el 5% en peso del compuesto.

ES 2 330 934 T3

Especialmente se prefieren formulaciones tópicas de compuestos de la invención, especialmente de tadalafilo y sildenafil y sales e hidratos de los mismos, especialmente en una emulsión O/W (emulsión aceite en agua) o crema. Por tanto, la invención también se refiere a una composición adecuada para uso tópico que comprende un compuesto de la invención seleccionado de tadalafilo y sildenafil o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Las composiciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el agente activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerol o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

Las disoluciones o suspensiones se aplican directamente a la fosa nasal mediante medios convencionales, por ejemplo, con un cuentagotas, pipeta o aerosol. Las composiciones pueden proporcionarse en forma de dosis única o dosis múltiples. En el caso anterior de un cuentagotas o pipeta, esto puede lograrse administrando al paciente un volumen predeterminado apropiado de la disolución o suspensión. En el caso de un aerosol, esto puede lograrse, por ejemplo, por medio de una bomba de aerosol atomizante dosificadora.

La administración a las vías respiratorias también puede lograrse por medio de una formulación de aerosol en la que el principio activo se proporciona en un envase presurizado con un propulsor adecuado tal como un clorofluorocarburo (CFC), por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado.

El aerosol también puede contener convenientemente un tensioactivo tal como lecitina. La dosis de fármaco puede controlarse proporcionando una válvula dosificadora.

Alternativamente, los principios activos pueden proporcionarse en forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto en una base en polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tales como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona (PVP). Convenientemente, el vehículo en polvo formará un gel en la fosa nasal. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos de, por ejemplo, gelatina, o envases alveolados de los que el polvo puede administrarse por medio de un inhalador.

En composiciones previstas para administración a las vías respiratorias, que incluyen composiciones intranasales, el compuesto tendrá generalmente un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo, del orden de 5 micrómetros o menos. Un tamaño de partícula tal puede obtenerse por medios conocidos en la técnica, por ejemplo mediante micronización.

Si se desea, pueden emplearse composiciones adaptadas para dar la liberación sostenida del principio activo.

Las preparaciones farmacéuticas están preferentemente en formas farmacéuticas unitarias. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma farmacéutica unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de la preparación, tales como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Por tanto, la forma farmacéutica unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello o pastilla para chupar, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estos en forma envasada. Las composiciones preferidas son los comprimidos o las cápsulas para administración por vía oral y los líquidos para administración intravenosa e infusión continua.

Más detalles sobre las técnicas para la formulación y administración pueden encontrarse en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co. Easton, Pa.).

También se desvela una composición que comprende un inhibidor de PDE5 que puede usarse según la invención o un isómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más principios activos adicionales que son conocidos por ser adecuados para el tratamiento y/o la prevención de trastornos hipopigmentarios, especialmente el vitíligo, tales como inhibidores de calcineurina, por ejemplo, ciclosporina A, ciclosporina G, ciclosporina B, ciclosporina C, ciclosporina D, dihidro-ciclosporina D, ciclosporina E, ciclosporina F, ciclosporina H, ciclosporina I, ASM-240, pimecrolímús, tacrolímús, derivados de 13-desmetilo de tacrolímús (L-685487), L-683519 y/o derivados de 17-etilo de tacrolímús, preferentemente pimecrolímús, tacrolímús o ciclosporina A, especialmente preferentemente tacrolímús, esteroide, por ejemplo betametasona, 17-valerato de betametasona, fluocinolona, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, clobetasol, propionato de clobetasol, halobetasol, hidrocortisona, cortisona, desonida, prednisolona, parametasona, metilprednisolona, dexametasona, deflazacort, análogos de vitamina D, especialmente calcipotriol, pseudocalcatalasa, u otros principios activos que fueron sugeridos para el tratamiento de vitíligo como levamisol, fluorouracilo, alfa-MSH, clofazimina, tiambutosina BP, cloroquina, penicilamina, brea, minoxidil, inosiplex, mecloretamina, ciclofosfamida, anapros, antioxidantes como *Ginkgo biloba*, cantaxantina, beta-caroteno, alfa-tocoferol, combinación de alfa-tocoferol, ubiquinona, seleno-metionina y metionina, pentoxifilina, vitaminas y oligoelementos como vitamina B12, ácido fólico, vitamina C, vitamina E, sales de cobre, extracto de placenta humana, jelina y fenilalanina.

En una realización especialmente preferida, un inhibidor de PDE5 que puede usarse según la invención o un isómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se combina con un compuesto seleccionado del grupo de pimecrolímús, tacrolímús y ciclosporina A. Especialmente se prefieren combinaciones de un inhibidor de PDE5 seleccionado de tadalafilo y sildenafil o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y un compuesto seleccionado del grupo de pimecrolímús, tacrolímús y ciclosporina A.

En otra realización, la invención se refiere al uso de una de las composiciones anteriormente mencionadas para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos hipopigmentarios seleccionados de vitíligo e hipopigmentación posinflamatoria, especialmente el vitíligo. Las mismas formas de administración que se tratan anteriormente para los inhibidores de PDE5 que pueden usarse según la invención, o un isómero de los mismos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos sola, son adecuadas para las composiciones, especialmente la aplicación tópica sobre lesiones para el tratamiento, o sobre piel sin afectar para la prevención. En otro aspecto de la presente invención, los principios activos se administran juntos o separados espacial y/o temporalmente.

También se desvelan tratamientos para trastornos hipopigmentarios, especialmente el vitíligo, que comprenden la administración de un medicamento que contiene inhibidores de PDE5 que pueden usarse según la invención, o un isómero de los mismos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos sola, y la administración de una o más formas de tratamiento adicionales que son conocidas por ser adecuadas para el tratamiento y/o la prevención de vitíligo. Las formas de tratamiento preferidas que pueden combinarse con el tratamiento con un medicamento que contiene inhibidores de PDE5 que pueden usarse según la invención, o un isómero de los mismos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos sola, y opcionalmente otras sustancias activas, son tratamiento con PUVA, tratamiento con KUVA, helioterapia, climatoterapia, especialmente en el mar Muerto, terapia de láser, por ejemplo, terapia de láser de baja energía, terapia de láser de dióxido de carbono ultrapulsado, terapia de láser de dióxido de carbono de pulsos cortos o terapia de láser de rubí, terapias quirúrgicas como miniinjerto, injerto epidérmico por succión, injertos dermo-epidérmicos, suspensiones epidérmicas, epidermis cultivada *in vivo* y suspensiones de melanocitos, o tratamiento con UVB.

Ensayos para probar los compuestos objeto

En general, las pruebas para medir el efecto sobre trastornos hipopigmentarios se describen en la técnica anterior. Por ejemplo, puede usarse un modelo *in vitro* que está constituido por queratinocitos y melanocitos. Por ejemplo, el modelo de piel MelanoDerm comercialmente disponible (MatTek Corporation, Ashland, Massachusetts) usa co-cultivos de NHEK (queratinocitos derivados de seres humanos normales)-NHEM (melanocitos derivados de seres humanos normales) (modelo de piel MelanoDerm) para modelar la epidermis humana teniendo en cuenta que los melanocitos dependen de la señalización de los queratinocitos. Los NHEK se cultivan en insertos de cultivo colocados sobre las monocapas de NHEM según las instrucciones del fabricante (MatTek Corporation, Ashland, Massachusetts). Los NHEM experimentan espontáneamente una melanogénesis hasta las 3 semanas de cultivo. Con respecto a la evaluación de los agentes farmacéuticos para estimular la pigmentación de la piel que se necesitan para tratar trastornos hipopigmentarios, los tejidos oscurecen más rápido que los controles sin tratar.

Otros ensayos *in vitro* para determinar el efecto de un compuesto objeto sobre trastornos hipopigmentarios son los ensayos *in vitro* basados en el análisis del contenido de melanina.

Los ensayos del análisis del contenido de melanina también se describen en la técnica anterior.

Por ejemplo, los melanocitos tratados y de control se recogen por tripsinización. Se elimina el diez por ciento de los melanocitos y se cuentan en un contador Coulter. El resto de los melanocitos se centrifuga y el sedimento de células resultante se lava en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, y se recentrifuga. Entonces, el sedimento de células se disuelve en 1 ml de hidróxido sódico 1 M. La densidad óptica de esta disolución se mide espectrofotométricamente a 405 nm y se compara con melanina sintética para determinar el contenido de melanina por célula. Un mayor contenido de melanina refleja una pigmentación potenciada.

Similarmente, el ensayo puede realizarse del siguiente modo: los melanocitos tratados y de control se recogen por tripsinización, se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se suspenden en 500 μ l de PBS y se cuentan. Entonces, las células se solubilizan añadiendo 500 μ l de NaOH 10 N e incubándolas durante 30 min a temperatura ambiente. Se mide la absorbancia a 475 nm y se compara con una curva patrón para melanina sintética.

Alternativamente puede usarse el ensayo de formación de 14 C-tirosina-melanina que mide la melanina radiactiva formada cuando la 14 C-tirosina se convierte en el biopolímero de melanina insoluble en ácido. Para este ensayo, extractos de células de células tratadas y de control se incuban con 14 C-tirosina durante 1 hora y se absorben sobre papel de filtro. El papel de filtro se seca, luego se lava tres veces en ácido clorhídrico 0,1 mol/l y se coloca en un vial de centelleo con 5 ml de disolución de centelleo. La radiactividad se cuenta por triplicado usando el mismo contador de centelleo.

Alternativamente, el efecto de un compuesto sobre un trastorno hipopigmentario puede determinarse midiendo la actividad de la tirosinasa, que se describe muy bien en la técnica anterior.

Por ejemplo, la actividad de la tirosinasa del cultivo celular puede determinarse: melanocitos tratados y de control se incuban con 1,0 μ Ci de [3 H]tirosina por ml. Se añaden 700 μ l de ácido tricloroacético al 10% que contiene 20% de carbón (disolución de carbón) al medio (700 μ l) y la mezcla se mezcla en una agitadora vorticial durante 30 s y luego se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 min. Setecientos microlitros del sobrenadante se transfieren a un nuevo tubo y se tratan dos veces con la disolución de carbón. La radiactividad del sobrenadante final se determina en un contador de centelleo líquido.

Alternativamente, la actividad de la tirosinasa puede determinarse en extractos de células. Por ejemplo, melanocitos tratados y de control se recogen y se lavan dos veces con PBS, y luego se lisan en tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,8) que contiene 1% de Triton X-100. Después de determinarse el contenido de proteína en el extracto de células, 10 µg de cada extracto se incuban en 100 µl de tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 6,8) que contiene 1,0 µCi de ³H]tirosina por ml, 5 µg de L-dihidroxifenilalanina y 1% de Triton X-100 durante 15 min a 37°C. Después de añadir 900 µl de disolución de carbón, las muestras se dejan reposar durante 20 min a 4°C y luego se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se aplican a una columna Dowex-50 de 0,2 ml equilibrada en ácido tricloroacético al 10% y se lava con 0,5 ml de ácido tricloroacético al 10%, después de lo cual se determina la radiactividad de los efluentes en el contador de centelleo líquido.

Por tanto, existen algunos modelos animales de predictabilidad e idoneidad variables. Una evaluación de la idoneidad de diversos modelos animales de vitiligo se describe en Vitiligo (eds. S. Hann y J. J. Nordlund, Blackwell Science, capítulo 33: Animal models de L. Lamoreux y R. E. Boissy).

Por ejemplo, el pollo Smyth que presenta una forma genéticamente heredada de despigmentación similar a vitiligo resultante de la pérdida de melanocitos en las plumas se trata como un modelo de vitiligo. El fenotipo de pigmentación de este modelo animal parece implicar una respuesta inmunitaria. También se describe el llamado ratón de vitiligo. En este modelo no participa ningún componente inmunitario y el trastorno no es polifactorial; es decir, a diferencia de en seres humanos.

El vitiligo, por ejemplo, no es una enfermedad simple de un locus y la herencia no es su única causa. Por tanto, en el caso de vitiligo deben usarse modelos animales con el conocimiento de que el trastorno observado en el animal genéticamente defectuoso no será homólogo al trastorno del paciente con vitiligo humano promedio. Por tanto, el estudio de un modelo animal, especialmente si el defecto se produce por un locus de gen en el modelo, necesita ser más predictivo que un modelo *in vitro*.

Ninguna de las pruebas anteriormente mencionadas ha demostrado ser particularmente útil por sí misma cuando se trata de identificar compuestos útiles en el tratamiento y/o la prevención de trastornos hipopigmentarios, dado que no se conocen muchos compuestos que tienen un efecto positivo pronunciado sobre la aparición de trastornos hipopigmentarios. Esta deficiencia de la técnica anterior se ha vencido ahora porque los presentes inventores han encontrado que sorprendentemente los inhibidores de PDE5 que pueden usarse según la invención o un isómero de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, como se definen anteriormente, proporcionan compuestos que tienen un efecto beneficioso sobre trastornos hipopigmentarios, especialmente sobre vitiligo. Por tanto, también se desvela el uso de inhibidores de PDE5 que pueden usarse según la invención o un isómero de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, como se definen anteriormente, en un ensayo de cribado de compuestos que son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de trastornos hipopigmentarios. Tal ensayo de cribado puede ser un modelo *in vitro* constituido por un cocultivo de queratinocitos y melanocitos como se describe anteriormente. El ensayo de cribado también puede ser un ensayo *in vitro* basado en el análisis del contenido de melanina, como se describe anteriormente. Alternativamente, el ensayo de cribado puede basarse en la medición de la actividad de la tirosinasa, como se describe anteriormente, o en un modelo animal, como se describe anteriormente.

En todos estos ensayos de cribado, los inhibidores de PDE5 que pueden usarse según la invención o un isómero de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, sirven de controles positivos porque inhiben/previene la aparición de trastornos hipopigmentarios, especialmente vitiligo, y la respuesta del sistema de ensayo hacia estos controles se compara con la respuesta del sistema de ensayo hacia un compuesto objeto que va a probarse.

Los aspectos adicionales de la presente invención serán evidentes por las figuras y los siguientes ejemplos que se facilitan para simplemente ilustrar la invención.

La Figura 1 muestra la influencia de sildenafil sobre la formación de dendritas en melanocitos en un ensayo de excrecencia de dendritas de melanocitos descrito a continuación. El control positivo es IBMX, es decir, 3-isobutil-1-metilxantina, un compuesto conocido por aumentar la dendricidad de los melanocitos. La dendricidad de los melanocitos sin tratar se fijó como 1 en cada experimento.

Ejemplos

Ejemplo 1

Efecto de sildenafil sobre la función de los melanocitos

El ensayo de excrecencia de dendritas de melanocitos puede realizarse como una posibilidad de probar el efecto de un compuesto sobre la función de los melanocitos como una medida de la pigmentación. Por ejemplo, los melanocitos del vitiligo sólo tienen dendritas pequeñas y gruesas. El aumentar la dendricidad como requisito previo para la transferencia de los melanosomas de los melanocitos a los queratinocitos circundantes salva este defecto.

Para este ensayo, células de una línea de células de melanoma humano (Mel-Ho) se obtuvieron de DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) y se cultivaron según el protocolo proporcionado por

ES 2 330 934 T3

5 DSMZ. En resumen, después de descongelar los melanocitos se cultivaron en matraces T-75 en medio de cultivo de melanocitos (proporcionado por el fabricante) hasta que alcanzaron el 70-80% de confluencia. Entonces, los melanocitos se tripsinizaron, se transfirieron a 5-10 matrices T-75 nuevos y se cultivaron de nuevo hasta la misma confluencia como se describe anteriormente. Después de esta etapa de expansión, los melanocitos se usaron inmediatamente para el ensayo de excrecencia de dendritas de melanocitos o se congelaron para uso posterior.

10 Para el ensayo, los melanocitos se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de $1-5 \times 10^4$ células/pocillo. Después de 24 horas, los melanocitos se trataron con IBMX $100 \mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich) o diferentes concentraciones de sildenafil y tadalafil durante 24 horas. La IBMX ($\equiv$ 3-isobutil-1-metilxantina) es conocida por producir un aumento de la dendricidad de los melanocitos y se usó como control positivo. Las células tratadas con medio sólo se usaron como control negativo. La excrecencia de dendritas de melanocitos se documentó mediante fotografía digital (Canon G2 Powershot) después de 3, 6 y 24 horas. Además, la dendricidad de los melanocitos fue puntuada por 3 individuos a ciegas después de 24 horas. La puntuación oscila de 1 a 4; representando 1 melanocitos sin dendritas y representando 4 melanocitos con muchas dendritas largas y ramificadas. El resultado de la puntuación de 3 experimentos individuales realizados con sildenafil se muestra en la Figura 1. La Figura 1 muestra el control negativo tratado sólo con medio, presentando una puntuación de 1, mientras que en el control positivo, es decir, células tratadas con IBMX, la puntuación alcanzada es >3 . Sorprendentemente se encontró que en las células tratadas con sildenafil la dendricidad también estaba fuertemente estimulada (puntuación >3). Se usó sildenafil $10 \mu\text{M}$ para obtener una puntuación de >3 , sin embargo, también eran suficientes concentraciones más bajas (inferiores a 10 nM) de sildenafil para inducir la formación de dendritas.

Ejemplo 2

25 *Efecto de tadalafil sobre la función de los melanocitos*

El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 1, pero usando tadalafil como componente activo. Los resultados obtenidos para tadalafil fueron muy similares a los resultados obtenidos con sildenafil.

30 Se encontró que el tadalafil también induce eficazmente la dendricidad en melanocitos lo que demuestra la buena idoneidad de los compuestos que pueden usarse según la invención para tratar y/o prevenir trastornos hipopigmentarios, especialmente el vitíligo.

35 En resumen, la dendricidad fuertemente aumentada inducida por sildenafil y tadalafil demuestra la buena idoneidad de los compuestos que pueden usarse según la invención para tratar y/o prevenir trastornos hipopigmentarios, especialmente el vitíligo.

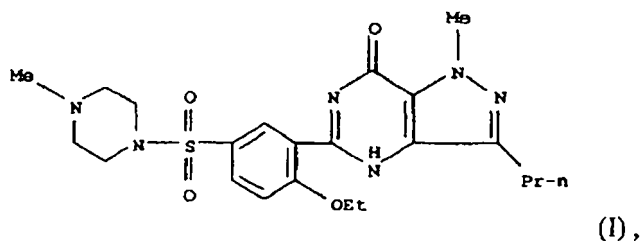
Ejemplo 3

40 *Efecto de inhibidores de PDE5 sobre la pigmentación in vitro*

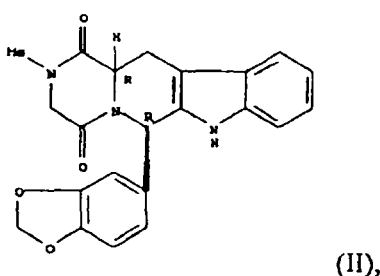
Con el fin de probar el efecto de los inhibidores de PDE5 sobre la pigmentación se usa un modelo *in vitro* constituido por queratinocitos y melanocitos, concretamente el modelo de piel MelanoDerm comercialmente disponible (MatTek Corporation, Ashland, Massachusetts). Este modelo usa cocultivos de NHEK (queratinocitos derivados de seres humanos normales)-NHEM (melanocitos derivados de seres humanos normales) (modelo de piel MelanoDerm) para modelar la epidermis humana teniendo en cuenta que los melanocitos dependen de la señalización de los queratinocitos. Los NHEK se cultivan en insertos de cultivo colocados sobre las monocapas de NHEM según las instrucciones del fabricante (MatTek Corporation, Ashland, Massachusetts). Los NHEM experimentan espontáneamente una melanogénesis hasta las 3 semanas de cultivo. Con respecto a la evaluación de los agentes farmacéuticos para estimular la pigmentación de la piel que se necesitan para tratar trastornos hipopigmentarios, los tejidos oscurecen más rápido que los controles sin tratar. Se espera que tanto el sildenafil como el tadalafil induzcan pigmentación en ese modelo en comparación con los controles negativos.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto según la fórmula (I)



o un isómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un compuesto según la fórmula (II):



o un isómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir trastornos hipopigmentarios, en el que el trastorno hipopigmentario se selecciona de vitíligo e hipopigmentación posinflamatoria.

2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el compuesto va a aplicarse tópica o sistémicamente o mediante una combinación de las dos vías, preferente tópicamente.

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, **caracterizado** porque el medicamento se prepara en forma de una pomada, un gel, una escayola, una emulsión, una loción, una espuma, una crema de una fase mixta o sistema de emulsión anfifílico (fase mixta aceite/agua-agua/aceite), un liposoma, un transfersoma, una pasta o un polvo, o una disolución o suspensión.

4. Uso de una composición que comprende un inhibidor de PDE5 seleccionado de sildenafil y tadalafil o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y uno o más principios activos adicionales seleccionados de pimecrolímús, tacrolímús y ciclosporina A, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos hipopigmentarios seleccionados de vitíligo e hipopigmentación posinflamatoria.

5. Uso según la reivindicación 4, en el que dicha composición está formulada para uso tópico.

Figura 1

