



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 734**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/4436 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04740209 .4**

96 Fecha de presentación : **23.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1635808**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

54

Título: **Uso tópico de ácido valproico para la prevención o el tratamiento de psoriasis y acné.**

30

Prioridad: **25.06.2003 EP 03014278**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2009

73

Titular/es: **TopoTarget Germany AG.**
Paul-Ehrlich-Strasse 42-44
60596 Frankfurt am Main, DE

72

Inventor/es: **Pelicci, Pier Giuseppe;**
Chimenti, Sergio;
Costanzo, Antonio;
Nistico, Steven Paul;
Paolino, Donatella y
Minucci, Saverio

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 310 734 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 tópico de ácido valproico para la prevención o el tratamiento de psoriasis y acné.

5 Se describe aquí una formulación aplicable tópicamente que contiene ácido valproico o sales del mismo, que puede usarse sola o en combinación con formulaciones aplicables tópicamente de retinoides o de ligandos de receptores nucleares, o de agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-fluorouracilo) para el tratamiento tópico de psoriasis y acné. La invención incluye la fabricación de un medicamento usado clínicamente para el tratamiento tópico de las enfermedades humanas listadas antes.

10 **Fundamento de la invención**

Regulación de cromatina y cáncer

15 La remodelación local de cromatina es una etapa clave en la activación transcripcional de genes. Deben tener lugar cambios dinámicos en el empaquetado nucleosómico de ADN para permitir que proteínas transcripcionales tomen contacto con la plantilla de ADN. Uno de los mecanismos más importantes que influyen en la remodelación de cromatina y la transcripción de genes es la modificación post-traducción de histonas y otras proteínas celulares por acetilación y cambios subsiguientes en la estructura de cromatina (Davie, 1998, *Curr Opin Genet Dev* 8, 173-8; Kouzarides, 1999, *Curr Opin Genet Dev* 9, 40-8; Strahl y Allis, 2000, *Nature* 403: 41-4). En el caso de la hiperacetilación de histona, cambios de la atracción electrostática para ADN e impedimento estérico introducido por el grupo acetilo hidrófobo conducen a desestabilización de la interacción de histonas con ADN. Como resultado, la acetilación de histonas rompe nucleosomas y permite que se haga accesible el ADN a la maquinaria transcripcional. La separación de los grupos acetilo permite que las histonas se unan más estrechamente a ADN y los nucleosomas adyacentes, y así, a mantener una estructura de cromatina reprimida transcripcionalmente. La acetilación es mediada por una serie de enzimas con actividad de histona acetiltransferasa (HAT). A la inversa, se separan grupos acetilo por enzimas histona desacetilasa (HDAC) específicas. La rotura de estos mecanismos da lugar a regulación defectuosa transcripcional y puede contribuir a transformación tumorigénica y progresión de tumores.

30 Adicionalmente, otras moléculas tales como factores de transcripción alteran su actividad y estabilidad dependiendo de su estado de acetilación. Por ejemplo, PML-RAR, la proteína de fusión asociada con leucemia promielocítica aguda (APL) inhibe p53 mediando en la desacetilación y degradación de p53, permitiendo así a APL destruirse para evadir las trayectorias de vigilancia del cáncer dependientes de p53. La expresión de PML-RAR en células precursoras hematopoyéticas produce represión de la activación transcripcional mediada por p53, y protección de la apoptosis dependiente de p53 iniciada por tensiones genotóxicas (rayos X, tensión oxidativa). Sin embargo, la función de p53 se reinstala en presencia de inhibidores de HDAC que implican reclutamiento activo de HDAC a p53 por PML-RAR, como el mecanismo que subyace a la inhibición de p53 (Insinga *et al.*, 2003, manuscrito sometido). Por tanto, la acetilación de proteínas distintas de histonas, tal como la acetilación de p53, juega un papel crucial en la actividad anti-tumores de inhibidores de HDAC.

40 *Receptores nucleares e histona desacetilasas*

Los receptores de hormonas nucleares son factores de transcripción dependientes de ligando que controlan el desarrollo y homeostasis mediante control positivo y negativo de la expresión de genes. Defectos en estos procesos reguladores subyacen a las causas de muchas enfermedades y juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer. Muchos receptores nucleares, incluyendo T3R, RAR y PPAR, pueden interactuar con co-represores, tales como N-CoR y SMRT, en ausencia de ligando, e inhibir por ello la transcripción. Además, también se ha informado de que N-CoR interactúa con progesterona ocupada por antagonista y receptores de estrógeno. De manera más interesante, se ha mostrado que N-CoR y SMRT existen en grandes complejos de proteínas, que contienen también proteínas mSin3 e histona desacetilasas (Pazin y Kadonaga, 1997; *Cell* 89, 325-8). Así, el cambio inducido por ligando de receptores nucleares de represión a activación refleja el intercambio de complejos co-represores y coactivadores con actividades enzimáticas antagonistas.

55 *Regulación de genes por receptores nucleares*

Tales complejos co-represores que contienen actividad de HDAC no sólo median en la represión por receptores nucleares, sino que también interactúan con factores de transcripción adicionales incluyendo Mad-1, BCL-6 y ETO. Muchas de estas proteínas juegan papeles clave en trastornos de proliferación y diferenciación de células (Pazin y Kadonaga, 1997, *Cell* 89, 325-8; Huynh y Bardwell, 1998, *Oncogene* 17, 2473-84; Wang J. *et al.*, 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10860-5). T3R por ejemplo se identificó originalmente sobre la base de su homología con el oncogen vírico v-erbA, que, en contraste con el receptor de tipo natural no se une a ligando y funciona como un represor de la transcripción constitutivo. Además, se han asociado mutaciones en RARs con un cierto número de cánceres humanos, particularmente leucemia promielocítica aguda (APL) y carcinoma hepatocelular. En pacientes con APL, las proteínas de fusión de RAR resultantes de traslocaciones cromosómicas implican la proteína de leucemia promielocítica (PML) o la proteína de dedo de zinc promielocítica (PLZF). Aunque ambas proteínas de fusión pueden interactuar con componentes del complejo co-represor, la adición de ácido retinoico descarta al complejo co-represor de PML-RAR, mientras que PLZF-RAR interactúa constitutivamente. Estos hallazgos proporcionan una explicación de por qué pacientes con PML-RAR APL consiguen una remisión completa tras el tratamiento con ácido retinoico,

ES 2 310 734 T3

mientras que pacientes con PLZF-RAR APL responden muy mal (Grignani *et al.*, 1998, Nature 391, 815-8; Guidez *et al.*, 1998, Blood 91, 2634-42; He *et al.*, 1998, Nat Genet 18, 126-35; Lin *et al.*, 1998, Nature 391, 811-4).

5 Recientemente, un paciente con PML-RAR que había experimentado recaídas múltiples después del tratamiento con ácido retonoico se ha tratado hace poco con el inhibidor de HDAC fenilbutirato, produciendo una remisión completa de la leucemia (Warrell *et al.*, 1998, J. Natl. Cancer Inst. 90, 1621-1625).

Terapia anti-cáncer con inhibidores de HDAC

10 Se han iniciado recientemente investigaciones clínicas adicionales para explotar el tratamiento clínico sistémico de pacientes con cáncer con el principio de inhibición de HDAC. Hasta ahora, se ha completado una prueba de fase II clínica con el derivado de ácido butírico estrechamente relacionado Pivanex (Titan Pharmaceuticals) como monoterapia, demostrando actividad en el cáncer de pulmón de células no pequeñas de fase III/IV (Keer *et al.*, 2002, ASCO, Abstract. No. 1253). Se han identificado más inhibidores de HDAC, siendo NVP-LAQ824 (Novartis) y SAHA
15 (Aton Pharma Inc.) miembros de la clase estructural de ácidos hidroxámicos ensayados en pruebas clínicas de fase II (Marks *et al.*, 2001, Nature Reviews Cancer 1, 194-202). Otra clase comprende tetrapéptidos cíclicos, tales como depsipéptido (FR901228 - Fujisawa) usado con éxito en una prueba de fase II para el tratamiento de linfomas de células T (Piekarz *et al.*, 2001, Blood 98, 2865-8). Además, está siendo ensayado ahora MS-27-275 (Mitsui Pharmaceuticals), un compuesto relacionado con la clase de benzamidas, en una prueba de fase I tratando pacientes con malignidades
20 hematológicas.

La familia de proteínas de histona desacetilasas

25 Las histona desacetilasas de mamífero pueden dividirse en tres subclases (Gray y Ekström, 2001). HDACs 1, 2, 3 y 8, que son homólogas de la proteína RPD3 de levadura constituyen la clase I. HDACs 4, 5, 6, 7, 9 y 10 están relacionadas con la proteína Hda 1 de levadura y forman la clase II. Recientemente, se han identificado varias homólogas de mamífero de la proteína Sir2 de levadura, que forman una tercera clase de desacetilasas que son dependientes de NAD. Todas estas HDACs parecen existir en la célula como subunidades de una plétora de complejos multiproteínas. En particular, las HDACs de clase I y II han mostrado interactuar con los co-represores transcripcionales mSin3, N-CoR y
30 SMR-T, que sirven como factores de puenteo requeridos para el reclutamiento de HDACs a factores de transcripción.

Ácido valproico

35 El ácido valproico (VPA; ácido 2-propilpentanoico) tiene múltiples actividades biológicas que dependen de diferentes mecanismos moleculares de acción:

- VPA es un fármaco antiepiléptico.
- 40 - VPA es teratógeno. Cuando se usa como fármaco antiepiléptico durante el embarazo, VPA puede inducir defectos en el parto (defectos de cierre del tubo neural y otras malformaciones) en un pequeño porcentaje de niños nacidos. En ratones, el VPA es teratógeno en la mayoría de embriones de ratones cuando se dosifica apropiadamente.
- 45 - VPA activa un receptor de hormonas nucleares (PPAR δ). También son desreprimidos varios factores de transcripción adicionales pero algunos factores no son desreprimidos significativamente (receptor de glucocorticoides, PPAR α).
- VPA causa ocasionalmente hepatotoxicidad, que puede depender de ésteres escasamente metabolizados con coenzima A.
- 50 - VPA es un inhibidor de HDACs.

55 El uso de derivados de VPA permitió determinar que las diferentes actividades son mediadas por mecanismos moleculares de acción diferentes. La teratogenicidad y la actividad antiepiléptica siguen modos de acción diferentes porque podían aislarse compuestos que eran preferentemente teratógenos o preferentemente antiepilépticos (Nau *et al.*, 1991, Pharmacol. Toxicol. 69, 310-321). Se encontró que la activación de PPAR δ estaba correlacionada estrictamente con la teratogenicidad (Lampen *et al.*, 1999, Toxicol. Appl. Pharmacol. 160, 238-249) sugiriendo que ambas, la activación de PPAR δ y la teratogenicidad, requieren la misma actividad molecular de VPA. También, la diferenciación
60 de células F9 se correlaciona estrictamente con activación de PPAR δ y teratogenicidad como se sugiere por Lampen *et al.*, 1999, y se documenta por el análisis de marcadores de diferenciación (Werling *et al.*, 2001, Mol. Pharmacol. 59, 1269-1276). Se mostró que la activación de PPAR δ es causada por la actividad inhibitoria de HDAC de VPA y sus derivados (documento PCT/EP01/07704; documento WO 03/024442 A2). Además, se mostró que el inhibidor de HDAC establecido TSA activa PPAR δ e induce el mismo tipo de diferenciación de células F9 que VPA. De estos resultados puede concluirse que no sólo la activación de PPAR δ , sino también la inducción de la diferenciación de
65 células F9 y la teratogenicidad de VPA o derivados de VPA son causadas por inhibición de HDAC.

El documento WO 98/40078 A1 proporciona un método para aumentar la actividad terapéutica de un compuesto que contiene oxalquileno, ácido butírico, una sal de ácido butírico o un derivado de ácido butírico, administrando un inhibidor de β -oxidación de ácidos grasos a un paciente o a células hospedantes. El documento EP 1 293 205 A1 describe el uso del fármaco ácido valproico y derivados del mismo para el tratamiento terapéutico de cánceres humanos en combinación con principios terapéuticos establecidos. El documento EP 1 170 008 A1 se refiere al uso de ácido valproico y derivados del mismo como inhibidor de histona desacetilasas. El documento WO 02/13766 A2 describe un método para el tratamiento o prevención de dolor y/o dolor de cabeza usando un derivado de una amida de ácido valproico o una amida de ácido 2-valproónico, así como composiciones farmacéuticas que comprenden estos derivados o compuestos. El documento WO 02/07677 A2 describe el uso de derivados de amidas de ácido valproico y ácido 2-valproónico para el tratamiento de manía en trastorno bipolar. El documento WO 97/18803 A1 describe el uso de derivados de ácidos carboxílicos alifáticos en trastornos oftálmicos. La publicación de la solicitud de patente de los EE.UU. N° US 2002/015616 A1 describe un método para tratar cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente un agente regulador del potencial de membrana en una cantidad eficaz para hiperpolarizar células malignas. El documento WO 02/49603 A1 describe una composición tópica para prevención y alivio de arrugamiento que comprende al menos un compuesto seleccionado entre fenitoína, ácido valproico, ciclosporina A, nifedipina, diltiazem, HCl de verapamilo y amolodipina como ingrediente activo que tiene un efecto de refuerzo de la síntesis de colágeno.

Las actividades antiepiléptica y sedante siguen diferentes relaciones de actividad estructural y dependen así obviamente de una actividad de VPA primaria distinta de la inhibición de HDAC. El mecanismo de hepatotoxicidad se entiende mal, y no se sabe si está asociado con formación del éster VPA-CoA. La inhibición de HDAC, no obstante, no parece requerir formación de éster de CoA.

Ácido retinoico

El ácido retinoico (RA) pertenece a una clase de compuestos conocidos como retinoides incluidos, aunque sin limitarse a ellos, 9-*cis* RA, *trans* RA, all-*trans* RA, tazaratona (Guenther, 2003, Am. J. Clin. Dermatol. 4, 197-202; Peris K *et al.*, 1999, N Engl J Med 341, 1767-1768), que juegan papeles clave en la regulación de la transcripción de genes y, por tanto, gobiernan funciones múltiples en el cuerpo, tal como división y diferenciación de células, respuesta inmune y desarrollo embrionario. Controlan también el desarrollo y extensión de células de cáncer y algunos, incluyendo RA, pueden inhibir el crecimiento de tumores previniendo la proliferación de células de cáncer (Altucci y Gronemeyer, 2001, Nature Reviews Cancer 1, 181-193).

Los efectos de los retinoides son mediados principalmente por dos clases de receptores nucleares, los receptores de RA (RARs) y los receptores de retinoide X (RXRs) (Zhang & Pfahl 1993, Kastner *et al.* 1995, Mangelsdorf & Evans 1995). Los RARs y RXRs son codificados por tres genes distintos (α , β y γ). Además, se generan muchas isoformas de receptores de retinoides mediante el uso de promotor diferencial, dando lugar a un gran número de proteínas de receptores de retinoides distintas. Hasta la fecha, hay docenas de receptores de los que se sabe que median en el efecto de retinoides. 9-*cis* RA es un ligando de alta afinidad para RARs y RXRs, mientras que *trans*-RA es un ligando para sólo RARs. Los receptores de retinoides pertenecen a una gran superfamilia de receptores de esteroides/tiroides que media en los efectos biológicos de muchas hormonas, vitaminas y fármacos. Los RARs y RXRs actúan como factores transcripcionales para regular positiva o negativamente la expresión de genes objetivo uniéndose a sus elementos de respuesta (RAREs) situados en regiones de promotor de los genes objetivo de una estructura de cromatina activa y produce la transcripción de genes objetivo. Además de sus efectos directos en la transcripción, el RAR unido a ligando puede modular la actividad de otros factores transcripcionales, tales como AP-1 (Pfahl 1993). Los receptores de retinoides activados pueden inhibir la actividad de AP-1, regulando por ello la expresión de genes objetivo de AP-1. La inhibición de la actividad de AP-1 está enlazada a los efectos anti-proliferativos de retinoides, y parece ser separable de su activación directa de transcripción de genes con objetivo retinoide.

Durante algún tiempo, los médicos han usado derivados de RA para tratar varios cánceres, particularmente cáncer de próstata y leucemia, y están experimentando ahora con el fármaco para tratar cáncer de pecho. Un tratamiento típico con RA busca activar RAR con el fin de conectar genes favorables. El gran inconveniente para RA, no obstante, es que requiere altos niveles de medicación con el fin de “conectar” y “desconectar” genes, provocando a menudo devastación y efectos secundarios potencialmente fatales (Altucci y Gronemeyer, 2001, Natural Reviews Cancer 1, 181-193).

RA u otros retinoides tales como tazaroteno (Guenther, 2003, Am. J. Clin. Dermatol. 4, 197-202) pueden usarse también tópicamente para el tratamiento de acné de suave a moderado y piel con daños por el sol (fotoenvejecida). Los retinoides se han usado incluso para tratar ciertos cánceres de piel, tales como el carcinoma de células basales (Peris K *et al.*, 1999, N Engl J Med 341, 1767-1768). Después de administración tópica, RA parece aumentar la rapidez de división celular y renovación. Disminuye el número de capas de células en la porción exterior de la piel. Cuando están presentes granos, se reducen más rápidamente. El RA tópico es eficaz para reducir el arrugamiento fino, hiperpigmentación moteada y rugosidad asociada con sobreexposición al sol. Los resultados del tratamiento no son inmediatos y pueden ser visibles sólo después de semanas a meses. La discontinuación del tratamiento produce habitualmente una pérdida de los efectos de RA.

ES 2 310 734 T3

Carcinoma de células basales

El carcinoma de células basales (BCC) no es sólo la forma más común de cáncer de piel, también es el más común de todos los cánceres, que afecta, por ejemplo, a 800.000 americanos de EE.UU. cada año. Estos cánceres surgen en las células basales, que están en el fondo de la epidermis (capa de piel exterior). Aunque ha aumentado fuertemente el número de casos nuevos cada año en las últimas décadas, la edad media de comienzo de la enfermedad ha disminuido constantemente. Hasta hace poco, los afectados más a menudo eran gente mayor, particularmente hombres que habían trabajado al aire libre. Sin embargo, hoy más mujeres están cogiendo BCC's que en el pasado; no obstante, los hombres las superan aún en gran medida.

La exposición crónica a la luz del sol es la causa de casi todos los carcinomas de células basales, que tienen lugar más frecuentemente en partes expuestas del cuerpo - la cara, orejas, cuello, pericráneo, hombros y espalda. La gente que tiene piel blanca, pelo rubio, y ojos azules, verdes o grises están en riesgo más alto. Aquellos cuyas ocupaciones requieran largas horas al aire libre o que pasan un tiempo de ocio extenso al sol están en riesgo particular. Los factores que predisponen a BCC incluyen radiación ultravioleta, radiación ionizante, arsénico, estados heredados, tales como xeroderma pigmentosum y síndrome de nevus de células basales, vacunaciones, quemaduras y cicatrices.

La lesión típica es un nódulo de superficie lisa con bordes elevados, perlados o translúcidos. Son un aspecto común telangiectasias en la lesión. Los carcinomas de células basales varían de tamaño de unos pocos milímetros a varios centímetros. El tamaño puede doblarse en 6-12 meses o el crecimiento puede ser lento. El ochenta y cinco por ciento tiene lugar en la cabeza y cuello, siendo el lugar más común la nariz. Los pacientes pueden dar cuenta de sangrado con pequeño trauma tal como lavando con un paño facial. Este neoplasma es invasivo localmente y puede ser muy destructivo, causando la pérdida de un ojo, oreja o una nariz, y puede ser letal si invade el cerebro. El BCC raramente experimenta metástasis, pero, cuando lo hace, puede ser mediante los nodos linfáticos a regionales de la linfa, o mediante extensión hematogena, más comúnmente a los pulmones. El cáncer de piel avanzado puede definirse arbitrariamente como tumores > 2 cm, con invasión de músculo óseo, o nervios, metástasis de nodos de linfa o lesiones que requieren separación de una unidad cosmética o funcional.

El tratamiento de un BCC depende del tipo, tamaño y localización, del número a tratar y de la preferencia o pericia del médico. Las posibilidades incluyen:

- Excisión - la lesión es cortada y la piel suturada.

- Congelación (crioterapia) - uso de nitrógeno líquido para lesiones superficiales pequeñas. Éste no es un tratamiento recomendado para BCC.

- Legrado y cauterio - raspado del tumor y cauterización de la base. Éste tampoco es un tratamiento recomendado para BCC.

- Radioterapia (tratamiento con rayos X) - puede usarse en lesiones avanzadas o cuando no sea adecuada cirugía.

- Quimioterapia tópica - aplicación tópica de una crema que contenga 5-fluorouracilo (5-FU) puede usarse especialmente para regiones muy grandes no tratables por cirugía.

Sin embargo, para aquellos pacientes poco dispuestos o inadecuados para cirugía (por ejemplo, el débil y mayor de edad, aquellos con un marcapasos o con una diátesis sangrante) o con grandes lesiones, lesiones múltiples y aquellos en lugares difíciles anatómicamente o piel mal vascularizada, permanece la necesidad de tratamientos eficaces adicionales.

Actualmente, se conocen terapias de tumores que consisten en el tratamiento combinatorio de pacientes con más de un reactivo terapéutico anti-tumores. Son ejemplos el uso combinado de tratamiento de irradiación junto con reactivos quimioterapéuticos y/o citotóxicos y más recientemente la combinación de tratamiento de irradiación con terapias inmunológicas, tales como el uso de anticuerpos terapéuticos específicos para células de tumores. Sin embargo, la posibilidad de combinar tratamientos individuales entre sí con el fin de identificar tales combinaciones que son más eficaces que los métodos individuales solos, requiere ensayos pre-clínicos y clínicos extensos. No es posible predecir qué combinaciones mostrarán un efecto aditivo o incluso sinérgico. Además del propósito de aumentar la eficacia terapéutica, otro propósito es la disminución potencial de las dosis de los componentes individuales en las combinaciones resultantes con el fin de disminuir efectos secundarios indeseados o dañinos causados por dosis más altas de los componentes individuales.

El papel de las citoquinas en autoinmunidad e inflamación

Las citoquinas son un grupo diverso de proteínas y péptidos solubles que actúan como reguladores para modular las actividades funcionales de células y tejidos individuales. Están diseñadas para inducir una reacción inflamatoria como defensa frente a sustancias extrañas o endógenas alteradas. En muchos aspectos, las actividades biológicas de las

citoquinas se parecen a las de las hormonas clásicas producidas en tejidos glandulares especializados actuando en un nivel sistémico para inducir fenómenos biológicos tales como inflamación, reacción de fase aguda y autoinmunidad. Sin embargo, la activación inapropiada de respuestas inflamatorias es la causa subyacente de muchas enfermedades comunes y las reacciones inflamatorias son también, por tanto, un objetivo importante para el desarrollo de fármacos.

Un cierto número de citoquinas aceleran la inflamación y regulan una reacción inflamatoria local o sistémica directamente o a través de su capacidad para inducir la síntesis de moléculas de adhesión celular u otras citoquinas en ciertos tipos de células. Las citoquinas principales que son responsables de respuestas tempranas son IL1, IL6 y TNF-alfa. Otros mediadores pro-inflamatorios incluyen LIF, IFN-gamma, GM-CSF, IL11, IL12, IL18 y una variedad de otras quimioquinas.

Sin embargo, el papel de las citoquinas no está restringido al proceso inflamatorio solo, sino que tienen también un papel principal en el desarrollo y propagación de enfermedades autoinmunes. Un ejemplo clásico es la artritis reumatoide, en la que células T CD4+ específicas, más probablemente como respuesta a un antígeno exógeno o endógeno desconocido, inducen una respuesta inmune en articulaciones afectadas (Olsen *et al.*, 2003, *New England Journal of Medicine* 350, 2167-79). Como consecuencia, monocitos, macrófagos y fibroblastos reclutados producen citoquinas tales como factor de necrosis de tumores- α (TNF- α) e interleuquina-1 dentro de la cavidad sinovial. Estas citoquinas son centrales a una cascada perjudicial, iniciando finalmente la producción de metaloproteinasas y osteoclastos de matriz, que producen daño irreversible a tejidos blandos y huesos.

El TNF- α , una citoquina inflamatoria que se libera por monocitos, macrófagos y linfocitos T activados, promueve respuestas inflamatorias que son importantes en la patogénesis de artritis reumatoide. Los pacientes con artritis reumatoide tienen altas concentraciones de TNF- α en el fluido sinovial. El TNF- α se localiza en la unión del pannus inflamatorio y cartilago sano, y están asociadas altas concentraciones de TNF- α en el fluido sinovial con la erosión de huesos.

No sorprendentemente, los antagonistas de TNF parecen estar entre los tratamientos más eficaces disponibles para artritis reumatoide. La respuesta es generalmente rápida, teniendo lugar a menudo en unas pocas semanas, aunque no todos los pacientes tienen una respuesta.

Los agentes dirigidos contra TNF- α no son sólo eficaces en el tratamiento de trastornos autoinmunes crónicos tales como artritis reumatoide, sino también en el tratamiento de enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome de Sjögren, escleroderma, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, uveítis refractaria, enfermedad de Behçet, enfermedad de Still con comienzo en adultos y granulomatosis de Wegener.

Otro ejemplo es psoriasis, en la que una respuesta inmune mediada por células T se dirige contra queratinocitos. Estos linfocitos T encuentran al antígeno iniciador en la dermis o epidermis, y segregan citoquinas de tipo 1 (Th1), particularmente interferon- γ , interleuquina 2 y TNF- α . Estas secreciones producen proliferación y maduración disminuida de queratinocitos y cambios vasculares asociados. La secreción de otras citoquinas tales como interleuquina 8 contribuye al cuadro completo de psoriasis (Lebwohl, 2004, *The Lancet* 361, 1197-1204).

Ha llegado una evidencia adicional para la implicación causal de citoquinas en enfermedades autoinmunes de observaciones hechas después del uso de citoquinas en el tratamiento de diversas enfermedades (Krause *et al.*, 2003, *The American Journal of Medicine* 115, 390-397). De manera interesante, se han asociado con efectos secundarios tales como el inicio y exacerbación de estados inmunes y autoinmunes, que pueden evolucionar a trastornos autoinmunes abiertos. Estas manifestaciones autoinmunes parecen ser más comunes en pacientes con una tendencia preexistente hacia la autoinmunidad.

Se ha observado la exacerbación de esclerosis múltiple durante el tratamiento con interferón- γ . La frecuencia de manifestaciones autoinmunes asociadas con terapia con interferón- γ parece ser baja, pero ha habido informes de lupus sistémico eritematoso en pacientes tratados con interferón- γ solo, así como en combinación con interferón- γ para trastornos mieloproliferativos. El interferón- γ está implicado en la patogénesis de lupus sistémico eritematoso en modelos de animales. La administración de interferón- γ acelera la velocidad de progresión a glomerulonefritis en ratones propensos a lupus (NZBXNZW)F1, que es prevenida por tratamiento con anticuerpos anti-interferón- γ . Se ha informado de niveles de interferón- γ elevados en suero en pacientes con lupus sistémico eritematoso. El interferón- γ se produce por células destructoras naturales y se une al receptor de interferón de tipo II. Es menos eficaz que el interferón- γ para activar células destructoras naturales y tiene efectos antivíricos y antitumores menos potentes. Sin embargo, el interferón- γ es el inductor más potente de la activación de macrófagos y moléculas de clase II de histocompatibilidad principal. Estimula la secreción de inmunoglobulina por células B y promueve la diferenciación de células T al tipo T auxiliar 1.

La interleuquina 2 es segregada por células T activadas con actividad antitumores. Es eficaz en el tratamiento de melanoma maligno metastático y carcinoma de células renales. Induce la proliferación de células T, potencia el crecimiento de células B y aumenta la activación de células destructoras naturales y monocitos. El efecto secundario autoinmune más común visto bajo terapia con interleuquina 2 es enfermedad tiroidea mediada inmune. La disfunción tiroidea reversible tiene lugar frecuentemente en pacientes con cáncer que se tratan con interleuquina, sola o conjuntamente con células destructoras activadas con linfoquina o interferón- γ . En un estudio con interleuquina 2 en pacientes con carcinoma de células renales metastático, se detectaron anticuerpos antitiroideos en el 18% (60/329) de los pacien-

ES 2 310 734 T3

tes. Otros muchos fenómenos menos comunes que pueden considerarse autoinmunes se han descrito en asociación con terapia con interleuquina 2. Éstos incluyen artritis reumatoide, artropatía psoriática, espondilitis anquilosante y síndrome de Reiter. El inicio de la artritis puede explicarse por inducción de reconocimiento autoantígeno por células T que se infiltran en las articulaciones, conduciendo a inflamación. La interleuquina 2 puede potenciar una interrupción de la tolerancia inmunológica a antígenos específicos de los músculos y de tumores, produciendo destrucción de células de tumores y musculares. Un paciente con carcinoma de células renales metastático tratado con interleuquina 2 y células destructoras activadas con linfoquina desarrolló una exacerbación aguda de esclerosis sistémica.

Los niveles en suero de interleuquina 2 y receptor de interleuquina 2 soluble son elevados en pacientes con esclerosis sistémica y se correlacionan con la duración y actividad de la enfermedad. Estas observaciones pueden explicar la asociación entre terapia con interleuquina 2 y el desarrollo de esclerosis sistémica.

La presente invención pretende proporcionar una composición mejorada para la prevención o tratamiento de los trastornos de la piel según las presentes reivindicaciones.

El VPA se ha desarrollado como fármaco usado para el tratamiento de epilepsia. Por consiguiente, el VPA se usa sistémicamente, oral o intravenosamente, para permitir al fármaco pasar la barrera cerebral de la sangre para alcanzar las regiones de objetivo epiléptico en el tejido cerebral con el fin de cumplir su misión anti-epiléptica. Por tanto, el VPA se considera como un fármaco que debe aplicarse sistémicamente con el fin de conseguir sus efectos terapéuticos.

Ahora, se ha identificado sorprendentemente que el VPA permea la piel humana eficazmente, lo que se requiere crucialmente para cualquier compuesto terapéutico a usar tópicamente sobre la piel. Se supuso por los inventores que el VPA, cumpliendo este criterio esencial para aplicación tópica, podría usarse así para el tratamiento tópico de lesiones de cáncer de la piel.

Con este fin, se ha encontrado ahora que el VPA tiene de hecho efectos beneficiosos inesperados cuando se usa para el tratamiento tópico de enfermedades de la piel humana, por ejemplo, cáncer de piel humano. Aquí, el modo preciso de acción que es empleado por el VPA no se comprende totalmente, pero su potencial para sensibilizar células de tumores para la actividad de apoptosis, detención del crecimiento y compuestos que inducen diferenciación puede ser la base de tal actividad anti-tumores. Este potencial sorprendente de VPA se espera que esté basado en su actividad como inhibidor de grupos específicos de enzimas que tienen actividad de HDAC.

La invención se define en las reivindicaciones. Se describe aquí una composición farmacéutica tópica para la prevención o tratamiento de trastornos de la piel, que comprende:

- (i) al menos aproximadamente 0,1% de un agente activo seleccionado del grupo constituido por VPA y sales del mismo aceptables farmacéuticamente; y
- (ii) un vehículo aceptable dermatológicamente.

La expresión "aplicación tópica" según se usa aquí significa aplicar o extender las composiciones de la presente invención sobre la superficie de la piel.

La expresión "aceptable dermatológicamente" según se usa aquí significa que las composiciones o componentes de ellas descritos así son adecuados para su uso en contacto con piel humana sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares indebidos.

Salvo indicación en contrario, los valores en porcentaje dados aquí son % en peso (p/p).

Las composiciones comprenden preferiblemente del 0,1% al 25%, más preferiblemente del 0,1% al 6%, aún más preferiblemente del 0,3% al 5%, aún más preferiblemente del 0,5% al 4%, aún más preferiblemente del 1% al 4%, más preferiblemente del 2% al 4% del agente activo.

Las composiciones comprenden usualmente del 1% al 99,9% de un vehículo aceptable dermatológicamente dentro del que se incorporan las composiciones de la presente invención para permitir al agente activo, así como otros agentes activos opcionales, suministrarse a la piel en una concentración apropiada.

En una realización preferida, la composición es un semisólido a 25°C y bajo presión atmosférica. Según esta realización, la forma de producto de la composición puede ser una crema, un ungüento, un gel o una pasta. La forma de producto de la composición puede ser una dispersión líquida, por ejemplo, una loción.

Inesperadamente, se ha encontrado que la aplicación tópica de VPA potencia el efecto terapéutico de retinoides y fármacos quimioterapéuticos, tales como 5-fluorouracilo.

La composición puede comprender por tanto además ácido retinoico o un derivado del mismo. La concentración de ácido retinoico o el derivado en la composición es preferiblemente del 0,01% al 1%, más preferiblemente del 0,05% al 0,5% de la composición. El retinoide se selecciona preferiblemente del grupo constituido por ácido 9-cis-retinoico, ácido trans-retinoico, ácido all-trans-retinoico y tazaroteno.

ES 2 310 734 T3

En otro aspecto todavía, la composición comprende además un fármaco quimioterapéutico tal como 5-fluorouracilo. La concentración del fármaco quimioterapéutico es preferiblemente del 0,1% al 10%, más preferiblemente del 1% al 10% de la composición.

5 En una realización preferida, el vehículo no es una solución. En otra realización preferida, el vehículo es una crema, una pasta, un ungüento, una loción o un gel.

Otro aspecto de la invención es el uso de VPA o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un trastorno de la piel, en el que un medicamento que comprende al menos 0,1% de VPA o derivado del mismo se aplica tópicamente a la piel de un individuo que lo necesite, en el que el trastorno de la piel se selecciona den grupo constituido por psoriasis y acné.

La administración de VPA o la sal del mismo puede combinarse con una terapia anti-cáncer establecida. El VPA o la sal del mismo y la terapia de cáncer establecida pueden aplicarse simultánea o sucesivamente (en diferentes puntos de tiempo).

Pueden usarse agentes activos opcionales adicionales en el tratamiento según la invención. El VPA o las sales del mismo y el agente activo adicional pueden administrarse simultánea o sucesivamente (en diferentes puntos de tiempo). Los agentes activos adicionales incluyen inhibidores de histona desacetilasas que sean diferentes de VPA, incluyendo compuestos tales como NVP-LAQ824 (Novartis), tricostatina A, ácido suberoil anilida hidroxámico (Aton), CBHA (Aton), piroxamida (Aton), Scriptaid (Johns Hopkins), CI-994 (Pfizer), CG-1521 (CircaGen), clamidocina (Janssen), hidroxamato de biarilo, por ejemplo, A-161906 (Abbott), aril-N-hidroxicarboxamidas bicíclicas (Kansai University), PXD-101 (Prolifix), ácido sulfonamida hidroxámico (MethylGene), análogo de TPX-HA (CHAP) (Japan Energy), oxamflatina, trapoxina, depudecina, apidicina (Kyongji), benzamidas tales como MS-27-275 (Mitsui), piroxamidas y derivados de ellas, ácidos grasos de cadena corta tales como ácido butírico y derivados de él, por ejemplo, Pivanex (butirato de pivaloiloximetilo), tetrapéptidos cíclicos tales como trapoxina A, depsipéptido (FK-228; Fujisawa/NCI) y compuestos peptídicos relacionados, tacedinalina (Pfizer), MG2856 (MethylGene) e inhibidores de HDAC clase III o inhibidores de SIRT (véase Kelly, O'Connor y Marks, 2002; Expert Opin. Investig. Drugs 11 (12), 1695-1713).

La administración de VPA o la sal del mismo puede combinarse con administración/aplicación de fármacos quimioterapéuticos o citotóxicos (por ejemplo, 5-FU), fármacos que inducen diferenciación (por ejemplo, vitamina D, derivados de vitamina D, retinoides, agentes de unión a receptor tales como imiquimoda), terapia de radiación (por ejemplo, rayos X o rayos gamma), métodos inmunológicos (terapia de anticuerpos, vacunación) y métodos inmunoterapéuticos/citotóxicos combinados (por ejemplo, anticuerpos combinados con componentes citotóxicos).

En una realización adicional, el VPA o su sal potencian la actividad de retinoides aplicados oralmente en psoriasis o acné por aplicación tópica de VPA solo.

Se describe aquí una formulación aplicable tópicamente de un medicamento que contiene ácido valproico o sales del mismo usados solos o en combinación con retinoides, con ligandos de receptores nucleares o con agentes quimioterapéuticos, tales como 5-FU, para el tratamiento tópico de inflamaciones de la piel/mucosa seleccionadas entre acné y psoriasis.

Por tanto, un aspecto de la presente invención es el uso de una formulación aplicable tópicamente que contiene VPA o una sal del mismo usados solos o en combinación con retinoides o con 5-fluorouracilo (5-FU) para la fabricación de un medicamento para un tratamiento tópico de los trastornos indicados en la reivindicación 1ª. La actividad anti-tumoral de tratamientos tópicos combinatorios comparada con el uso de cada componente solo puede aumentarse así y, si se desea, las dosis de los componentes individuales de tales tratamientos combinatorios pueden rebajarse con el fin de disminuir efectos secundarios indeseados relacionados con el tratamiento con los fármacos individuales solos.

Según la presente invención, también pueden usarse para la formulación sales aceptables farmacéuticamente de VPA.

En general, la presente invención proporciona nuevas posibilidades para tratar diversas enfermedades humanas. Los solicitantes encontraron que VPA y sus sales pueden usarse con éxito solos o en combinación con fármacos terapéuticos bien establecidos y usados clínicamente para el tratamiento tópico de las enfermedades inflamatorias de la piel/mucosa psoriasis y acné.

Los aspectos de la presente invención incluyen la combinación de compuestos de fórmula I con principios terapéuticos en uso clínico actualmente o en desarrollo clínico, tales como

- fármacos quimioterapéuticos o citotóxicos (por ejemplo, 5-FU)
- fármacos que inducen diferenciación (por ejemplo, vitamina D, derivados de vitamina D, retinoides, agentes de unión a receptor tales como imiquimoda)
- terapia de radiación (por ejemplo, rayos X o rayos gamma)

ES 2 310 734 T3

- métodos inmunológicos (terapia de anticuerpos, vacunación)
- métodos inmunoterapéuticos/citotóxicos combinados (por ejemplo, anticuerpos combinados con componentes citotóxicos)
- métodos anti-angiogénesis.

Formulación

Las composiciones según la presente invención comprenden del 1% al 99,9% de un vehículo aceptable dermatológicamente dentro del que se incorporan las composiciones de la presente invención para permitir al agente activo, así como otros agentes activos opcionales, suministrarse a la piel en una concentración apropiada.

El vehículo puede contener una o más cargas, diluyentes, disolventes o extensores sólidos, semisólidos o líquidos aceptables dermatológicamente. El vehículo puede ser sólido, semisólido o líquido. Los vehículos preferidos son sustancialmente semisólidos. El propio vehículo puede ser inerte o puede poseer beneficios dermatológicos por sí mismo. Las concentraciones del vehículo pueden variar con el vehículo seleccionado y las concentraciones pretendidas del agente activo y los componentes opcionales.

Los vehículos adecuados incluyen vehículos convencionales o conocidos de otro modo que sean aceptables dermatológicamente. El vehículo debe ser también física y químicamente compatible con los componentes esenciales descritos aquí, y no debe perjudicar indebidamente a la estabilidad, eficacia u otros beneficios de uso asociados con las composiciones de la presente invención. Los componentes preferidos de las composiciones de esta invención deben ser capaces de ser mezclados de una manera tal que no haya interacción que reduciría sustancialmente la eficacia de la composición en situaciones de uso ordinario.

El tipo de vehículo utilizado en la presente invención depende del tipo de forma de producto deseada para la composición. Las composiciones tópicas útiles en la composición sujeto pueden fabricarse en una amplia variedad de formas de producto tal como se conocen en la técnica. Éstas incluyen, aunque sin limitarse a ellas, lociones, cremas, geles, barras, pulverizaciones, ungüentos, aceites, espumas, polvos y pastas. Estas formas de producto pueden comprender varios tipos de vehículos incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, soluciones, aerosoles, emulsiones, geles, sólidos y liposomas.

Los vehículos preferidos contienen un diluyente hidrófilo aceptable dermatológicamente. Según se usa aquí, "diluyente" incluye materiales en los que puede dispersarse, disolverse o incorporarse de otro modo el material en partículas. Son ejemplos no limitativos de diluyentes hidrófilos agua, diluyentes hidrófilos orgánicos tales como alcoholes monovalentes inferiores (por ejemplo, C₁-C₄) y glicoles y polioles de bajo peso molecular, incluyendo propilenglicol, polietilenglicol (por ejemplo, peso molecular 200-600 g/mol), polipropilenglicol (por ejemplo, peso molecular 425-2025 g/mol), glicerol, butilenglicol, 1,2,4-butanotriol, ésteres de sorbitol, 1,2,6-hexanotriol, etanol, isopropanol, ésteres de sorbitol, butanodiol, propanol éter, éteres etoxilados, éteres propoxilados y combinaciones de ellos. Un diluyente preferido es agua. La composición comprende preferiblemente de alrededor del 60% a aproximadamente el 99,9% del diluyente hidrófilo.

Las soluciones según la invención sujeto incluyen típicamente un diluyente hidrófilo aceptable dermatológicamente. Las soluciones útiles en la invención sujeto contienen preferiblemente de alrededor del 60% a aproximadamente el 99,9% del diluyente hidrófilo.

Pueden formarse aerosoles según la invención sujeto añadiendo un propulsor a una solución tal como se ha descrito antes. Los ejemplos de propulsores incluyen hidrocarburos de peso molecular inferior clorofluorados. Los aerosoles se aplican típicamente a la piel como un producto de pulverización.

Los vehículos preferidos comprenden una emulsión que comprende una fase hidrófila que comprende un componente hidrófilo, por ejemplo, agua u otro diluyente hidrófilo, y una fase hidrófoba que comprende un componente hidrófobo, por ejemplo, un lípido, aceite o material aceitoso. Como es bien sabido por un experto en la técnica, la fase hidrófila se dispersará en la fase hidrófoba, o viceversa, para formar respectivamente fases hidrófilas o hidrófobas dispersas y continuas, dependiendo de los ingredientes de la composición. En tecnología de emulsiones, La expresión "fase dispersa" es una expresión muy conocida por un experto en la técnica, que significa que la fase existe como pequeñas partículas o gotitas que están suspendidas en, y rodeadas por, una fase continua. La fase dispersa también es conocida como la fase interna o discontinua. La emulsión puede ser o comprender (por ejemplo, en una emulsión triple u otra multifases) una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite, tal como una emulsión de agua en silicona. Las emulsiones de aceite en agua comprenden típicamente de alrededor del 1% a aproximadamente el 50% de la fase hidrófoba dispersa y de alrededor del 1% a aproximadamente el 98% de la fase hidrófila continua; las emulsiones de agua en aceite comprenden típicamente de alrededor del 1% a aproximadamente el 98% de la fase hidrófila dispersa y de alrededor del 1% a aproximadamente el 50% de la fase hidrófoba continua. La emulsión puede comprender también una red de gel. Las emulsiones preferidas se describen adicionalmente después.

Las composiciones tópicas de la invención sujeto, incluyendo aunque sin limitarse a ellas lociones y cremas, pueden comprender un emoliente aceptable dermatológicamente. Tales composiciones contienen preferiblemente de alre-

ES 2 310 734 T3

dedor del 2% a aproximadamente 50% del emoliente. Los emolientes tienden a lubricar la piel, aumentar la suavidad y flexibilidad de la piel, prevenir o suprimir la sequedad de la piel y/o proteger la piel. Los emolientes son típicamente materiales inmiscibles con agua, aceitosos o cerosos. Se describen aquí ejemplos no limitativos de emolientes.

5 Las lociones y cremas según la presente invención comprenden preferiblemente un sistema de vehículo solución y uno o más emolientes. Las lociones comprenden típicamente de alrededor del 1% a aproximadamente el 20%, preferiblemente de alrededor del 5% a aproximadamente el 10%, de emoliente; de alrededor del 50% a aproximadamente el 90%, preferiblemente de alrededor del 60% a aproximadamente el 80%, de agua. Una crema comprende típicamente de alrededor del 5% a aproximadamente el 50%, preferiblemente de alrededor del 10% a aproximadamente el 20%, de emoliente; y de alrededor del 45% a aproximadamente el 85%, preferiblemente de alrededor del 50% a aproximadamente el 75%, de agua.

15 Los ungüentos de la presente invención pueden comprender una base de vehículo simple de aceites animales o vegetales o hidrocarburos semisólidos (oleaginosos); bases de ungüentos de absorción que absorben agua para formar emulsiones; o vehículos solubles en agua, por ejemplo, un vehículo de solución soluble en agua. Los ungüentos pueden comprender adicionalmente un agente de espesamiento. Por ejemplo, un ungüento puede comprender de alrededor del 2% a aproximadamente el 10% de un emoliente; y de alrededor del 0,1% a aproximadamente el 2% de un agente de espesamiento. Se describen aquí ejemplos no limitativos de agentes de espesamiento.

20 Las composiciones tópicas de la presente invención preferidas comprenden una emulsión. Las emulsiones de la presente invención pueden contener uno o más de los siguientes:

25 a) *Componente hidrófobo*

Las emulsiones según la presente invención contienen una fase hidrófoba que comprende un componente lípido, aceite, aceitoso u otro hidrófobo. Las composiciones de la presente invención comprenden preferiblemente de alrededor del 1% a aproximadamente el 50%, preferiblemente de alrededor del 1% a aproximadamente el 30%, y más preferiblemente de alrededor del 1% a aproximadamente el 10% en peso de la composición de un componente hidrófobo. El componente hidrófobo puede derivarse de animales, plantas o petróleo y puede ser natural o sintético (es decir, artificial). Los componentes hidrófobos preferidos son sustancialmente insolubles en agua, más preferiblemente esencialmente insolubles en agua.

35 Los ejemplos de componentes hidrófobos adecuados incluyen los seleccionados del grupo constituido por:

(1) aceite mineral, que también es conocido como vaselina líquida, es una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenidos del petróleo. Véase The Merck Index, décima edición, Entrada 7048, pág. 1033 (1983).

40 (2) vaselina, que se conoce también como petrolato, es un sistema coloidal de hidrocarburos sólidos de cadena no recta e hidrocarburos líquidos de alto punto de ebullición, en el que buena parte de los hidrocarburos líquidos se mantiene dentro de las micelas. Véase The Merck Index, décima edición, Entrada 7047, pág. 1033 (1983); Schindler, Drug. Cosmet. Ind., 89, 36-37, 76, 78-80, 82 (1961).

45 (3) hidrocarburos de cadena recta y ramificada que tienen de alrededor de 7 a aproximadamente 40 átomos de carbono. Los ejemplos no limitativos de estos materiales hidrocarbonados incluyen dodecano, isododecano, escualano, colesterol, poliisobutileno hidrogenado, docosano, hexadecano, isohexadecano. También son útiles las isoparafinas C7-C40, que son hidrocarburos ramificados C7-C40, por ejemplo, isoparafina C13-C14.

50 (4) ésteres de alcoholes C1-C30 de ácidos carboxílicos C1-C30 y de ácidos dicarboxílicos C2-C30, incluyendo materiales de cadena recta y ramificada así como derivados aromáticos (según se usa aquí en referencia al componente hidrófobo, los ácidos mono y policarboxílicos incluyen ácidos carboxílicos de cadena recta, de cadena ramificada y arílicos). Los ejemplos no limitativos incluyen sebacato de diisopropilo, adipato de diisopropilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, palmitato de metilo, propionato de miristilo, palmitato de 2-etilhexilo, neopentanoato de isodecilo, maleato de di-2-etilhexilo, palmitato de cetilo, miristato de miristilo, estearato de estearilo, estearato de isopropilo, estearato de metilo, estearato de cetilo, behenrato de behenilo, maleato de dioctilo, sebacato de dioctilo, adipato de diisopropilo, octanoato de cetilo y dilinoleato de diisopropilo.

55 (5) mono, di y triglicéridos de ácidos carboxílicos C1-C30, por ejemplo, triglicérido caprílico/cáprico, triglicérido caprílico/cáprico de PEG-6 y triglicérido caprílico/cáprico de PEG-8.

60 (6) ésteres de alquilenglicol de ácidos carboxílicos C1-C30, por ejemplo, mono y diésteres de etilenglicol y mono y diésteres de propilenglicol de ácidos carboxílicos C1-C30, por ejemplo, diestearato de etilenglicol.

65 (7) derivados propoxilados y etoxilados de los materiales anteriores.

(8) mono y poliésteres C1-C30 de azúcares y materiales relacionados. Estos ésteres se derivan de un resto azúcar o polioliol y uno o más restos ácido carboxílico. Dependiendo del ácido constituyente y del azúcar, estos ésteres pueden estar en forma líquida o sólida a temperatura ambiente. Los ejemplos de ésteres líquidos incluyen: tetraoleato de

ES 2 310 734 T3

glucosa, los tetraésteres de glucosa de ácidos grasos de aceite de soja (insaturados), los tetraésteres de manosa de ácidos grasos de aceite de soja mezclados, los tetraésteres de galactosa de ácido oleico, los tetraésteres de arabinosa de ácido linoleico, tetralinoleato de xilosa, pentaoleato de galactosa, tetraoleato de sorbitol, los hexaésteres de sorbitol de ácidos grasos de aceite de soja insaturados, pentaoleato de xilitol, tetraoleato de sacarosa, pentaoleato de sacarosa, hexaoleato de sacarosa, hepatoleato de sacarosa, octaoleato de sacarosa y mezclas de ellos. Los ejemplos de ésteres sólidos incluyen: hexaéster de sorbitol en el que los restos éster de ácido carboxílico son palmitoleato y araquidato en una relación en moles de 1:2, el octaéster de rafinosa en el que los restos éster de ácido carboxílico son linoleato y behenato en una relación en moles de 1:3, el heptaéster de maltosa en el que los restos ácido carboxílico esterificante son ácidos grasos de aceite de girasol y lignocerato en una relación en moles de 3:4, el octaéster de sacarosa en el que los restos ácido carboxílico esterificante son oleato y behenato en una relación en moles de 2:6, y el octaéster de sacarosa en el que los restos ácido carboxílico esterificante son laurato, linoleato y behenato en una relación en moles de 1:3:4. Un material sólido preferido es poliéster de sacarosa en el que el grado de esterificación es 7-8, y en el que los restos ácido grasos son mono y/o diinsaturados C18 y behénico, en una relación en moles de insaturados:behénico de 1:7 a 3:5. Un poliéster de azúcar sólido particularmente preferido es el octaéster de sacarosa en el que hay aproximadamente 7 restos ácido grasos behénico y aproximadamente 1 resto ácido oleico en la molécula. Otros materiales incluyen ésteres de ácidos grasos de semilla de algodón o aceite de soja de sacarosa.

(9) aceites organopolisiloxanos. El aceite organopolisiloxano puede ser volátil, no volátil o una mezcla de siliconas volátiles y no volátiles. La expresión "no volátil" según se usa en este contexto se refiere a aquellas siliconas que son líquidas en condiciones ambientales. El término "volátil" como se usa en este contexto se refiere a todos los demás aceites de silicona. Los organopolisiloxanos adecuados pueden seleccionarse entre una amplia variedad de siliconas que se extienden en un amplio intervalo de volatilidades y viscosidades. Se prefieren polisiloxanos no volátiles. Los ejemplos de aceites organopolisiloxanos adecuados incluyen polialquilsiloxanos, polialquilsiloxanos cíclicos y polialquilarilsiloxanos.

Se prefieren para su uso aquí organopolisiloxanos seleccionados del grupo constituido por polialquilsiloxanos, dimeticonas sustituidas con alquilo, ciclometiconas, trimetilsiloxisilicatos, dimeticonoles, polialquilarilsiloxanos y mezclas de ellos. Son más preferidos para su uso aquí polialquilsiloxanos y ciclometiconas. Entre los polialquilsiloxanos son preferidas dimeticonas, como se describe en el documento US 5.968.528.

(10) aceites vegetales y aceites vegetales hidrogenados. Los ejemplos de aceites vegetales y aceites vegetales hidrogenados incluyen aceite de cártamo, aceite de ricino, aceite de nuez de coco, aceite de semilla de algodón, aceite de menhaden, aceite de almendra de palma, aceite de palma, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de semilla de colza, aceite de linaza, aceite de salvado de arroz, aceite de pino, aceite de sésamo, aceite de pipa de girasol, aceite de cártamo hidrogenado, aceite de ricino hidrogenado, aceite de nuez de coco hidrogenado, aceite de semilla de algodón hidrogenado, aceite de menhaden hidrogenado, aceite de almendra de palma hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, aceite de cacahuete hidrogenado, aceite de soja hidrogenado, aceite de semilla de colza hidrogenado, aceite de linaza hidrogenado, aceite de salvado de arroz hidrogenado, aceite de sésamo hidrogenado, aceite de pipa de girasol hidrogenado y mezclas de ellos.

(11) grasas y aceites animales, por ejemplo, lanolina y derivados de ella, aceite de hígado de bacalao.

(12) También son útiles éteres de alquilo C4-C20 de polipropilenglicoles, ésteres de ácidos carboxílicos C1-C20 de polipropilenglicoles y éteres de di-alquilo C8-C30. Los ejemplos no limitativos de estos materiales incluyen PPG-14 butil éter, PPG-15 estearil éter, dioctil éter, dodecil octil éter y mezclas de ellos.

b) *Componente hidrófilo*

Las emulsiones de la presente invención comprenden también un componente hidrófilo, por ejemplo, agua u otro diluyente hidrófilo. La fase hidrófila puede comprender así agua o una combinación de agua y uno o más ingredientes solubles o dispersables en agua. Se prefieren componentes hidrófilos que comprenden agua.

(c) *Otros componentes*

Las emulsiones y otras composiciones tópicas de la presente invención pueden comprender una variedad de otros ingredientes tales como los descritos aquí. Como se entenderá por el técnico experto, un componente dado se distribuirá principalmente en una fase hidrófila o una fase hidrófoba, dependiendo de la hidrofiliidad del componente en la composición.

Las emulsiones de la presente invención incluyen preferiblemente uno o más compuestos seleccionados entre emulsionantes, tensioactivos, agentes de estructuración y espesadores.

(1) *Emulsionantes/tensioactivos*

La emulsión puede contener un emulsionante y/o tensioactivo, generalmente para ayudar a dispersar y suspender la fase discontinua dentro de la fase continua. Puede emplearse una amplia variedad de tales agentes. Pueden usarse en la composición emulsionantes/tensioactivos conocidos o convencionales, siempre que el agente seleccionado sea compatible química y físicamente con componentes esenciales de la composición, y proporcione las caracterís-

ES 2 310 734 T3

5 ticas de dispersión deseadas. Los agentes adecuados incluyen emulsionantes/tensioactivos que no contienen silicona, emulsionantes/tensioactivos de silicona y mezclas de ellos.

En una realización preferida, la composición comprende un emulsionante o tensioactivo hidrófilo. Las composi-
5 ciones de la presente invención comprenden preferiblemente de alrededor del 0,05% a aproximadamente el 5%, más preferiblemente de alrededor del 0,05% a aproximadamente el 1% de al menos un tensioactivo hidrófilo.

Los tensioactivos hidrófilos preferidos se seleccionan entre tensioactivos no iónicos. Entre los tensioactivos no ió-
10 nicos que son útiles aquí están los que pueden definirse ampliamente como productos de condensación de alcoholes de cadena larga, por ejemplo, alcoholes C8-C30, con polímeros de azúcar o almidón, es decir, glicósidos. Los ejemplos de alcoholes de cadena larga de los que puede derivarse el grupo alquilo incluyen alcohol decílico, alcohol cetílico, alcohol estearílico, alcohol laurílico, alcohol miristílico, alcohol oleílico y similares. Los ejemplos disponibles comercialmente de estos tensioactivos incluyen decil poliglucósido (disponible como APG 325 CS de Henkel) y lauril poliglucósido (disponible como APG 600 CS y 625 CS de Henkel).

Otros tensioactivos no iónicos útiles incluyen los productos de condensación de óxidos de alquileo con ácidos
15 grasos (es decir, ésteres de óxido de alquileo de ácidos grasos). Otros tensioactivos no iónicos son los productos de condensación de óxidos de alquileo con alcoholes grasos (es decir, éteres de óxido de alquileo de alcoholes grasos). Son todavía otros tensioactivos no iónicos los productos de condensación de óxidos de alquileo con ácidos grasos y alcoholes grasos [es decir, en los que la porción óxido de alquileo se esterifica en un extremo con un ácido graso y se esterifica (es decir, se conecta mediante un enlace éter) en el otro extremo con un alcohol graso]. Los ejemplos no limitativos de estos tensioactivos no iónicos derivados de óxido de alquileo incluyen ceteth-6, ceteth-10, ceteth-12, cetareth-6, cetareth-10, cetareth-12, estareth-6, estareth-10, estareth-12, estearato de PEG-
20 6, estearato de PEG-10, estearato de PEG-100, estearato de PEG-12, estearato de PEG-20 glicerilo, sebacato de PEG-80 glicerilo, estearato de PEG-10 glicerilo, cocoato de PEG-30 glicerilo, cocoato de PEG-80 glicerilo, sebacato de PEG-200 glicerilo, dilaurato de PEG-8, diestearato de PEG-10 y mezclas de ellos.

Otros tensioactivos no iónicos útiles todavía incluyen tensioactivos de polihidroxi ácido graso amida.

30 Son preferidos entre los tensioactivos no iónicos los seleccionados del grupo constituido por estareth-21, cetareth-20, cetareth-12, cocoato de sacarosa, estareth-100, estearato de PEG-100 y mezclas de ellos.

Otros tensioactivos no iónicos adecuados para su uso aquí incluyen ésteres y poliésteres de azúcares, ésteres y
35 poliésteres de azúcares alcoxilados, ésteres de ácidos grasos C1-C30 de alcoholes grasos C1-C30, derivados alcoxilados de ésteres de ácidos grasos C1-C30 de alcoholes grasos C1-C30, éteres alcoxilados de alcoholes grasos C1-C30, ésteres de poliglicerilo de ácidos grasos C1-C30, ésteres C1-C30 de polioles, éteres C1-30 de polioles, fosfatos de alquilo, éter fosfatos grasos de polioxialquileo, amidas de ácidos grasos, lactilatos de acilo y mezclas de ellos. Los ejemplos no limitativos de estos emulsionantes que no contienen silicona incluyen: polietilenglicol 20 monolaurato de sorbitán (polisorbato 20), polietilenglicol 5 esteroil de soja, estareth-20, cetareth-20, diestearato de PPG-2 metilglucosa éter, ceteth-10, polisorbato 80, cetil fosfato, cetil fosfato potásico, cetil fosfato de dietanolamina, polisorbato 60, estearato de glicerilo, trioleato de polioxietileno 20 sorbitán (polisorbato 85), monolaurato de sorbitán, estearato de polioxietileno 4 lauril éter sodio, isoestearato de poliglicerilo-4, laurato de hexilo, diestearato de PPG-2 metil glucosa éter, estearato de PEG-100 y mezclas de ellos.

45 Otros emulsionantes útiles aquí son mezclas de ésteres de ácidos grasos basados en una mezcla de éster de ácido graso de sorbitán o sorbitol y éster de ácido graso de sacarosa. El emulsionante éster de ácido graso preferido es una mezcla de éster de ácido graso C₁₆-C₂₀ de sorbitán o sorbitol con éster de ácido graso C₁₀-C₁₆ de sacarosa, especialmente estearato de sorbitán y cocoato de sacarosa. Éste está disponible comercialmente de ICI con el nombre comercial Ariatone 2121.

50 Los tensioactivos hidrófilos útiles aquí pueden incluir alternativa o adicionalmente cualquiera de una amplia variedad de tensioactivos catiónicos, aniónicos, con carga positiva y negativa y anfóteros, tal como se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, McCutcheon's, Detergents and Emulsifiers, North American Edition (1986), publicado por Allured Publishing Corporation.

55 Los ejemplos de tensioactivos catiónicos útiles aquí incluyen los descritos en la Patente de los EE.UU. N° 5.968.528. Los tensioactivos catiónicos útiles aquí incluyen sales de amonio catiónicas tales como sales de amonio cuaternario y amino-amidas.

60 Una amplia variedad de tensioactivos aniónicos también son útiles aquí. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N° 5.968.528. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos incluyen isetonatos de alquilo (por ejemplo, C₁₂-C₃₀), sulfatos de alquilo y alquiléter y sales de ellos, fosfatos de alquilo y alquiléter y sales de ellos, metiltauratos de alquilo (por ejemplo, C₁₂-C₃₀) y jabones (por ejemplo, sales de metales alcalinos, por ejemplo, sales de sodio o potasio) de ácidos grasos.

65 También son útiles aquí tensioactivos anfóteros y con carga positiva y negativa. Los ejemplos de tensioactivos anfóteros y con carga positiva y negativa que pueden usarse en las composiciones de la presente invención son los que se describen ampliamente como derivados de aminas secundarias y terciarias alifáticas en las que el radical alquilo puede

ES 2 310 734 T3

ser de cadena recta o ramificada y en las que uno de los sustituyentes alifáticos contiene de alrededor de 8 a aproximadamente 22 átomos de carbono (preferiblemente C₈-C₁₈) y uno contiene un grupo solubilizante en agua aniónico, por ejemplo, carboxi, sulfonato, sulfato, fosfato o fosfonato. Son ejemplos alquiliminoacetatos, e iminodialcanoatos y aminoalcanoatos, derivados de imidazolinio y amonio. Otros tensioactivos anfóteros y con carga positiva y negativa adecuados son los seleccionados del grupo constituido por betaínas, sultaínas, hidroxisultaínas, alquilsarcosinatos (por ejemplo, C₁₂-C₃₀) y alcanoilsarcosinatos.

Las emulsiones preferidas de la presente invención incluyen un emulsionante o tensioactivo que contiene silicona. Una amplia variedad de emulsionantes de silicona son útiles aquí. Estos emulsionantes de silicona son típicamente organopolisiloxanos modificados orgánicamente, también conocidos por los expertos en la técnica como tensioactivos de silicona. Los emulsionantes de silicona útiles incluyen copolios de dimeticona. Estos materiales son polidimetilsiloxanos que se han modificado para incluir cadenas secundarias poliéter tales como cadenas de poli(óxido de etileno), cadenas de poli(óxido de propileno), mezclas de estas cadenas y cadenas poliéter que contienen restos derivados de óxido de etileno y óxido de propileno. Otros ejemplos incluyen copolios de dimeticona modificados con alquilo, es decir, compuestos que contienen cadenas secundarias colgantes C₂-C₃₀. Otros copolios de dimeticona útiles todavía incluyen materiales que tienen diversos restos colgantes catiónicos, aniónicos, anfóteros y con carga positiva y negativa.

Los ejemplos de copolios de dimeticona y otros tensioactivos de silicona útiles como emulsionantes aquí incluyen copolímeros de polidimetilsiloxano poliéter con cadenas secundarias de poli(óxido de propileno) colgantes, copolímeros de polidimetilsiloxano poliéter con cadenas secundarias de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) mezcladas colgantes, copolímeros de polidimetilsiloxano poliéter con cadenas secundarias de poli(óxido de etileno)(propileno) mezcladas colgantes, copolímeros de polidimetilsiloxano poliéter con cadenas secundarias de organobetaína colgantes, copolímeros de polidimetilsiloxano poliéter con cadenas secundarias de carboxilato colgantes, copolímeros de polidimetilsiloxano poliéter con cadenas secundarias de amonio cuaternario colgantes; y también modificaciones adicionales de los copolímeros precedentes que contienen restos alquilo rectos, ramificados o cíclicos C₂-C₃₀. Son ejemplos de copolios de dimeticona disponibles comercialmente útiles aquí vendidos por Dow Corning Corporation Dow Corning® 190, 193, Q2-5220, 2501 Wax, 2-5324 fluido y 3225C (este último material vendido como una mezcla con ciclometicona). Un copoliol de cetil dimeticona está disponible comercialmente como una mezcla con isoestearato de poliglicerilo-4 (y) laurato de hexilo, y es vendido con el nombre comercial ABIL® WE-09 (disponible de Goldschmidt). También está disponible comercialmente un copoliol de cetil dimeticona como una mezcla con laurato de hexilo (y) oletato de poliglicerilo-3 (y) cetil dimeticona, y se vende con el nombre comercial ABIL® WS-08 (también disponible de Goldschmidt). Otros ejemplos no limitativos de copolios de dimeticona incluyen también copoliol de lauril dimeticona, acetato de copoliol de dimeticona, adipato de copoliol de dimeticona, copoliolamina de dimeticona, behenato de copoliol de dimeticona, éter de butilo de copoliol de dimeticona, hidroxistearato de copoliol de dimeticona, isoestearato de copoliol de dimeticona, laurato de copoliol de dimeticona, éter de metilo de copoliol de dimeticona, fosfato de copoliol de dimeticona y estearato de copoliol de dimeticona.

Se describen emulsionantes de copoliol de dimeticona útiles aquí, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N° 5.968.528.

(2) Agente de estructuración

Las presentes composiciones, y especialmente las presentes emulsiones, pueden contener un agente de estructuración. Son particularmente preferidos agentes de estructuración en las emulsiones de aceite en agua de la presente invención. Sin limitarse por la teoría, se cree que el agente de estructuración ayuda a proporcionar características reológicas a la composición, que contribuyen a la estabilidad de la composición. Por ejemplo, el agente de estructuración tiende a ayudar en la formación de las estructuras de red de gel cristalinas líquidas. El agente de estructuración puede funcionar también como un emulsionante o tensioactivo. Las composiciones preferidas de esta invención comprenden de alrededor del 1% a aproximadamente el 20%, más preferiblemente de alrededor del 1% a aproximadamente el 10%, aún más preferiblemente de alrededor del 2% a aproximadamente el 9%, de uno o más agentes de estructuración.

Los agentes de estructuración preferidos son aquellos que tienen un HLB de alrededor de 1 a aproximadamente 8 y que tienen un punto de fusión de al menos aproximadamente 45°C. Los agentes de estructuración adecuados son los seleccionados del grupo constituido por alcoholes grasos C₁₄ a C₃₀ saturados, alcoholes grasos C₁₆ a C₃₀ saturados que contienen de alrededor de 1 a aproximadamente 5 moles de óxido de etileno, dioles C₁₆ a C₃₀ saturados, mono-glicerol éteres C₁₆ a C₃₀ saturados, hidroxí ácidos grasos C₁₆ a C₃₀ saturados, ácidos grasos saturados hidroxilados y no hidroxilados C₁₄ a C₃₀, ácidos grasos etoxilados saturados C₁₄ a C₃₀, aminas y alcoholes que contienen de alrededor de 1 a aproximadamente 5 moles de dioles óxido de etileno, mono éteres de glicerilo saturados C₁₄ a C₃₀ con un contenido de monoglicérido de al menos el 40%, ésteres de poliglicerol saturados C₁₄ a C₃₀ que tienen de alrededor de 1 a aproximadamente 3 grupos alquilo y de alrededor de 2 a aproximadamente 3 unidades de glicerol saturado, mono éteres de glicerilo C₁₄ a C₃₀, mono/diésteres de sorbitán C₁₄ a C₃₀, mono/diésteres de sorbitán etoxilados saturados C₁₄ a C₃₀ con alrededor de 1 a aproximadamente 5 moles de óxido de etileno, ésteres de metilo glucósido saturados C₁₄ a C₃₀, mono/diésteres de sacarosa saturados C₁₄ a C₃₀, ésteres de metilo glucósido etoxilados saturados C₁₄ a C₃₀ con de alrededor de 1 a aproximadamente 5 moles de óxido de etileno, poliglucósidos saturados C₁₄ a C₃₀ que tienen una media de entre 1 y 2 unidades de glucosa y mezclas de ellos, que tienen un punto de fusión de al menos aproximadamente 45°C.

ES 2 310 734 T3

Los agentes de estructuración de la presente invención preferidos se seleccionan del grupo constituido por ácido esteárico, ácido palmítico, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol behenílico, ácido esteárico, ácido palmítico, el éter de polietilenglicol de alcohol estearílico que tiene una media de alrededor de 1 a aproximadamente 5 unidades óxido de etileno, éter de polietilenglicol de alcohol cetílico que tiene una media de alrededor de 1 a aproximadamente 5 unidades óxido de etileno, y mezclas de ellos. Los agentes de estructuración de la presente invención más preferidos se seleccionan del grupo constituido por alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol behenílico, el éter de polietilenglicol de alcohol estearílico que tiene una media de aproximadamente 2 unidades óxido de etileno (estearit=2), éter de polietilenglicol de alcohol cetílico que tiene una media de aproximadamente 2 unidades óxido de etileno, y mezclas de ellos. Los agentes de estructuración aún más preferidos se seleccionan del grupo constituido por ácido esteárico, ácido palmítico, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol behenílico, estearith-2 y mezclas de ellos.

(3) *Agente de espesamiento (incluyendo espesadores y agentes de gelificación)*

Las composiciones de la presente invención pueden comprender también un agente de espesamiento, preferiblemente de alrededor del 0,1% a aproximadamente el 5%, más preferiblemente de alrededor del 0,1% a aproximadamente el 3%, y aún más preferiblemente de alrededor del 0,25% a aproximadamente el 2%, de un agente de espesamiento.

Las clases no limitativas de agentes de espesamiento incluyen las seleccionadas del grupo constituido por:

(i) *Polímeros de ácidos carboxílicos*

Estos polímeros son compuestos reticulados que contienen uno o más monómeros derivados de ácido acrílico, ácidos acrílicos sustituidos y sales y ésteres de estos ácidos acrílicos y los ácidos acrílicos sustituidos, en los que el agente de reticulación contiene dos o más dobles enlaces carbono-carbono y se deriva de un alcohol polivalente. Los polímeros de ácidos carboxílicos preferidos son de dos tipos generales. El primer tipo de polímero es un homopolímero reticulado de un monómero de ácido acrílico o derivado del mismo (por ejemplo, en el que el ácido acrílico tiene sustituyentes en las posiciones de carbonos dos y tres seleccionados independientemente del grupo constituido por alquilo C1-4, --CN, --COOH y mezclas de ellos). El segundo tipo de polímero es un copolímero reticulado que tiene un primer monómero seleccionado del grupo constituido por un monómero de ácido acrílico o derivado del mismo (como se acaba de describir en la frase previa), un monómero éster acrilato de alcohol de cadena corta (es decir, un C1-4) o derivado del mismo (por ejemplo, en el que la porción de ácido acrílico del éster tiene sustituyentes en las posiciones de carbonos dos y tres seleccionados independientemente del grupo constituido por alquilo C1-4, --CN, --COOH y mezclas de ellos); y un segundo monómero que es un monómero éster acrilato de alcohol de cadena larga (es decir, C8-40) o derivado del mismo (por ejemplo, en el que la porción ácido acrílico del éster tiene sustituyentes en las posiciones de carbonos dos y tres seleccionados independientemente del grupo constituido por alquilo C1-4, --CN, --COOH y mezclas de ellos). También son útiles aquí combinaciones de estos dos tipos de polímeros.

En el primer tipo de homopolímeros reticulados, los monómeros se seleccionan preferiblemente del grupo constituido por ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido etacrílico y mezclas de ellos, siendo más preferido ácido acrílico. En el segundo tipo de copolímeros reticulados, el monómero ácido acrílico o derivado de él se selecciona preferiblemente del grupo constituido por ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido etacrílico y mezclas de ellos, siendo más preferidos ácido acrílico, ácido metacrílico y mezclas de ellos. El monómero éster acrilato de alcohol de cadena corta o derivado del mismo se selecciona preferiblemente del grupo constituido por ésteres acrilatos de alcohol C1-4, ésteres metacrilatos de alcohol C1-4, ésteres etacrilatos de alcohol C1-4 y mezclas de ellos, siendo más preferidos ésteres acrilatos de alcohol C1-4, ésteres metacrilatos de alcohol C1-4 y mezclas de ellos. El monómero éster acrilato de alcohol de cadena larga se selecciona entre ésteres acrilatos de alquilo C8-40, siendo preferidos ésteres acrilatos de alquilo C10-30.

El agente de reticulación en ambos de estos tipos de polímeros es un polialquénil poliéter de un alcohol polivalente que contiene más de un grupo alquénil éter por molécula, en el que el alcohol polivalente progenitor contiene al menos 3 átomos de carbono y al menos 3 grupos hidroxilo. Los reticuladores preferidos son los seleccionados del grupo constituido por alil éteres de sacarosa y alil éteres de pentaeritritol, y mezclas de ellos.

Los ejemplos de homopolímeros disponibles comercialmente del primer tipo útiles aquí incluyen los carbómeros, que son homopolímeros de ácido acrílico reticulado con alil éteres de sacarosa o pentaeritritol. Los carbómeros están disponibles como la serie Carbopol[®] 900 de B.F. Goodrich (por ejemplo, Carbopol[®] 954). Los ejemplos de copolímeros disponibles comercialmente del segundo tipo útiles aquí incluyen copolímeros de acrilatos de alquilo C10-30 con uno o más monómeros de ácido acrílico, ácido metacrílico o uno de sus ésteres de cadena corta (es decir, alcohol C1-4), en los que el agente de reticulación es un alil éter de sacarosa o pentaeritritol. Estos copolímeros son conocidos como polímeros cruzados de acrilatos/acrilato de alquilo C10-30 y están disponibles comercialmente como Carbopol[®] 1342, Carbopol[®] 1382Pemulen TR-1 y Pemulen TR-2, de B.F. Goodrich. En otras palabras, son ejemplos de espesadores polímeros de ácidos carboxílicos útiles aquí los seleccionados del grupo constituido por carbómeros, polímeros cruzados de acrilatos/acrilato de alquilo C10-C30 y mezclas de ellos.

(ii) *Polímeros poliacrilatos reticulados*

Los polímeros poliacrilatos reticulados útiles como espesadores o agentes de gelificación incluyen polímeros catiónicos y no iónicos, siendo preferidos generalmente los catiónicos. Se describen ejemplos no limitativos de polímeros poliacrilatos reticulados adecuados en el documento US 5.968.528.

ES 2 310 734 T3

(iii) *Polímeros poliacrilamida*

También son útiles aquí polímeros poliacrilamidas, especialmente polímeros poliacrilamidas no iónicos incluyendo polímeros ramificados o no ramificados sustituidos. Estos polímeros pueden formarse a partir de una variedad de monómeros, incluyendo acrilamida y metacrilamida, que están no sustituidas o sustituidas con uno o dos grupos alquilo (preferiblemente C1 a C5). Son preferidos monómeros de acrilato amida y metacrilato amida en los que el nitrógeno de la amida está no sustituido o sustituido con uno o dos grupos alquilo C1 a C5 (preferiblemente metilo, etilo o propilo), por ejemplo, acrilamida, metacrilamida, N-metacrilamida, N-metilmetacrilamida, N,N-dimetilmetacrilamida, N-isopropilacrilamida, N-isopropilmetacrilamida y N,N-dimetilacrilamida. Estos polímeros tienen un peso molecular mayor de aproximadamente 1.000.000, preferiblemente mayor de aproximadamente 1.500.000 y variar hasta aproximadamente 30.000.000. Es más preferido entre estos polímeros poliacrilamidas el polímero no iónico a la que se ha dado la designación CTFA poliacrilamida e isoparafina y laureth-7, disponible con el nombre comercial Sepigel 305 de Seppic Corporation (Fairfield, N.J.).

Otros polímeros oliacrilamidas útiles aquí incluyen copolímeros de bloques múltiples de acrilamidas y acrilamidas sustituidas con ácidos acrílicos y ácidos acrílicos sustituidos. Los ejemplos disponibles comercialmente de estos copolímeros de bloques múltiples incluyen Hypan SR150H, SS500V, SS500W, SSSA100H, de Lipo Chemicals, Inc. (Patterson, N.J.).

20 (iv) *Polisacáridos*

Una amplia variedad de polisacáridos son útiles aquí. Por "polisacáridos" se entienden agentes de gelificación que contienen una cadena principal de unidades de azúcar (es decir, hidrato de carbono) repetitivas. Los ejemplos no limitativos de agentes de gelificación polisacáridos incluyen los seleccionados del grupo constituido por celulosa, carboximetil hidroxietil celulosa, acetato propionato carboxilato de celulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietil etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, celulosa microcristalina, sulfato de celulosa sódico y mezclas de ellos. También son útiles aquí las celulosas sustituidas con alquilo. En estos polímeros, los grupos hidroxilo del polímero de celulosa están hidroxialquilados (preferiblemente hidroxietilados o hidroxipropilados) para formar una celulosa hidroxialquilada que se modifica después adicionalmente con un grupo alquilo de cadena recta o cadena ramificada C10-C30 a través de un enlace éter. Típicamente, estos polímeros son éteres de alcoholes de cadena recta o ramificada C10-C30 con hidroxialquilcelulosas. Los ejemplos de grupos alquilo útiles aquí incluyen los seleccionados del grupo constituido por estearilo, isoestearilo, laurilo, miristilo, cetilo, isocetilo, cocoilo (es decir, grupos alquilo derivados de los alcoholes de aceite de coco), palmitilo, oleilo, linoleilo, linolenilo, ricinoleilo, behenilo y mezclas de ellos. Entre los éteres alquil hidroxialquil celulosa está el material a la que se da la designación CTFA cetil hidroxietilcelulosa, que es el éter de alcohol cetílico e hidroxietilcelulosa. Este material se vende con el nombre comercial Natrosol® CS Plus de Aqualon Corporation.

(v) *Gomas*

Otros agentes de espesamiento y gelificación adicionales útiles aquí incluyen materiales que se derivan principalmente de fuentes naturales. Los ejemplos no limitativos de estas gomas agentes de gelificación incluyen materiales seleccionados del grupo constituido por acacia, agar, algina, ácido algínico, alginato amónico, amilopectina, alginato cálcico, carrageenano cálcico, carnitina, carrageenano, dextrina, gelatina, goma gelano, goma guar, cloruro de guar hidroxipropiltrimonio, hectorita, ácido hialurónico, sílice hidratada, hidroxipropil quitosán, hidroxipropil guar, goma karaya, quelpo, goma de semilla de algarrobo, goma natto, alginato potásico, carrageenano potásico, alginato de propilenglicol, goma esclerotio, sodio carboximetil dextrano, carrageenano sódico, goma tragacanto, goma xantano y mezclas de ellos.

(vi) *Copolímeros de viniléter/anhídrido maleico reticulados*

Otros agentes de espesamiento y gelificación adicionales útiles aquí incluyen copolímeros reticulados de alquil vinil éteres y anhídrido maleico.

(vii) *Poli(N-vinilpirrolidonas) reticuladas*

Las polivinil(N-pirrolidonas) reticuladas útiles aquí son agentes de espesamiento y gelificación adicionales. Estos agentes de gelificación contienen típicamente de alrededor del 0,25% a aproximadamente el 1% en peso de un agente de reticulación seleccionado del grupo constituido por divinil éteres y dialil éteres de dioles terminales que contienen de alrededor de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, divinil éteres y dialil éteres de polietilenglicoles que contienen de alrededor de 2 a aproximadamente 600 unidades, dienos que tienen de alrededor de 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono, divinilbenceno y vinil y alil éteres de pentaeritritol.

Las composiciones preferidas de la presente invención incluyen un agente de espesamiento seleccionado del grupo constituido por polímeros de ácidos carboxílicos, polímeros poliacrilatos reticulados, polímeros poliacrilamidas y mezclas de ellos, más preferiblemente seleccionado del grupo constituido por polímeros poliacrilatos reticulados, polímeros poliacrilamidas y mezclas de ellos.

ES 2 310 734 T3

Componentes opcionales

Las composiciones tópicas de la presente invención pueden comprender una amplia variedad de componentes opcionales, siempre que tales componentes opcionales sean compatibles física y químicamente con los componentes esenciales descritos aquí, y no perjudiquen indebidamente a la estabilidad, eficacia u otros beneficios de uso asociados con las composiciones de la presente invención. Los componentes opcionales pueden dispersarse, disolverse o simular en el vehículo de las presentes composiciones.

Los componentes opcionales incluyen agentes estéticos y agentes activos. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir, además de los componentes esenciales de la invención, absorbentes (incluyendo absorbentes de aceites tales como arcillas y absorbentes polímeros), abrasivos, agentes antiaglutinantes, agentes antiespumación, agentes antimicrobianos (por ejemplo, un compuesto capaz de destruir microbios, prevenir el desarrollo de microbios o prevenir la acción patógena de microbios y útil, por ejemplo, para controlar acné y/o conservar la composición tópica), aglomerantes, aditivos biológicos, agentes de tamponación, agentes de aumento de volumen, aditivos químicos, biocidas cosméticos, desnaturalizantes, astringentes cosméticos, astringentes de fármacos, analgésicos externos, formadores de película, humectantes, agentes opacificantes, fragancias, perfumes, pigmentos, colorantes, aceites esenciales, sensibilizantes de la piel, emolientes, agentes calmantes de la piel, agentes de curación de la piel, ajustadores del pH, plastificantes, agentes de conservación, aumentadores de agentes de conservación, propulsores, agentes reductores, agentes de acondicionamiento de la piel, agentes de aumento de la penetración de la piel, protectores de la piel, disolventes, agentes de suspensión, emulsionantes, agentes de espesamiento, agentes solubilizantes, polímeros para ayudar a las propiedades formadoras de película y sustantividad de la composición (tales como un copolímero de eicoseno y vinilpirrolidona, un ejemplo del cual está disponible de GAF Chemical Corporation como Genex® V-220), ceras, filtros solares, bloqueantes solares, absorbentes de la luz ultravioleta o agentes de dispersión, agentes de bronceado sin sol, antioxidantes y/o eliminadores de radicales, agentes de quelación, secuestrantes, agentes anti-acné, agentes anti-inflamatorios, anti-andrógenos, agentes de depilación, agentes de desescamación/exfoliantes, hidroxiácidos orgánicos, vitaminas y derivados de ellas (incluyendo vitaminas dispersables o solubles en agua tales como vitamina C y fosfatos de ascorbilo), compuestos que estimulan la producción de colágeno y extractos naturales. Tales otros materiales son conocidos en la técnica. Se describen ejemplos no exclusivos de tales materiales en *Pharmaceutical Dosage Forms-Disperse Systems*; Lieberman, Rieger & Banker, Vols. 1 (1988) & 2 (1989); o en el documento US 5.968.528.

La composición de la invención puede comprender un emoliente. El emoliente puede seleccionarse entre una o más de las siguientes clases: ésteres de triglicéridos que incluyen, aunque sin limitarse a ellos, grasas y aceites vegetales y animales, tales como aceite de ricino, manteca de cacao, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de hígado de bacalao, aceite de almendras dulces, aceite de aguacate, aceite de palma, aceite de sésamo, escualeno, aceite de kukui y aceite de soja; ésteres de acetoglicéridos, tales como monoglicéridos acetilados; glicéridos etoxilados, tales como monoestearato de glicerilo etoxilado; ésteres de alquilo de ácidos grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono que incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ésteres de metilo, isopropilo y butilo de ácidos grasos tales como laurato de hexilo, laurato de isohexilo, palmitato de isohexilo, palmitato de isopropilo, palmitato de metilo, oleato de decilo, oleato de isodecilo, estearato de hexadecilo, estearato de decilo, isoestearato de isopropilo, isoestearato de metilo, adipato de diisopropilo, adipato de diisohexilo, adipato de dihildecilo, sebacato de diisopropilo, lactato de laurilo, lactato de miristilo y lactato de cetilo; ésteres de alqueno de ácidos grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono tales como miristato de oleilo, estearato de oleilo y oleato de oleilo; ácidos grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono tales como ácidos pelargónico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, isoesteárico, hidroxiesteárico, oleico, linoleico, ricinoleico, araquídico, behénico y erúxico; alcoholes grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono tales como alcoholes laurílico, miristílico, cetílico, hexadecílico, estearílico, isoestearílico, hidroxiestearílico, oleílico, ricinoleílico, behenílico, erucílico y 2-octildodecanílico; lanolina y derivados de lanolina tales como lanolina, aceite de lanolina, cera de lanolina, alcoholes lanolínicos, ácidos grasos lanolínicos, lanolato de isopropilo, colesterol etoxilado, alcoholes lanolínicos propoxilados, alcoholes lanolínicos acetilados, linoleato de alcoholes lanolínicos, ricinoleato de alcoholes lanolínicos, acetato de ricinoleato de alcoholes lanolínicos, acetato de alcoholes-ésteres etoxilados, hidrogenólisis de lanolina, lanolina hidrogenada etoxilada y baes de absorción de lanolina líquida y semisólida; ésteres de alcoholes polivalentes tales como mono y diésteres de ácidos grasos de etilenglicol, mono y diésteres de ácidos grasos de dietilenglicol, mono y diésteres de ácidos grasos de polietilenglicol (200-6000), mono y diésteres de ácidos grasos de propilenglicol, monooleato de polipropilenglicol 2000, monoestearato de polipropilenglicol 2000, monoestearato de propilenglicol etoxilado, mono y diésteres de ácidos grasos de glicerilo, poliésteres grasos de poliglicerol, monoestearato de glicerilo etoxilado, monoestearato de 1,2-butilenglicol, diestearato de 1,2-butilenglicol, ésteres de ácidos grasos de sorbitán y ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán; ésteres ceras tales como cera de abejas, spermaceti, miristato de miristilo, estearato de estearilo; derivados de cera de abejas tales como polioxietilensorbitol cera de abejas, que son productos de reacción de cera de abejas con sorbitol etoxilado de contenido de oxígeno variable, formando una mezcla de éter ésteres; ceras vegetales incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, ceras de carnauba y de candelilla; fosfolípidos tales como lecitina y derivados; esteroides incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, colesterol y ésteres de ácidos grasos de colesterol; y amidas tales como amidas de ácidos grasos, amidas de ácidos grasos etoxiladas y alcanolamidas de ácidos grasos sólidas.

La composición puede comprender humectantes, por ejemplo, de los del tipo alcohol polivalente. Los alcoholes polivalentes típicos incluyen polialquilenglicoles y más preferiblemente alquilenpolioles y sus derivados, incluyendo propilenglicol, dipropilenglicol, polipropilenglicol, polietilenglicol y derivados de ellos, sorbitol, hidroxipropilsorbitol, eritritol, treitol, pentaeritritol, xilitol, glucitol, manitol, hexilenglicol, butilenglicol (por ejemplo, 1,3-butilenglicol),

ES 2 310 734 T3

hexanotriol (por ejemplo, 1,2,6-hexanotriol), glicerol, glicerol etoxilado, glicerol propoxilado, 2-pirrolidona-5-carboxilato sódico, colágeno soluble, ftalato de dibutilo, gelatina y mezclas de ellos.

Son componentes opcionales adicionales guanidina; ácido glicólico y sales glicolatos (por ejemplo, amonio y alquilamonio cuaternario); ácido láctico y sales lactatos (por ejemplo, amonio y alquilamonio cuaternario); aloe vera en cualquiera de su variedad de formas (por ejemplo, gel de aloe vera); derivados de azúcar y almidón (por ejemplo, glucosa alcoxilada); ácido hialurónico y sus derivados (por ejemplo, derivados sales tales como hialuranoato sódico); lactamida monoetanolamina; acetamida monoetanolamina; urea; pantenol; azúcares; almidones; fluidos de silicona; gomas de silicona; y mezclas de ellos. También son útiles los gliceroles propoxilados.

Realizaciones preferidas

Se investigaron cremas hidrófilas y lipófilas. Estas cremas se hacen de ingredientes altamente biocompatibles. En particular, las fases de lípidos de estos sistemas de cremas pueden hacerse de cualquier aceite vegetal, tal como aceite de oliva, aceite de almendras dulces, aceite de aguacate, aceite de jojoba y otros, de aceites minerales, tales como vaselina y otros, y/o de cualquier fase de aceite sintético, tales como ésteres de ácidos grasos y triglicéridos de cadena corta, media y larga. Para preparar estos sistemas pueden usarse tensioactivos aceptables dermatológicamente que sean capaces de proporcionar una cierta estabilidad fisicoquímica a cremas, por ejemplo, lecitina, tween 80 y similares. Se investigaron también formulaciones de base gel como formulaciones potenciales para la aplicación tópica de ácido valproico, sus sales y derivados. Pueden prepararse geles usando cualquier agente de viscosidad que sea capaz de proporcionar a las formulaciones las características reológicas deseadas. También en este caso, los agentes a usar para la preparación de formulaciones basadas en gel deben tener una cierta tolerabilidad por la piel humana, es decir, sepigel, zilgel, carbopol, goma xantano, gelatina, PVP y PEO.

Dosificación

Pueden emplearse niveles de dosis tópicos específicas para cualquier paciente particular dependiendo de una variedad de factores que incluyen la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta y la medicación previa, y la gravedad de la enfermedad particular del paciente, y la actividad de los compuestos específicos empleados, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación. Se apreciará que la dosificación apropiada de los compuestos activos, y de las composiciones que comprenden los compuestos activos, pueden variar de paciente a paciente. La determinación de la dosificación óptima implicará generalmente equilibrar el nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales de los tratamientos de la presente invención.

La administración tópica *in vivo* puede efectuarse en una dosis, continua o intermitentemente durante el transcurso del tratamiento. Los métodos para determinar el medio y las dosificaciones de administración más eficaces son muy conocidos por los expertos en la técnica y variarán con la formulación usada para terapia, el propósito de la terapia, la célula objetivo tratada y el sujeto tratado. Pueden realizarse administraciones simples o múltiples, seleccionándose el nivel y modelo de dosis por el médico que fije el tratamiento.

En general, una dosis adecuada del compuesto activo, es decir, VPA o una sal de VPA, comprende una concentración de al menos 0,1% en peso, preferiblemente del 0,1% al 6% en peso, más preferiblemente del 0,3% al 5%, más preferiblemente del 0,5% al 4% y aún más preferiblemente del 1% al 4% en peso, y el ingrediente activo se suspende en un vehículo aceptable farmacéuticamente. Cuando el ingrediente activo es una sal, un éster, profármaco o similar, la cantidad administrada se calcula sobre la base del compuesto progenitor y así el peso real a usar se aumenta proporcionalmente.

Si el compuesto activo, es decir, VPA o una sal de VPA, se usa en combinación con retinoides, una dosis adecuada de este compuesto activo está en el intervalo de al menos el 0,1% en peso, preferiblemente del 0,1% al 6% en peso, más preferiblemente del 0,3% al 5%, más preferiblemente del 0,5% al 4% y aún más preferiblemente del 1% al 4% en peso, y para el retinoide usado una dosis adecuada del compuesto activo está en el intervalo de alrededor del 0,01% a aproximadamente el 1% en peso, preferiblemente del 0,05% al 0,5% en peso.

Si el compuesto activo, es decir, VPA o una sal de VPA, se usa en combinación con 5-fluorouracilo, una dosis adecuada del compuesto activo está en el intervalo de al menos el 0,1% en peso, preferiblemente del 0,1% al 6% en peso, más preferiblemente del 0,3% al 5%, más preferiblemente del 0,5% al 4% y aún más preferiblemente del 1% al 4% en peso, y para 5-fluorouracilo una dosis adecuada del compuesto activo está en el intervalo de alrededor del 0,1% a aproximadamente el 10% en peso, preferiblemente del 1% al 10% en peso.

En una realización preferida de esta invención, VPA se usa tópicamente aplicado de una a tres veces al día con una dosis diaria total acumulada de 0,5 mg (miligramos) a 10 mg (miligramos) por lesión de aproximadamente 1 cm² (centímetro cuadrado). En una realización más preferida, VPA se usa tópicamente aplicado de una a tres veces al día con una dosis diaria total acumulada de 1 mg (miligramo) a 8 mg (miligramos) por lesión de aproximadamente 1 cm² (centímetro cuadrado). En una realización aún más preferida, VPA se usa tópicamente aplicado de una a tres veces al día con una dosis diaria total acumulada de 2 mg (miligramos) a 6 mg (miligramos) por lesión de aproximadamente 1 cm² (centímetro cuadrado). La dosis diaria real depende del tamaño de la lesión tratada, y por consiguiente aumenta con un tamaño de lesión aumentado, incluyendo lesiones de hasta aproximadamente 100 cm² (centímetros cuadrados) con aumentos consiguientes de las dosis diarias.

ES 2 310 734 T3

En otras realizaciones preferidas de la invención, la formulación tópica que contiene VPA se hace mediante una de las tres formulaciones siguientes que contienen los ingredientes listados (el contenido se presenta como % [p/p]).

Ejemplo de formulación 1

5	Aceite mineral blanco	20
	Alcohol cetílico	24
10	Cetomacrogol 1000	6
	Ácido valproico	> 0,1, por ejemplo, de 0,1 a 6
15	Vaselina blanca	añadir hasta 100

Ejemplo de formulación 2

20	Óxido de zinc	25
	Almidón	25
	Ácido valproico	> 0,1, por ejemplo, de 0,1 a 6
25	Vaselina blanca	añadir hasta 100

Ejemplo de formulación 3

30	Vaselina blanca	25
	Alcohol cetílico	10
35	Tween 60	5
	Glicerina	10
	EDTA	0,2
40	Perfume (opcionalmente)	2 gotas
	Valproato sódico	> 0,1, por ejemplo, de 0,1 a 6
45	Agua bidestilada	añadir hasta 100

Figuras

Figura 1

VPA potencia la inhibición del crecimiento de células inducida por tazaroteno (Taz)

La Figura 1 representa los resultados de ensayos de crecimiento realizados en queratinocitos inmortalizados humanos (células HaCaT), que demuestran que VPA usado solo y tazaroteno, un derivado de ácido retinoico, usado solo inhiben el crecimiento de células HaCaT, y que el uso de tazaroteno en combinación con el inhibidor de histona desacetilasa VPA es aún más eficaz para inhibir el crecimiento de células que cada fármaco usado solo (NT: sin tratamiento, Taz: tazaroteno, VPA1 + Taz1: VPA 1 mM + tazaroteno 1 μ M, VPA1 + Taz2: VPA 1 mM + tazaroteno 2 μ M).

Figura 2

VPA potencia la inhibición del crecimiento de células inducida por ácido retinoico (RA)

La Figura 2 muestra que VPA y RA usados solos inhiben el crecimiento de queratinocitos inmortalizados humanos (células HaCaT), y que VPA potencia la inhibición del crecimiento de células inducida por ácido retinoico en estas células cuando ambos fármacos se usan en combinación (NT: sin tratamiento, RA: ácido retinoico, VPA1 + RA1: VPA 1 mM + ácido retinoico 1 μ M, VPA1 + RA2: VPA 1 mM + ácido retinoico 2 μ M).

ES 2 310 734 T3

Figura 3

VPA potencia la inhibición del crecimiento de células inducida por 5-fluorouracilo (5-FU)

5 La Figura 3 muestra que VPA y 5-FU solos inhiben el crecimiento de células HaCaT, y que combinaciones de 5-FU (usado en las concentraciones indicadas) más VPA son aún más eficaces para inhibir el crecimiento de células HaCaT que cada fármaco usado solo (NT: sin tratamiento, 5-FU: 5-fluorouracilo, VPA se usa en combinación con 5-FU en una concentración de 1 mM)

10

Figura 4

VPA induce la detención del ciclo de células de queratinocitos humanos

15 La Figura 4 indica que VPA solo induce la detención del ciclo de células en queratinocitos inmortalizados humanos (células HaCaT).

Figura 5

20

VPA potencia la apoptosis inducida por tazaroteno

25 La Figura 5 demuestra que tazaroteno y VPA usados solos inducen apoptosis de células HaCaT y que combinaciones de tazaroteno más VPA son aún más eficaces para inducir apoptosis en estas células, que cada fármaco usado solo (NT: sin tratamiento, Taz: tazaroteno, VPA1 + Taz1: VPA 1 mM + tazaroteno 1 μ M, VPA1 + Taz2: VPA 1 mM + tazaroteno 2 μ M).

Figura 6

30

VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p) permea la piel humana

35 La Figura 6 muestra la manera de permeación dependiente del tiempo de la piel humana con VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p).

Figura 7

40

VPA induce la acetilación de histona H4 en queratinocitos

45 La Figura 7 muestra la acetilación de histona H4 inducida por VPA en células HaCaT de una manera dependiente de la dosis.

Figura 8

50

VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p) induce acetilación de células de la piel en ratones

55 La Figura 8 representa la acetilación de histona H4 en células de la piel de ratones tratados con VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p).

Figura 9

60

VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p) induce acetilación de células de la piel en ratones

65 La Figura 9 muestra la acetilación de histona H4 en células de la piel de ratones inducida por aplicación tópica de VPA al 3% (p/p). con mayor aumento en comparación con la presentación de la Figura 8.

Figura 10

70

VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p) induce acetilación de núcleos de BCC

75 La Figura 10 muestra la inducción de acetilación de histona H4 en núcleos de carcinoma de células basales (BCC) humano tras aplicación tópica de VPA al 3% (p/p).

ES 2 310 734 T3

Figura 11

VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p) potencia los efectos de tazaroteno en el tratamiento de BCC's superficiales

5 La Figura 11 muestra ejemplos de tres pacientes representativos antes del tratamiento y después de 8 semanas de tratamiento tópico combinado con tazaroteno aplicado al 0,1% (p/p) y con VPA aplicado al 3% (p/p).

Figura 12

10

Modulación de citoquinas inflamatorias por TSA y VPA en queratinocitos y linfocitos de sangre periférica humanos

La Figura 12 muestra modulación de la expresión de mRNA de genes relevantes inmunológicamente tales como citoquinas inflamatorias por inhibidores de HDAC tras estimulación con LPS o PMA/Ion (Ejemplo 12).

15

Figura 13

Modulación de citoquinas inflamatorias por diferentes inhibidores de HDAC

20

La Figura 13 muestra modulación de la expresión de mRNA de genes relevantes inmunológicamente tales como citoquinas inflamatorias por inhibidores de HDAC tras estimulación con PMA/Ion (Ejemplo 12).

Figura 14

Modulación de citoquinas inflamatorias por inhibidores de HDAC en linfocitos de sangre periférica

25 La Figura 14 muestra modulación de la expresión de mRNA de genes relevantes inmunológicamente tales como citoquinas inflamatorias por inhibidores de HDAC tras estimulación con CD3/CD28 (Ejemplo 12).

30

Figura 15

35 *Modulación de la expresión de IL-2 y TNF- α por inhibidores de HDAC en linfocitos de sangre periférica*

La Figura 15 muestra modulación de la expresión de proteína de genes relevantes inmunológicamente tales como citoquinas inflamatorias por inhibidores de HDAC tras estimulación con CD3/CD28 (Ejemplo 12).

40

Figura 16

Modulación de la expresión de IL-2 y TNF- α por inhibidores de HDAC en linfocitos de sangre periférica estimulados con mAbs PMA/ION y CD3/CD28

45

La Figura 16 muestra modulación de la expresión de proteína de genes relevantes inmunológicamente tales como citoquinas inflamatorias por inhibidores de HDAC (Ejemplo 12).

Figura 17

Programa de tratamiento con VPA de un paciente a partir de una prueba de fase I/II

50 La Figura 17 muestra un programa de terapia clínica usando el inhibidor de HDAC VPA en un paciente con cáncer (Ejemplo 13).

55

Figura 18

60 *VPA induce hiperacetilación de histona y regulación de genes marcadores en sangre periférica de pacientes a partir de una prueba de fase I/II*

La Figura 18 muestra la inducción con éxito de acetilación de histona y regulación hacia abajo de la proteína HDAC-2 en células de sangre periférica de un paciente tratado con el inhibidor de HDAC VPA según el programa de tratamiento representado en la Figura 17 (Ejemplo 13).

65

Figura 19

Modulación de citoquinas inflamatorias por VPA de un paciente en una prueba de fase I/II

5 La Figura 19 muestra la modulación de la expresión de mRNA y proteína con éxito de genes relevantes inmunológicamente tales como citoquinas inflamatorias usando el inhibidor de HDAC VPA en un paciente según el programa de tratamiento representado en la Figura 17 tras estimulación con CD3/CD28 (Ejemplo 13).

Ejemplos

10

Ejemplo 1

15 Inhibición del crecimiento de células e inducción de apoptosis sinérgicas en queratinocitos inmortalizados humanos (células HaCaT) por tratamiento con VPA o el derivado de ácido retinoico tazaroteno solos o por combinación de VPA y tazaroteno (Figuras 1 y 5).

Métodos

20 *Ensayo MTT*: Este ensayo colorimétrico detecta la formación de formazano, que es proporcional al número de células presentes. Se separó medio de cultivo de tejidos que contenía fármacos y se añadieron a cada pocillo 200 μ l de DME que contenía 2 mg/ml de MTT (bromuro de (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Se incubaron placas de 96 pocillos a 37°C y 10% de CO₂ durante 30 minutos. Se separó después medio que contenía MTT y las células se lavaron una vez con PBS. Tras la separación de la PBS, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de DMSO y se pusieron las placas en un sacudidor de plataforma rotativa durante 5 minutos. Los resultados se obtuvieron leyendo la absorbancia a 25 una longitud de onda de 550 nm usando un espectrofotómetro. Los resultados se expresan como porcentajes asignando al testigo como 100%.

30 *Ensayos de apoptosis*: La apoptosis se midió por un citómetro de flujo Beckton Dickinson FACScalibur analizando el porcentaje de células que contenían ADN de Sub-G1. Se registraron para cada muestra 10.000 casos. La escala de multiplicación fue lineal para todos los parámetros. La tensión del fotomultiplicador se fijó para poner el contenido de ADN de pico correspondiente a células en G0/G1 en el canal 300 en los gráficos de FL2-H frente a SCC-H. Las células que mostraban un contenido de ADN menor del pico (células hipodiploides) y alto SSC-H (células condensadas elevadas granulares) se consideraron apoptóticas. Los experimentos se repitieron tres veces por duplicado. Las barras de errores representan 1 desviación típica.

35

Resultados

40 La Figura 1 representa gráficamente los resultados de ensayos de crecimiento realizados en queratinocitos inmortalizados humanos (células HaCaT), tratados durante tres días con los compuestos indicados. Los fármacos se añadieron el mismo día de puesta en placa (día 0). El ensayo MTT (para medir la proliferación de células) se realizó el día 3. Se usaron diversas combinaciones de los fármacos en los ensayos de crecimiento. Como puede verse, VPA y tazaroteno usados solos inhibieron el crecimiento de células, y las combinaciones de tazaroteno más el inhibidor de histona desacetilasa VPA fueron aún más eficaces para inhibir el crecimiento de células que la inhibición de ambos fármacos solos medidas por el ensayo MTT.

45

50 De modo similar, VPA potencia la apoptosis inducida por tazarofeno en células HaCaT (Figura 5). Las células se pusieron en placa en pocillos de 35 mm de diámetro el día 0. Los fármacos se añadieron el día 1. El ensayo de apoptosis se realizó el día 2. VPA indujo un claro aumento del contenido de ADN de subG1, indicando que induce apoptosis de queratinocitos inmortalizados humanos HaCaT. Como puede verse en la Figura 5, las combinaciones de tazaroteno más VPA eran más eficaces para inducir apoptosis que la proporción de apoptosis vista con ambos fármacos usados solos. Así, la actividad combinatoria de estos dos fármacos debe explicarse mediante actividad sinérgica de este tratamiento.

55 Ejemplo 2

Inhibición del crecimiento de células e inducción de apoptosis sinérgicas en queratinocitos inmortalizados humanos (células HaCaT) por tratamiento con VPA o ácido retinoico (RA) solos o por combinación de VPA y ácido retinoico (RA) (Figura 2).

60

Método

Ensayo MTT: para tener detalles, véase Ejemplo 1.

65 *Resultados*

Como puede verse en la Figura 2, VPA y RA usados solos inhibieron el crecimiento de queratinocitos humanos HaCaT, y VPA potenció todavía la inhibición del crecimiento de células inducido por RA cuando ambos fármacos

ES 2 310 734 T3

se usaron en combinación. Las células se pusieron en placas en pocillos el día 0. Después, se añadieron fármacos en las concentraciones indicadas (VPA1 + RA1: VPA 1 mM + ácido retinoico 1 μ M, VPA1 + RA2: VPA 1 mM + ácido retinoico 2 μ M). El ensayo MTT se realizó el día 3. Se usaron también diversas combinaciones de los fármacos en los ensayos de crecimiento. Las combinaciones de RA más el inhibidor de histona desacetilasa VPA fueron aún más eficaces para inhibir el crecimiento de células que cada fármaco usado solo como se midió por el ensayo MTT. Así, la actividad combinatoria de estos dos fármacos debe explicarse mediante actividad sinérgica de este tratamiento.

Ejemplo 3

Inhibición del crecimiento de células e inducción de apoptosis sinérgicas en queratinocitos inmortalizados humanos (células HaCaT) por tratamiento con VPA o 5-fluorouracilo solos o por combinación de VPA y 5-fluorouracilo (5-FU) (Figura 3).

Método

Ensayo MTT: para tener detalles, véase Ejemplo 1.

Resultados

VPA y 5-FU usados solos inhibieron el crecimiento de células HaCaT, y VPA potenció la inhibición del crecimiento inducida por 5-FU en estas células cuando ambos fármacos se usaron en combinación (Figura 3). Los fármacos se añadieron el mismo día de puesta en placa (día 0). El ensayo MTT (para medir la proliferación de células) se realizó al tercer día. Se usaron 5-FU 5 μ M o 10 μ M y VPA 1 mM. Las combinaciones de 5-FU más el inhibidor de HDAC VPA fueron más eficaces para inhibir el crecimiento de células que cada fármaco usado solo, como se midió por el ensayo MTT. Así, esta actividad combinatoria de estos dos fármacos debe explicarse mediante actividad sinérgica de este tratamiento.

Ejemplo 4

VPA induce la detención del ciclo de células en queratinocitos inmortalizados humanos (células HaCaT) (Figura 4).

Método

Ensayos de incorporación de BrdU: Se detectó proliferación de células marcando células con BrdU. Después de 24 horas de tratamiento con VPA en las concentraciones indicadas, se incubaron células con BrdU (1:100) según el método del fabricante (ZYMED, San Francisco, CA). Las células se incubaron durante 1 hora en el medio de cultivo y se fijaron después con etanol del 70%. El BrdU incorporado se detectó por el método de inmunoperoxidasa indirecto (Amersham, Arlington Heights, IL). Brevemente, las células de cultivo se incubaron primero durante 1 hora con anticuerpo anti-BrdU de biotina-ratón. Después de lavar en tampón TTBS (tris 20 mM, NaCl 500 mM, 0,05% de Tween-20, pH 7,5), se incubaron adicionalmente las células con inmunoglobulinas anti-ratón de cabra biotinadas durante 10 min. Las células se lavaron después e incubaron con conjugado de enzima (peroxidasa) durante 10 min a temperatura ambiente. La inmunorreactividad se reveló por adición de sustrato-cromógeno. Las células positivas se contaron en 10 campos microscópicos elegidos aleatoriamente.

Resultados

Las células HaCaT se pusieron en placa en pocillos de 35 mm de diámetro el día 0. Se añadió VPA en las concentraciones indicadas el día 0. El ensayo de BrdU se realizó el día 2. Como puede verse en la Figura 4, VPA produce una reducción dependiente de la dosis de las células positivas en BrdU, indicando que induce detención del ciclo de células y/o pérdida de viabilidad de células de queratinocitos humanos.

Ejemplo 5

VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p) permea la piel humana de una manera dependiente del tiempo (Figura 6).

Métodos

Preparación de una formulación acuosa de VPA, de aplicación tópica: Se preparó una formulación tópica de valproato sódico dispersando Sepigel (Sepic, Milán, Italia) (2% p/p) y vaproato sódico (3% p/p) en la cantidad oportuna de agua destilada con agitación constante a temperatura ambiente. El gel resultante se guardó a temperatura ambiente durante 24 h antes de usar.

Ensayo de permeación de la piel in vitro: Los análisis se realizaron usando una celda de difusión de vidrio de tipo Franz (LGA, Berkeley, CA, EE.UU.) montada con membranas que llevaban stratum corneum y epidermis (SCE).

ES 2 310 734 T3

Se obtuvieron muestras de piel de seres humanos adultos (edad media 29 ± 5 años) a partir de cirugía de reducción abdominal. La grasa subcutánea se recortó y las muestras de piel se sumergieron en agua destilada a 60°C durante 1 min; se exfoliaron después el stratum corneum y la epidermis (SCE). Las muestras de SCE se secaron a temperatura ambiente en un desecador mantenido en aproximadamente el 25% de humedad relativa. Las muestras secas se envolvieron en hoja de aluminio y se guardaron a 4°C hasta usar. Las muestras de SCE seco se rehidrataron por inmersión en agua destilada a temperatura ambiente durante 1 h antes de montarse en celdas de difusión de Franz. La superficie específica de piel expuesta fue $0,75\text{ cm}^2$ y el volumen de receptor fue 4,5 ml. La solución receptora, una solución del 0,9% (p/p) de NaCl, se agitó y se termostató a 35°C durante los experimentos. La integridad de la barrera de la piel de las membranas de SCE usadas en este método se ensayó determinando su coeficiente de permeabilidad de agua tritiada (Kp). Se encontró que los valores Kp eran $1,58 \pm 0,3 \times 10^{-3}\text{ cm h}^{-1}$ de acuerdo con los indicados previamente en la bibliografía correspondiente (Bronaugh *et al.*, 1986, J Invest Dermatol 87, 451-3). Se aplicó tópicamente valproato sódico (valproato) al 3% (p/p) a la superficie de piel. Cada experimento se realizó por duplicado en tres donantes de piel diferentes. Las muestras de la solución receptora se retiraron en diferentes momentos durante el período experimental (10 h); los volúmenes de muestras se sustituyeron por las mismas cantidades de solución nueva. Se analizó el contenido de valproato sódico de todas las muestras mediante una HPLC con detección espectrofluorimétrica. Los resultados se expresaron como cantidad total permeada (mg).

Determinación cuantitativa de valproato sódico: Para determinar valproato sódico, se derivaron muestras con 4-bromometil-7-metoxicumarina (BMMC). Se usó como patrón interno ácido ciclohexanocarboxílico. La derivación se realizó como se ha indicado previamente (Bousquet *et al.*, 1991, Pharmazie 46, 257-8). El análisis se realizó con un sistema cromatográfico consistente en un cromatógrafo de líquido Hewlett Packard 1050 equipado con una válvula de inyección de $20\ \mu\text{l}$ Rheodyne modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, CA). El análisis cromatográfico se realizó con una columna Hypers II ODS de $5\ \mu\text{m}$ (Policonsult, Roma, Italia). La fase móvil fue $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (65/35 v/v) con un caudal de 1 ml/min. La detección se realizó a 310 nm.

Resultados

La Figura 6 muestra los resultados de ensayos de permeación *in vitro*. Se prepararon muestras de piel humana de adulto (la superficie específica de piel fue $0,75\text{ cm}^2$) como se ha descrito en la sección de métodos. Se aplicó tópicamente una cantidad apropiada de valproato sódico (valproato) al 3% (p/p) a la superficie de piel puesta en las celdas de difusión de vidrio de tipo Franz. Cada experimento se realizó por duplicado en tres donantes de piel diferentes. Las muestras de la solución receptora se retiraron en diferentes momentos durante el período experimental (10 h); los volúmenes de muestras se sustituyeron por las mismas cantidades de solución nueva. Se analizó el contenido de valproato sódico de todas las muestras mediante una HPLC con detección espectrofluorimétrica. Los resultados se expresaron como cantidad total permeada (mg). El VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p) permea la piel de una manera dependiente del tiempo. Así, VPA es capaz de penetrar eficazmente en la piel humana si se aplica tópicamente.

Ejemplo 6

VPA induce la acetilación de histona H4 en queratinocitos inmortalizados humanos (células HaCaT) de una manera dependiente de la concentración (Figura 7).

Método

Manchas de western: Las células HaCaT se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos 24 horas antes del tratamiento. Los cultivos se trataron con las concentraciones indicadas de VPA y/o tazaroteno durante 24 horas. Se prepararon extractos de células completos por lisis de células en tampón RIPA más inhibidores de proteasa para desnaturalizar electroforesis en gel de SDS en un gel de poliacrilamida desnaturalizante del 12%. La histona H4 acetilada se detectó por análisis de manchas de western usando un anticuerpo anti-H4 acetilada (clon T25; véase solicitud de patente EP 02.021984.6) y se confirmó una expresión testigo de igual carga de β -actina usando un anticuerpo anti-actina (Sigma, N° de Cat. A5441).

Resultados

En la Figura 7, el panel superior muestra un inmunomanchas de anti-histona H4 acetilada representativo de lisado de células totales de células HaCaT que se trataron como se ha indicado. El panel inferior muestra un inmunomanchas anti-actina de un gel réplica como testigo de carga. Las células se pusieron en placas de 6 pocillos el día 0. Los fármacos se añadieron el día 1, y las células se lisaron el día 2 con tampón RIPA más inhibidores de proteasa. Se separaron $40\ \mu\text{g}$ del lisado de células totales por SDS PAGE del 12,5% y se sometieron a inmunomanchas con los anticuerpos indicados. Como puede verse en la Figura 7, VPA induce la hiperacetilación de histona H4 de una manera dependiente de la dosis.

ES 2 310 734 T3

Ejemplo 7

(Ejemplo de referencia)

- 5 VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p) induce acetilación de histona H4 en núcleos de células de piel de ratón (Figuras 8 y 9) y células de carcinoma de células basales (BCC) (Figura 10).

Métodos

- 10 *Inmunohistoquímica:* Se aplicaron a la piel de ratones desprovistos atímicos VPA (valproato) aplicado tópicamente al 3% (p/p) (véase Ejemplo 5 para tener detalles de formulación) o una formulación placebo. De modo similar, después de dar un consentimiento informado, se aplicó tópicamente VPA al 3% (p/p) o una formulación placebo a lesiones de BCC de pacientes 16-20 horas antes de excisión quirúrgica. Se fijaron en acetona a temperatura ambiente durante 10 min secciones de piel de criostato de 3 μ m de espesor. Antes de colorear con anticuerpo anti-H4 acetilada (clon T25, véase antes), el tejido se bloqueó por preincubación con fragmentos F(ab')₂ derivados de inmunoglobulina anti-ratón de cabra (Cappel) (dilución 1/10000 en solución salina tamponada con Tris 50 mM, TBS) durante 30 min. Después de enjuagar con TBS durante 10 min, las secciones se incubaron con anticuerpo anti-H4 acetilada (clon T25) (dilución 1/4000 en TBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se incubaron los especímenes con el suero anti-ratón de conejo y se trataron con inmunocomplejo APAAP (fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina) como se ha descrito antes. La coloración positiva se reveló en color rojo con fosfato de naftol-AS-BI como sustrato y New Fuchsin (Dako) como cromógeno. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada a un aparato de microscopía óptica.

Resultados

- 25 Se congelaron biopsias de piel en nitrógeno líquido inmediatamente después de la excisión. Se realizó después inmunohistoquímica en secciones de 3 μ m como se ha descrito en métodos. Se elaboraron en paralelo biopsias de piel tratada tópicamente con placebo o VPA, se tomaron fotografías con un aparato de microscopía óptica conectado a una cámara digital con la misma intensidad de luz.

- 30 Como puede verse claramente en las Figuras 8 y 9, un tratamiento tópico con VPA indujo un claro aumento de la acetilación de histona H4 en células de piel de ratones desprovistos atímicos y, lo que es más importante, en células de BCC y células de piel normales de pacientes (Figura 10). Estos datos demuestran que VPA aplicado tópicamente a la piel puede inducir eficazmente la hiperacetilación de células de piel.

Ejemplo 8

(Ejemplo de referencia)

- 40 VPA potencia los efectos de tazaroteno en el tratamiento de BCC's superficiales como puede verse en fotografías de tres pacientes representativos antes y después de 6 semanas de tratamiento tópico con tazaroteno aplicado al 0,1% (p/p) y VPA aplicado al 3% (p/p) (Figura 11).

Método

- 45 Después de dar su consentimiento informado, 10 pacientes (6 hombres, 4 mujeres) de edad media 68 años se inscribieron y se trataron tópicamente con tazaroteno al 0,1% (p/p) y con VPA aplicado tópicamente al 3% (p/p) una vez al día durante 8 semanas. Se trataron 10 lesiones: 8 BCCs superficiales y 2 BCCs pigmentadas, 4 de estas lesiones ya se habían pre-tratado con tazaroteno solo durante al menos 16-20 semanas, y parecían ser completamente resistentes a este tratamiento, es decir, no se observó reducción del diámetro del tumor bajo tratamiento con tazaroteno. Se aplicó tópicamente VPA una vez al día 15-30 minutos antes de aplicar tazaroteno. Las lesiones se evaluaron clínicamente y se fotografiaron cada dos semanas.

Resultados

- 55 El tratamiento de pacientes con BCC usando VPA y tazaroteno aplicados tópicamente condujo a una regresión > 50% (medida por reducción de diámetro) de todas las lesiones en 6 a 8 semanas de tratamiento. Estos resultados se observaron en los pacientes no tratados previamente y en los expuestos previamente a tazaroteno solo. De manera interesante, se ha encontrado que el tazaroteno usado solo induce regresión en un cierto número de BCC's (aproximadamente el 50%), pero la regresión es usualmente lenta (12-24 semanas) y va acompañada por varios efectos secundarios indeseados (tales como dolor y picor). Sin embargo, el tratamiento tópico usando VPA y tazaroteno en combinación acelera aparentemente la respuesta a tazaroteno, reduciendo también la duración de los efectos secundarios indeseados causados por tazaroteno.

- 65 Estos resultados confirman que VPA puede potenciar el efecto de otros compuestos (tales como tazaroteno) en células tumorales, particularmente de tumores de la piel, y muestran que, en el caso de BCC resistente a tazaroteno, el VPA puede convertir una forma resistente de un tumor en una sensible. En conjunto, estos resultados confirman la eficacia de VPA en el tratamiento tópico de trastornos hiperproliferativos de la piel.

ES 2 310 734 T3

Ejemplo 9

Ejemplo de formulación (ungüento)

5	Aceite mineral blanco	20%
	Alcohol cetílico	24%
	Cetomacrogol 100	6%
10	Ácido valproico	3%
	Vaselina blanca	añadir hasta 100%

15

Ejemplo 10

Ejemplo de formulación (pasta)

20	Óxido de zinc	25%
	Almidón	25%
	Ácido valproico	3%
25	Vaselina blanca	añadir hasta 100%

Ejemplo 11

30

Ejemplo de formulación (crema)

	Vaselina blanca	25%
35	Alcohol cetílico	10%
	Tween 60	5%
	Glicerina	10%
40	EDTA	0,2%
	Valproato sódico	3%
45	Agua bidestilada	añadir hasta 100%

Ejemplo 12

50 Modulación de la expresión de proteínas relevantes inmunológicamente tales como citoquinas inflamatorias. El tratamiento de queratinocitos inmortalizados humanos y linfocitos de sangre periférica con diferentes inhibidores de HDAC produce una reducción de las citoquinas inflamatorias (Figuras 12 a 16).

Métodos

55

Aislamiento de ARN total de queratinocitos inmortalizados humanos

60 Se sembraron queratinocitos inmortalizados humanos (células HaCaT) con una densidad de 2,5 millones de células por ml en matraces de 75 cm². Las células se dejaron sin tratar o se preincubaron con tricostatina A (TSA) 200 nM o ácido valproico (VPA) 5 mM durante 4 horas a 37°C seguido por estimulación subsiguiente con lipopolisacárido (LPS) (100 ng/ml). Después de 24 horas a 37°C, se lisaron células y se aisló el ARN total usando el minijuego RNeasy de Qiagen.

Aislamiento y tratamiento de células mononucleares de sangre periférica

65

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica agotadas de monocitos y macrófagos de adultos que lo consintieron mediante separación usando Ficoll-Hypaque. La fracción de células mononucleares de sangre periférica

ES 2 310 734 T3

(PBMC) se lavó y sembró en placas petri de 9 cm. Después de una incubación de 2 horas a 37°C para separar buena parte de los monocitos, macrófagos y células B, las células no adherentes se recogieron y cultivaron en matraces de 175 cm² durante 2 días. Las células se cosecharon y ajustaron a 3 millones de células por ml. Se transfirieron partes alícuotas de 500 µl a cada pocillo de placas de fondo plano de 24 pocillos. Los linfocitos de sangre periférica (PBL's) se trataron con diversas concentraciones de inhibidores de HDAC como se indica. Después de un tiempo de incubación de 2 horas a 37°C, se estimularon las células con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)/ionomicina (Ion) o se activaron mediante complejo receptor de células T (TCR/CD3) con 10 µg/ml de mAb anti-CD3 (OKT3) y 2,5 µg/ml de mAb anti-CD28. Después de 24 horas a 37°C, se separó el sobrenadante y se congeló para ensayos de citoquina. Los glóbulos de células se lisaron y se aisló el ARN total usando el minijuego RNeasy de Qiagen.

10 RT-PCR y PCR semicuantitativa

Un microgramo de ARN total se transcribió a cADN por métodos estándares usando transcriptasa inversa y un cebador oligo-dT (Invitrogen). Para PCR semicuantitativa, se multiplicaron por PCR 2 µl de cADN usando cebadores específicos. Los cebadores para PCR se sintetizaron por MWG y son como sigue:

GAPDH: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG -3' (SEQ ID NO:1) y
5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3' (SEQ ID NO:2);

20 **IL-2:** 5'-ATGTACAGGATGCAACTCCT-3' (SEQ ID NO:3) y
5'-TCAAGTTAGTGTTGAGATGA-3' (SEQ ID NO:4);

IL-4: 5'-ATGGGTCTCACCTCCAACT-3' (SEQ ID NO:5) y
25 5'-TCAGCTCGAACACTTTGAAT-3' (SEQ ID NO:6);

IL-5: 5'-ATGAGGATGCTTCTGCATTTGAG-3' (SEQ ID NO:7) y
5'-TCCACTCGGTGTTTCATTACACC-3' (SEQ ID NO:8);

30 **IL-6:** 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCC-3' (SEQ ID NO:9) y
5'-CTACATTTGCCGAAGAGCCCTCAG-3' (SEQ ID NO:10);

IL-8: 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGC-3' (SEQ ID NO:11) y
35 5'-TTATGAATTCTCAGCCCTCTTC-3' (SEQ ID NO:12);

IL-10: 5'-TTGCCTGGTCCTCCTGACTG-3' (SEQ ID NO:13) y
5'-GATGCTGGGTCTTGGTTCT-3' (SEQ ID NO:14);

40 **IL-12:** 5'-ATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATC-3' (SEQ ID NO:15) y
5'-CTATAGTAGCGGTCCTGGGC-3' (SEQ ID NO:16);

TNF-α: 5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGG-3' (SEQ ID NO:17) y
45 5'-TCACAGGGCAATGATCCCAAAG-3' (SEQ ID NO:18);

IFN-γ: 5'-ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTT-3' (SEQ ID NO:19) y
5'-TTACTGGGATGCTCTTCGAC-3' (SEQ ID NO:20)

50 ELISA de IL-2 y TNF-α

Para realizar ELISAs, se recogieron sobrenadantes de PBL's tratados y sin tratar y se midieron IL-2 así como TNF-α usando el Duo Set ELISA Development System (R&D Systems) como se describe por el fabricante.

55 Manchas de western

Se prepararon extractos de células completos por lisis de células en tampón de lisis incluyendo inhibidores de proteasa. Los lisados se separaron por electroforesis en gel de SDS y se transfirieron a membranas de PVDF. Las histonas H3 y H4 acetiladas se detectaron por análisis de manchas de western usando un anticuerpo anti-H3 acetilada (Upstate, 06-942), un anticuerpo anti-H4 acetilada (clon T25; solicitud de patente EP 02.021984.6) y un anticuerpo anti-β-actina. El anticuerpo de β-actina se usó como testigo para igual carga.

Resultados

65 El tratamiento de células con TSA y otros inhibidores de HDAC conduce a hiperacetilación de histonas y modulación de la transcripción. Por tanto, se estudió el efecto de TSA y otros inhibidores de HDAC en el nivel de expresión de mRNA de citoquina por análisis de RT-PCR semicuantitativa y secreción de citoquina por ELISA.

ES 2 310 734 T3

Se cultivaron queratinocitos inmortalizados humanos (HaCaT) durante 24 horas en ausencia o presencia de TSA o VPA, respectivamente. Después de una preincubación de 4 horas con los inhibidores de HDAC, se usó LPS para inducir producción de citoquina. El nivel de expresión de mRNA de citoquina se muestra por RT-PCR semicuantitativa (Figura 12). La electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR mostró una disminución significativa del nivel de mRNA de TNF- α e IL-6 en células tratadas con TSA y VPA en comparación con testigo no tratado aunque estimulado (Figura 12A). En estas condiciones, mRNA de GAPDH como testigo interno permaneció inafectado. Aunque la inducción de IFN- γ por estimulación con LPS fue sólo moderada, el transcripto de mRNA de IFN- γ fue virtualmente inafectado por exposición a TSA, pero reducido significativamente por VPA.

Se obtuvieron resultados similares usando linfocitos de sangre periférica (PBLs) (Figura 12B). Se preincubaron PBLs aislados con TSA y VPA durante 2 horas, seguido por estimulación con PMA/Ion durante 24 horas a 37°C. La Figura 12B muestra el efecto de TSA y VPA sobre transcritos de mRNA de IL-4 e IL-6. La tricostatina A (TSA) así como VPS redujeron significativamente la estimulación de IL-4 mediada por PMA/Ion. Mientras que sólo se encontraron efectos moderados en el mRNA de IL-6 después de tratamiento con TSA, el VPA disminuyó el mRNA de IL-6 hasta el nivel visto en la muestra no estimulada.

Además, las Figuras 13A y B muestran que otros inhibidores de HDAC tales como ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), G2M-701, G2M-702 y G2M-707 pueden modular la expresión de citoquina.

Como se muestra en la Figura 13, diversos inhibidores de HDAC disminuyeron la expresión de transcritos de mRNA de IL-4 e IL-6, pero no modificaron la expresión de mRNA de GAPDH. En estas condiciones, el mRNA de IL-8 permaneció estable, demostrando que la activación celular por PMA/Ion no modifica la expresión de este gen.

En comparación, el efecto de inhibidores de HDAC en el nivel de transcripción de IL-2 e IFN- γ fue aún más acusado cuando se activaron células T por el complejo receptor de células T usando anticuerpos de CD3 y CD28 como se muestra en la Figura 14. Se preincubaron PBLs con los inhibidores de HDAC TSA, SAHA, VPA, G2M-701 o el esteroide anti-inflamatorio dexametasona (Dex), VPA y G2M-701 se usaron en dos concentraciones diferentes. Las células se activaron mediante el complejo receptor de células T (TCR/CD3) usando anticuerpos de CD3 y CD28 durante 24 horas. Como se muestra en las Figuras 14A y B, los transcritos de mRNA de varias citoquinas se redujeron significativamente por todos los inhibidores de HDAC usados con pequeñas diferencias. La Figura 14C muestra un análisis de manchas de western usando anticuerpos contra histonas H3 acetilada y H4 acetilada así como β -actina como testigo para igual carga, presentando la inducción con éxito de hiperacetilación de histonas por inhibidores de HDAC.

Podrían obtenerse resultados similares en consecuencia con experimentos de PCR semicuantitativa analizando los niveles de proteína de IL-2 y TNF- α segregados en sobrenadantes de cultivo de PBL por ELISA como se representa en la Figura 15. Para realizar un análisis dosis-respuesta, se trataron PBLs con concentraciones crecientes de VPA, G2M-701, G2M-702 y G2M-707 durante dos horas, seguido por activación con mAbs de CD3 y CD28 durante 24 horas a 37°C. Se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó por ELISA la secreción de IL-2 así como TNF- α . El tratamiento de PBLs con VPA, G2M-701, G2M-702 y G2M-707 produjo una inhibición dependiente de la dosis de la secreción de IL-2 y TNF- α . Mientras que 0,5 mM y 1 mM del inhibidor VPA tuvieron sólo un efecto moderado, 5mM redujo significativamente la secreción de IL-2.

Esto fue aún más prominente en otros experimentos como se muestra en la Figura 16, en los que ya 1 mM de VPA mostró una disminución significativa en la secreción de IL-2 así como de TNF- α . La inhibición de la expresión de IL-2 y TNF- α fue todavía más eficaz con los otros inhibidores de HDAC y fue máxima con 6 μ M de G2M-701, 3 μ M de G2M-702 y 1 μ M de G2M-707 (Figura 15).

Tomados conjuntamente, estos resultados demostraron que inhibidores de HDAC tales como VPA, G2M-701, G2M-702 y G2M-707 inhiben la inducción mediada por PMA/Ion (Figuras 12, 13 y 16) y TCR/CD3 (Figuras 14, 15 y 16) de expresión de citoquina en linfocitos T humanos y queratinocitos humanos.

Así, los inhibidores de HDAC tienen el potencial de modificar la expresión de citoquina en respuesta a la activación de células. Son capaces de bloquear la expresión de varios transcritos de citoquina suprimiendo la producción de citoquina inflamatoria importante inmunológicamente. La drástica regulación hacia abajo de la secreción de citoquina por inhibidores de HDAC soporta su uso potencial como agente terapéutico.

Ejemplo 13

(Ejemplo de referencia)

Datos de terapia clínica usando un inhibidor de HDAC en pacientes.

El VPA, que actúa como inhibidor preferencial de enzimas clase I de histona desacetilasa, induce hiperacetilación de histona en sistemas celulares así como en células de sangre periférica de pacientes.

Se tomaron muestras de sangre de dos pacientes (Pac. 1 y Pac. 2) que presentaban una enfermedad maligna avanzada tratada con VPA intravenosamente en el alcance de un estudio clínico de fase I/II (Figuras 17, 18 y 19).

*Método**Manchas de western*

5 Se obtuvieron células de sangre periférica de pacientes tratados con VPA antes, 6 h, 24 h y 48 h después de comenzar el tratamiento con VPA (véase programa de tratamiento, Figura 17). Se prepararon extractos de células completos por lisis de células en tampón RIPA incluyendo inhibidores de proteasa. Los lisados se separaron por electroforesis en gel de SDS y se transfirieron a membranas de PVDF. Se detectaron histonas H3 y H4 acetiladas y el gen marcador HDAC-2 por análisis de manchas de western usando un anticuerpo anti-H3 acetilada (Upstate, 06-942), un anticuerpo anti-H4 acetilada (clon T25; solicitud de patente EP 02.021984.6) y un anticuerpo anti-HDAC-2 (SCBT, SC-7899). Como testigo de igual carga se colorearon membranas de PVDF con Coomassie (Figura 18).

ELISA

15 Se sembraron células de sangre periférica de un paciente tratado con VPA antes, 6 h, 24 h y 48 h después de comenzar el tratamiento con VPA en una placa de fondo plano de 24 pocillos con una densidad de 1 millón de células por ml. Las células se dejaron sin estimular o se estimularon con anticuerpos de CD3 y CD28. Después de 24 h a 37°C, se recogió el sobrenadante y se cuantificó la secreción de IL-2 y TNF- α por ELISA (R&D Systems) (Figuras 19A y B).

RT-PCR

20 Se aisló ARN total de células no estimuladas y estimuladas con CD3/CD28 usando el minijuego RNeasy (Qiagen). Un microgramo de ARN total se convirtió en cADN por métodos estándares usando transcriptasa inversa y un cebador de oligo-dT (Invitrogen). Para PCR semicuantitativa, se multiplicaron por PCR 2 μ l de cADN usando los cebadores específicos como se ha descrito antes (Figura 19C).

Resultados

30 El análisis de manchas de western con los lisados de células de sangre periférica (Figura 18) muestra la detección de hiperacetilación de histona H3 y H4 y regulación hacia abajo de la proteína de marcador HDAC-2 con niveles de suero por encima de la concentración terapéutica en plasma. La inducción de hiperacetilación de histona y regulación hacia abajo de HDAC-2 demostraron claramente la eficacia del tratamiento con VPA y muestra que puede usarse VPA en pacientes para conseguir concentraciones terapéuticas en suero eficaces induciendo hiperacetilación de histona en células de sangre periférica y regulación de un gen objetivo HDAC-2. Además, se mostró la evidencia de que VPA modula la expresión de citoquinas inflamatorias tales como IL-2 y TNF- α en el sobrenadante de cultivos como se ensayó por ELISA (Figuras 18A y B) consecuente con una disminución de transcritos de mRNA de IL-2 y TNF- α en células estimuladas con CD3/CD28 (Figura 18C). Además, redujo significativamente la expresión de mRNA de citoquina de IL-4 e IFN- γ partiendo a las 24 horas del tratamiento con VPA.

40 Tomados juntos, estos datos muestran que VPA puede modular eficazmente genes relevantes inmunológicamente tales como IL-2, TNF- α , IL-4 e IFN- γ en un paciente tratado con el inhibidor de HDAC VPA según el programa de tratamiento representado en la Figura 17.

45 Por tanto, este nuevo potencial de VPA y otros inhibidores de HDAC para actuar como compuestos moduladores inmunes soporta a esta invención para emplear estos compuestos como fármacos anti-inflamatorios para la terapia de trastornos ligados a células inmunes sobrereactivas patológicamente.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de ácido valproico (VPA) o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un trastorno de la piel, en el que una composición farmacéutica que comprende un agente activo seleccionado del grupo constituido por VPA y sales del mismo aceptables farmacéuticamente, se aplica tópicamente a la piel de un individuo, en el que el trastorno de la piel es una inflamación de la piel y/o mucosa seleccionada del grupo constituido por psoriasis y acné.

10 2. El uso según la reivindicación 1ª, en el que el tratamiento comprende la administración de 0,5 a 10 mg/día por lesión de aproximadamente 1 cm².

15 3. El uso según las reivindicaciones 1ª o 2ª, en el que se usa un inhibidor adicional de histona desacetilasas, que es diferente de VPA y que se selecciona del grupo constituido por los derivados de ácido hidroxámico NVP-LAQ824, tricostatina A (TSA), ácido suberoil anilida hidroxámico, CBHA, piroxamida, Scriptaid, CI-994, CG-1521, clamidocina, hidroxamato de biarilo, por ejemplo, A-161906, aril-N-hidroxicarboxamidas bicíclicas, PXD-101, ácido sulfonamida hidroxámico, análogo de TPX-HA (CHAP), oxamflatina, trapoxina, depudecina, apidicina, benzamidas tales como MS-27-27, piroxamidas y derivados de ellas, ácidos grasos de cadena corta tales como ácido butírico y derivados de él, por ejemplo, Pivanex (butirato de pivaloiloximetilo), tetrapéptidos cíclicos tales como trapoxina A, 20 depsipéptido (FK-228) y compuestos peptídicos relacionados, tacedinalina, MG2856 e inhibidores de HDAC clase III o inhibidores de SIRT.

25 4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en el que VPA o la sal del mismo o el inhibidor adicional de histona desacetilasas que es diferente de VPA como se define en la reivindicación 3ª potencia la actividad retinoide aplicada oralmente en psoriasis y/o acné por aplicación tópica de VPA o la sal del mismo o el inhibidor adicional de histona desacetilasas solo.

30 5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en el que VPA o la sal del mismo o el inhibidor adicional de histona desacetilasas que es diferente de VPA como se define en la reivindicación 3ª potencia los derivados de vitamina D aplicados oralmente tal como la actividad de tacalcitol y calcipotriol en psoriasis y/o acné por aplicación tópica de VPA o la sal del mismo o el inhibidor adicional de histona desacetilasas solo.

35 6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tratamiento comprende la administración de una composición tópica que comprende:

(i) al menos 0,1% de VPA o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente; y

(ii) un vehículo aceptable dermatológicamente.

40 7. El uso según la reivindicación 6ª, en el que la concentración de VPA o de la sal del mismo aceptable farmacéuticamente es del 1% al 4% de la composición.

8. El uso según las reivindicaciones 6ª o 7ª, que comprende además ácido retinoico o un derivado del mismo.

45 9. El uso según la reivindicación 8ª, en el que la concentración de ácido retinoico o el derivado del mismo es del 0,01% al 1% de la composición.

10. El uso según las reivindicaciones 8ª o 9ª, en el que el derivado de ácido retinoico se selecciona del grupo constituido por ácido 9-cis-retinoico, ácido trans-retinoico, ácido all-trans-retinoico y tazaroteno.

50 11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6ª a 10ª, en el que el vehículo aceptable dermatológicamente se selecciona del grupo constituido por cremas, ungüentos, pastas y geles.

12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 11ª, en el que el trastorno de la piel es psoriasis.

55 13. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 11ª, en el que el trastorno de la piel es acné.

60

65

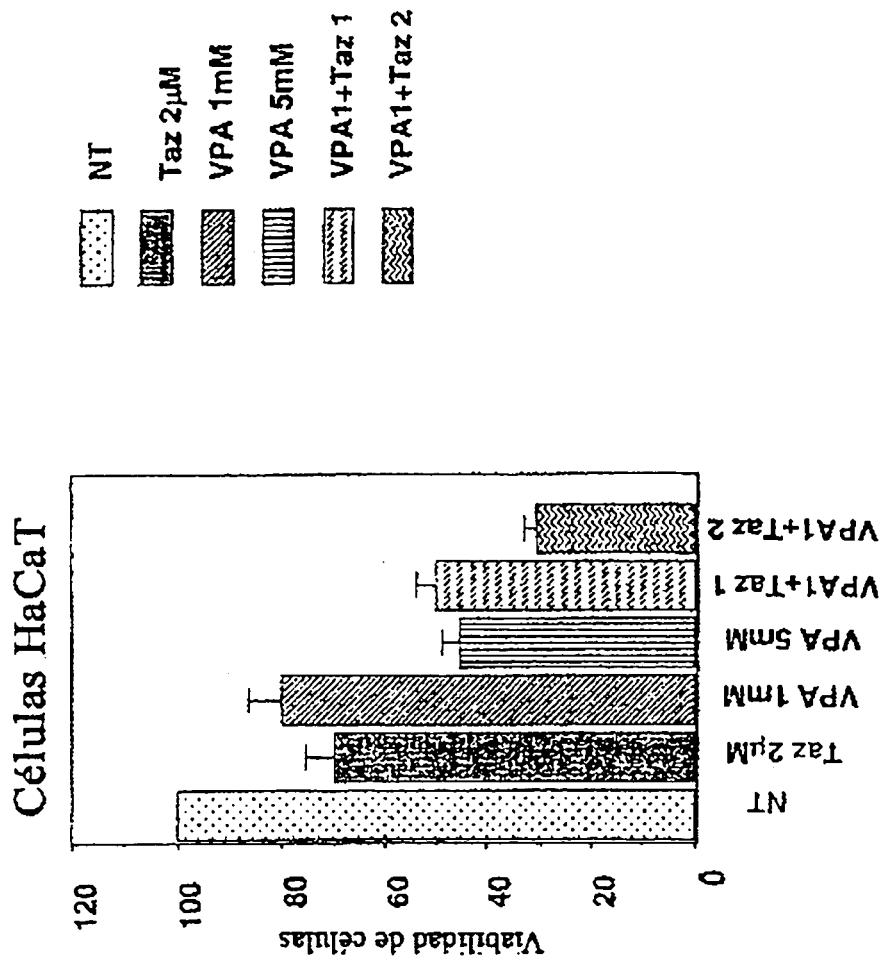


Figura 1

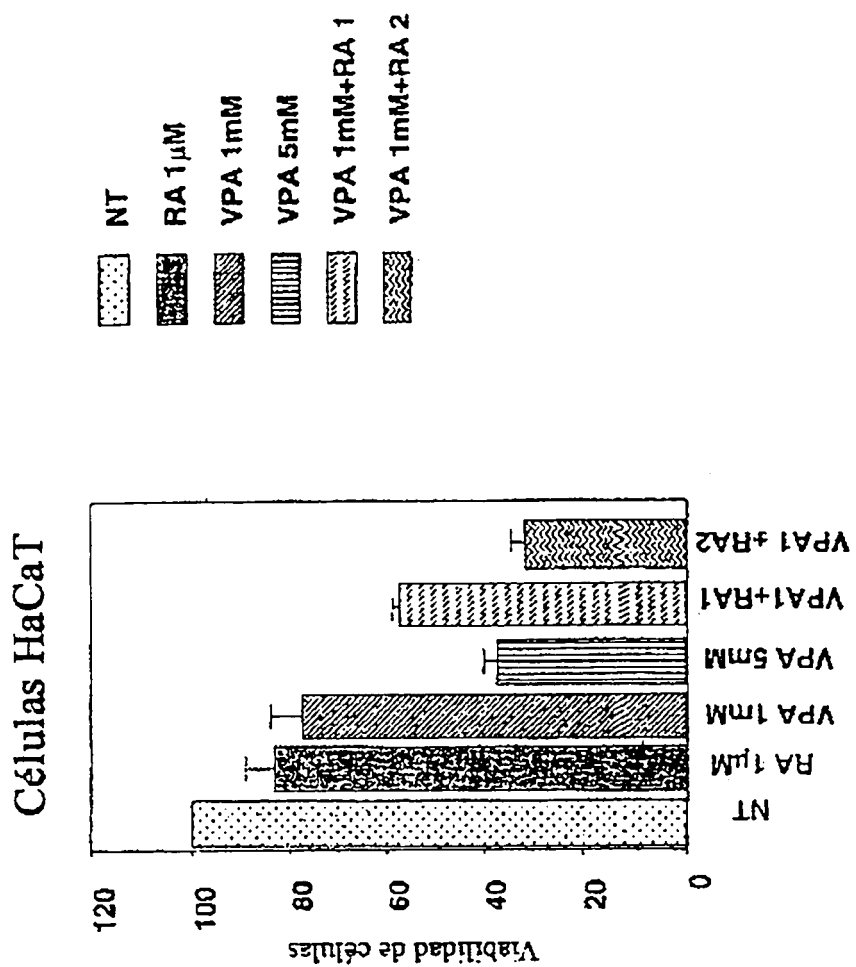


Figura 2

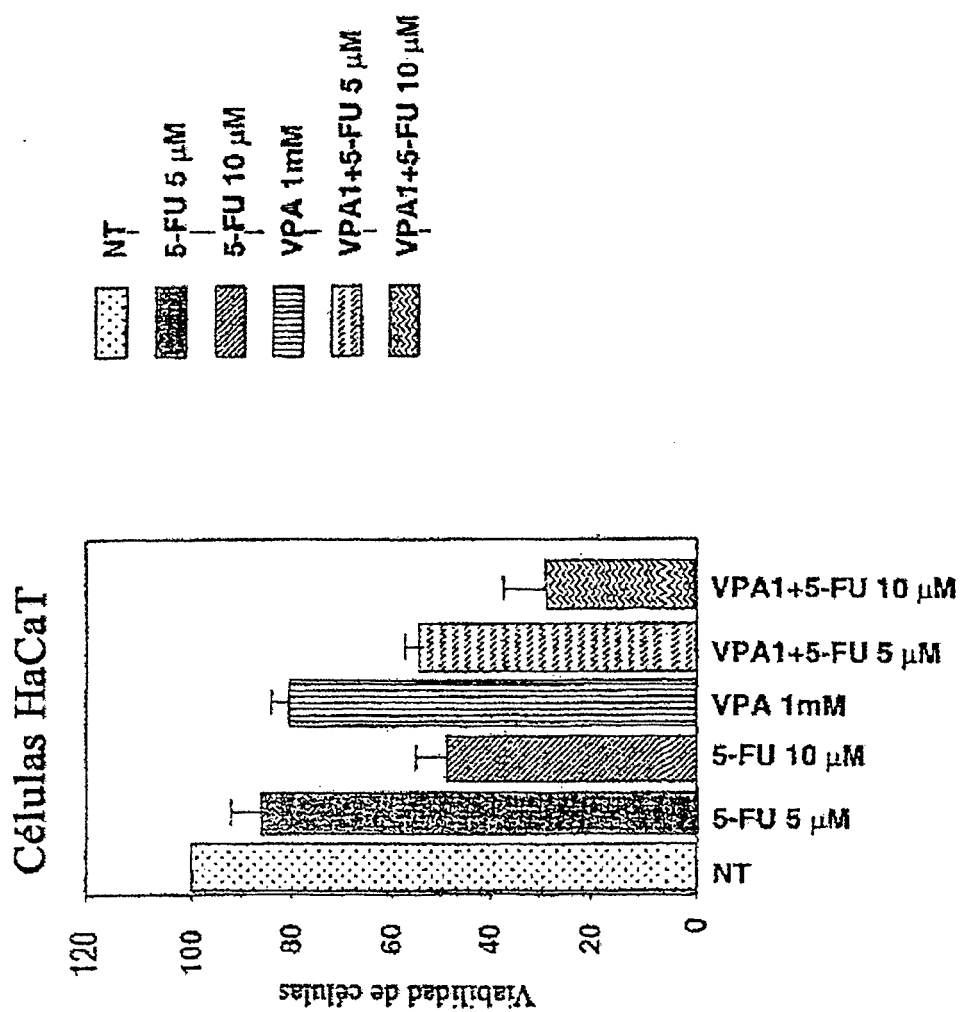


Figura 3

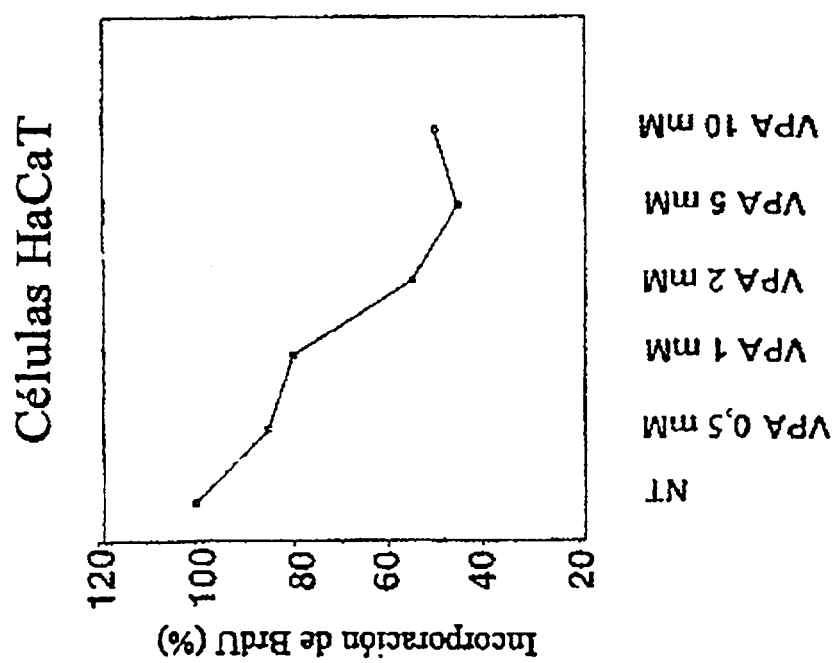


Figura 4

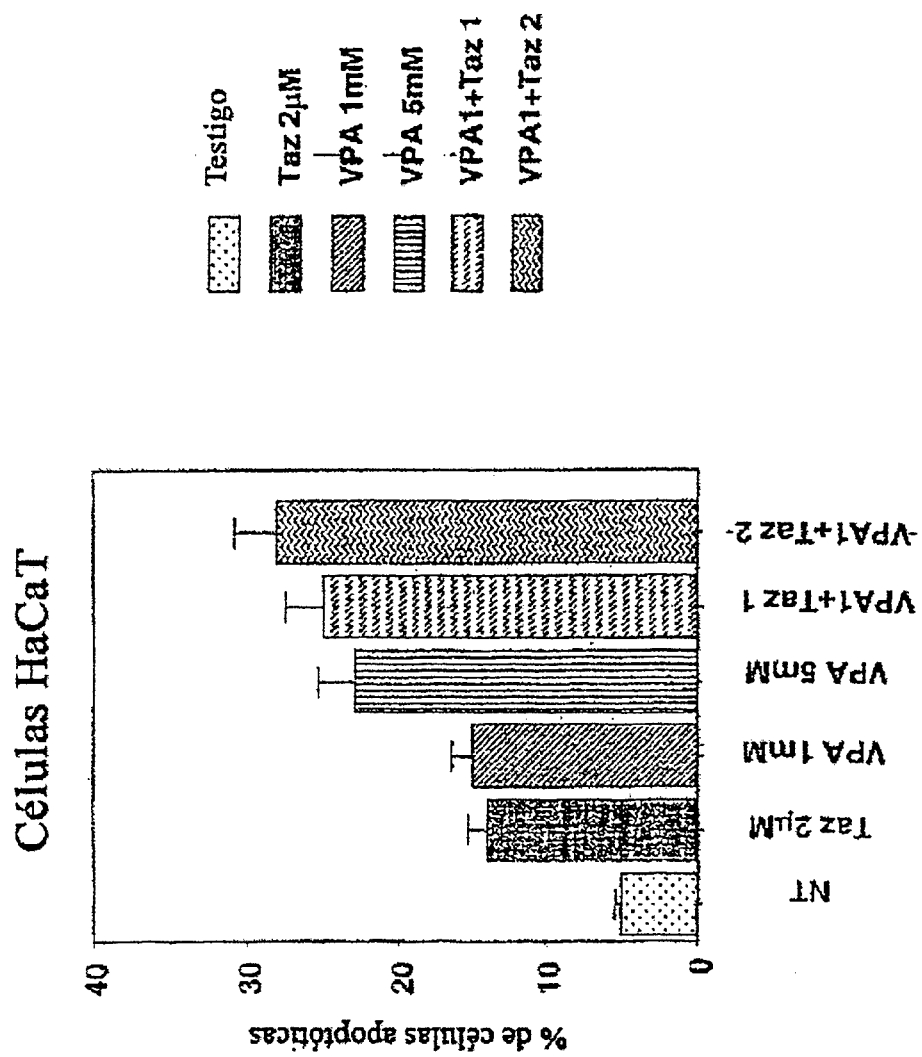


Figura 5

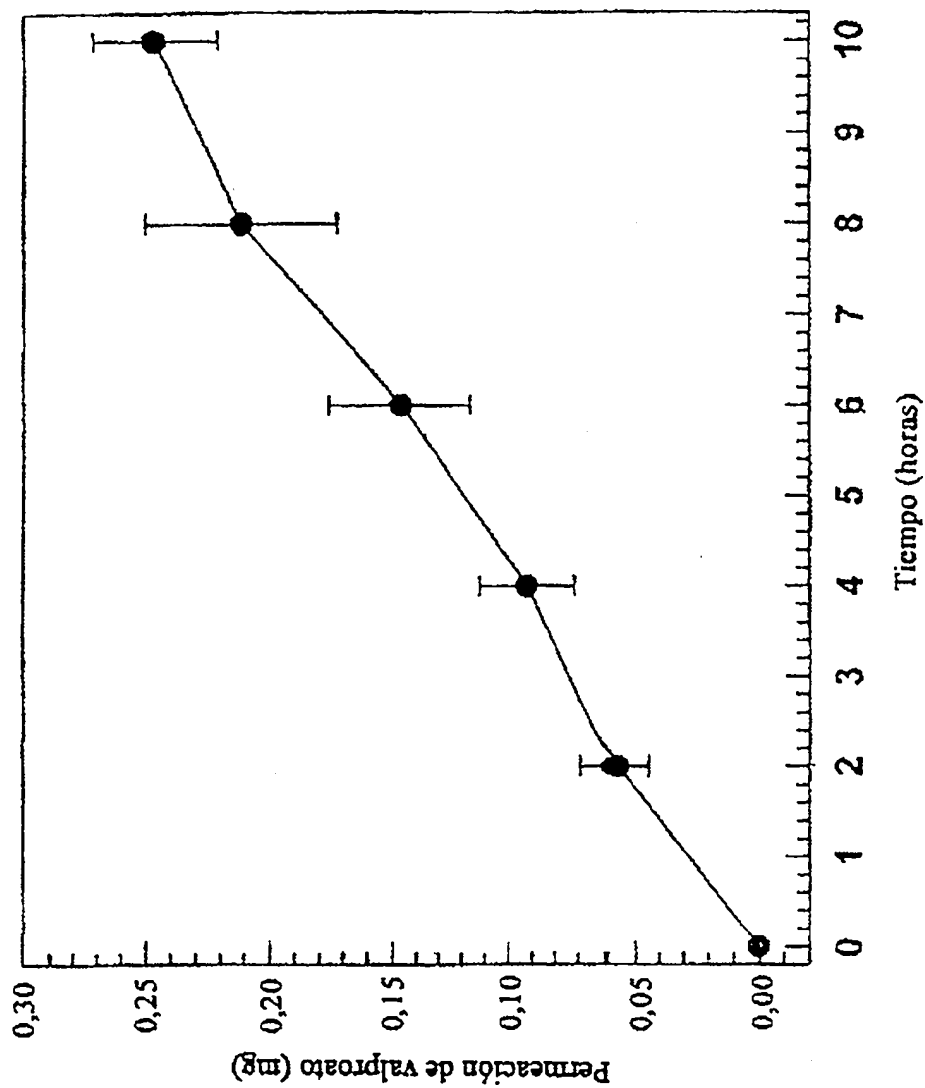


Figura 6

Células HaCaT

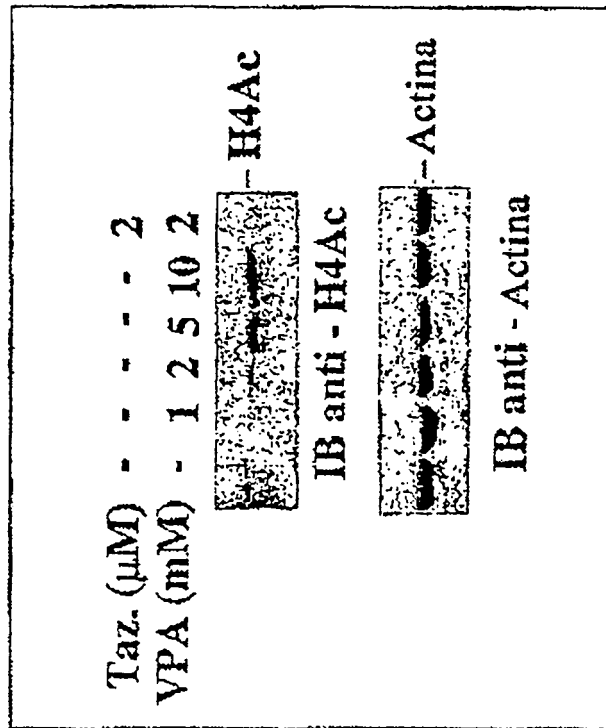


Figura 7

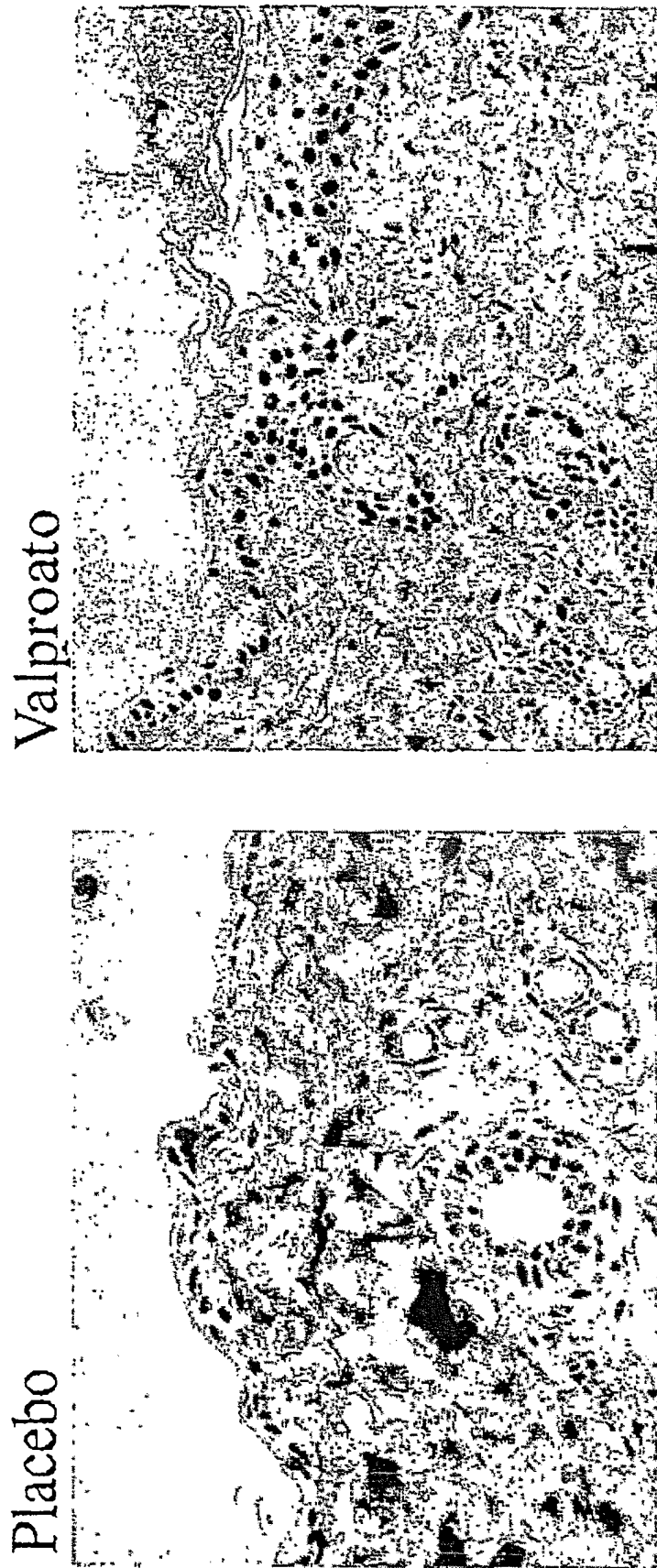


Figura 8

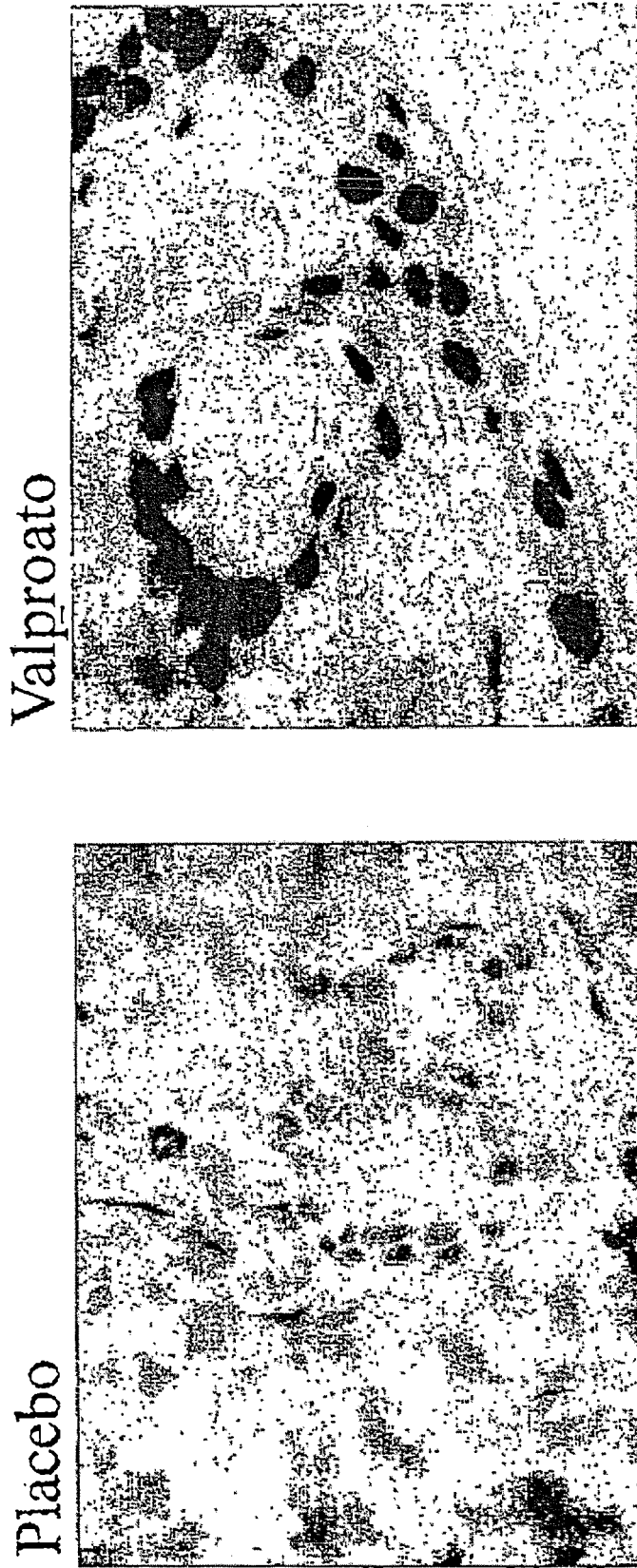


Figura 9

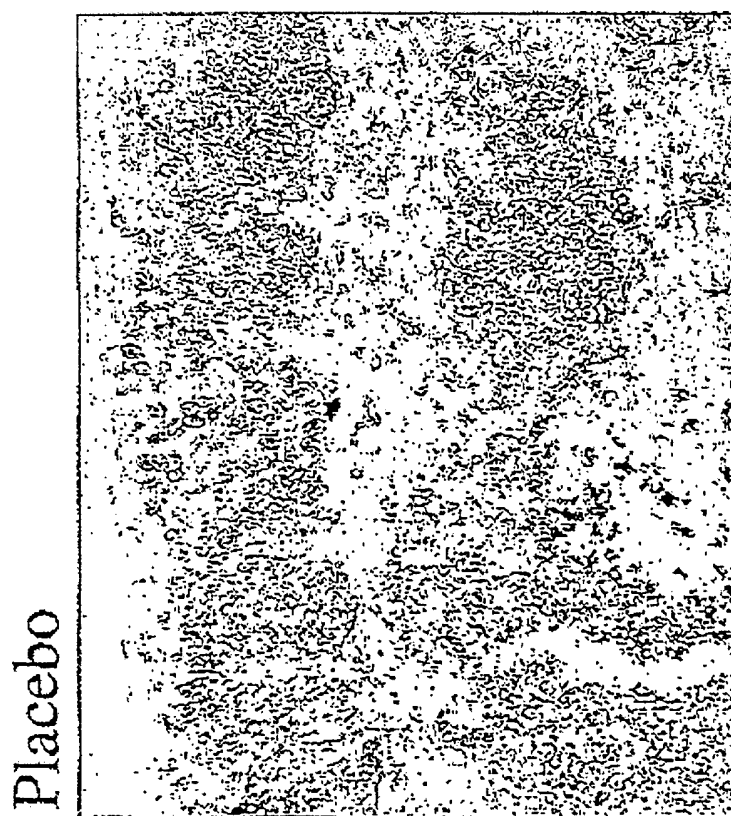
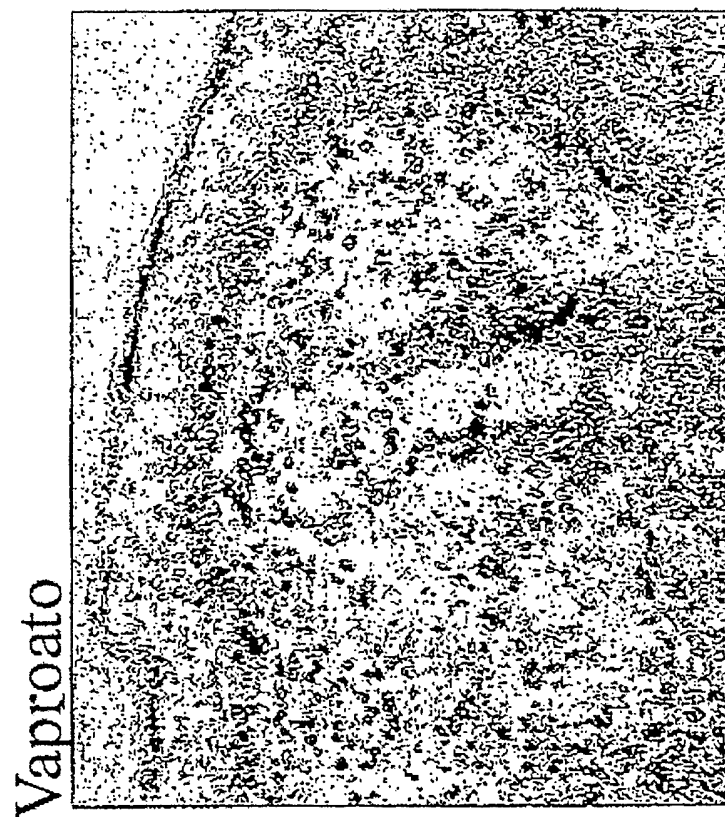
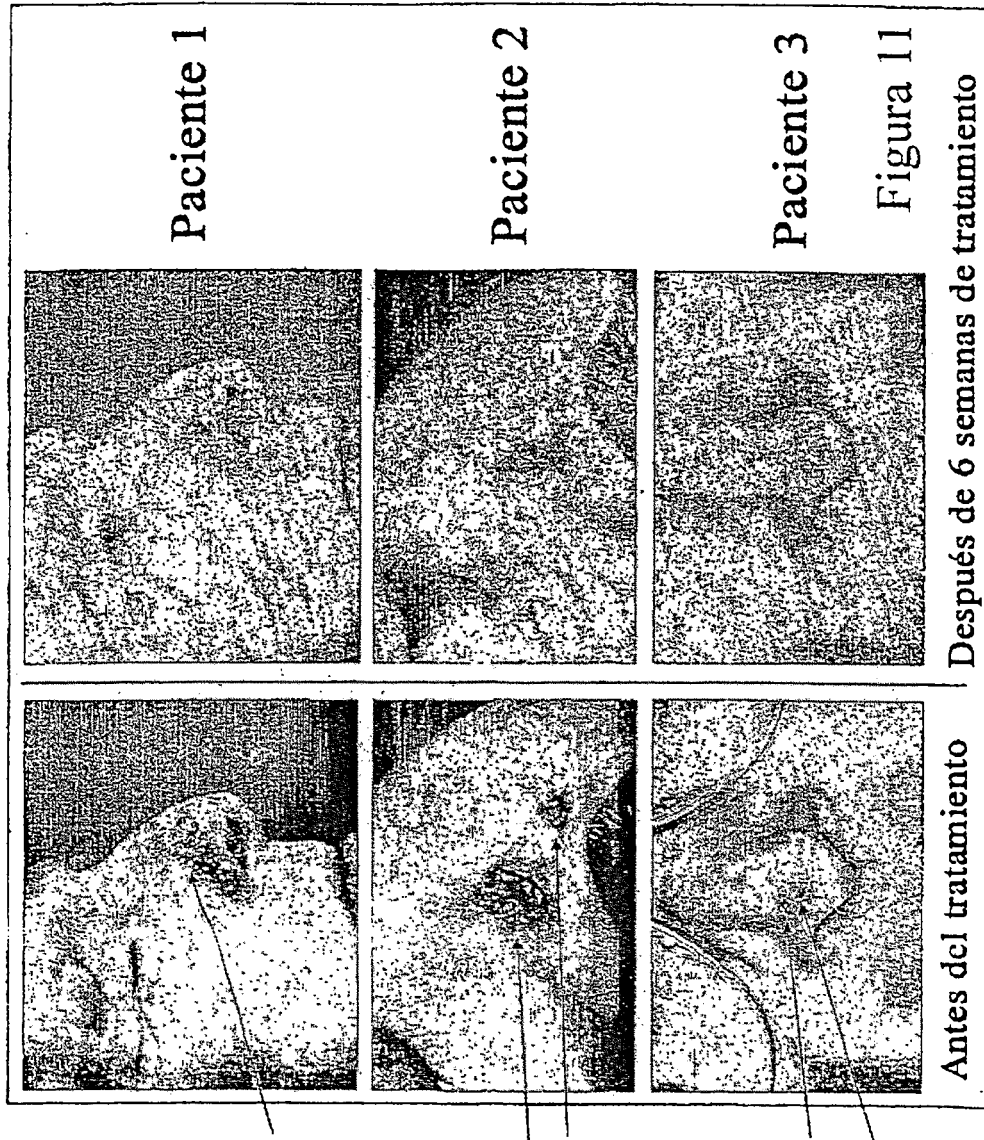


Figura 10



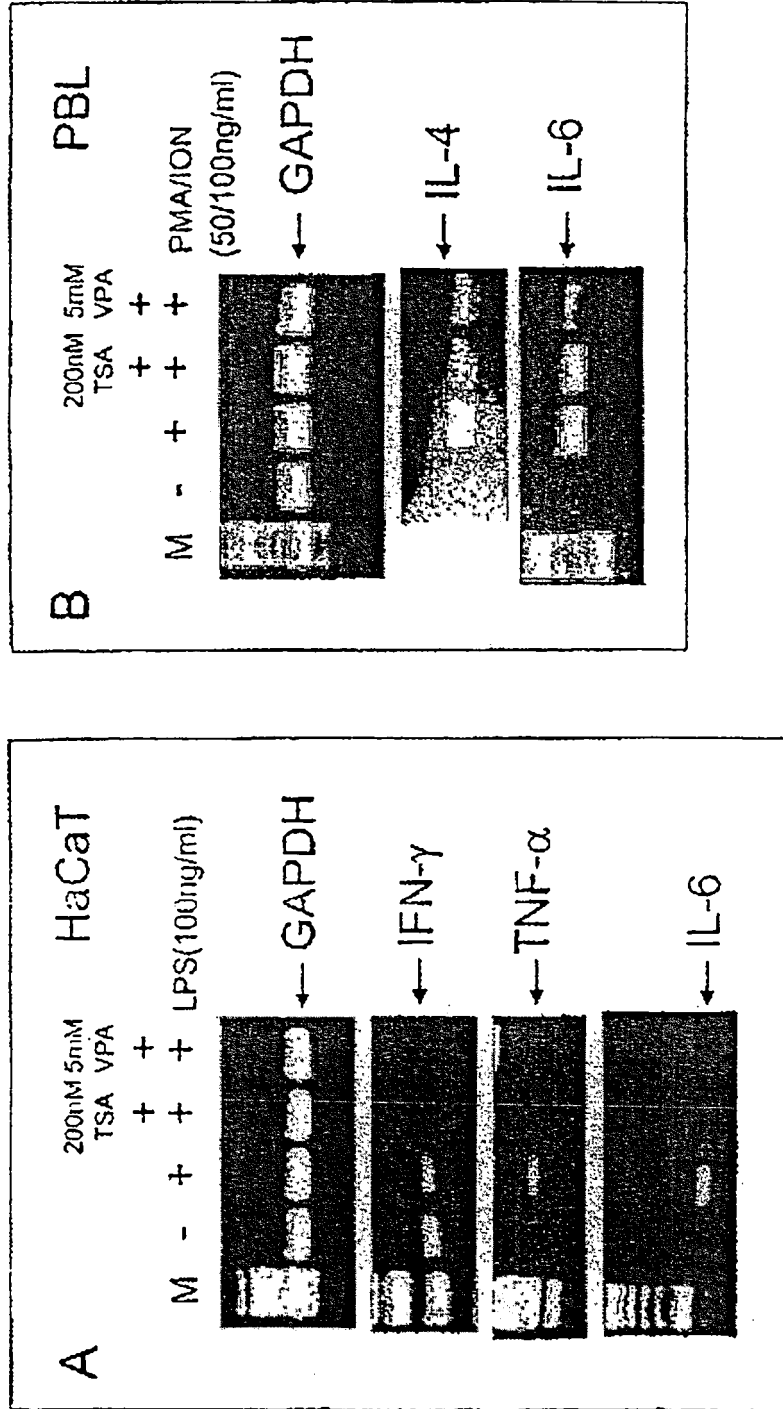


Figura 12

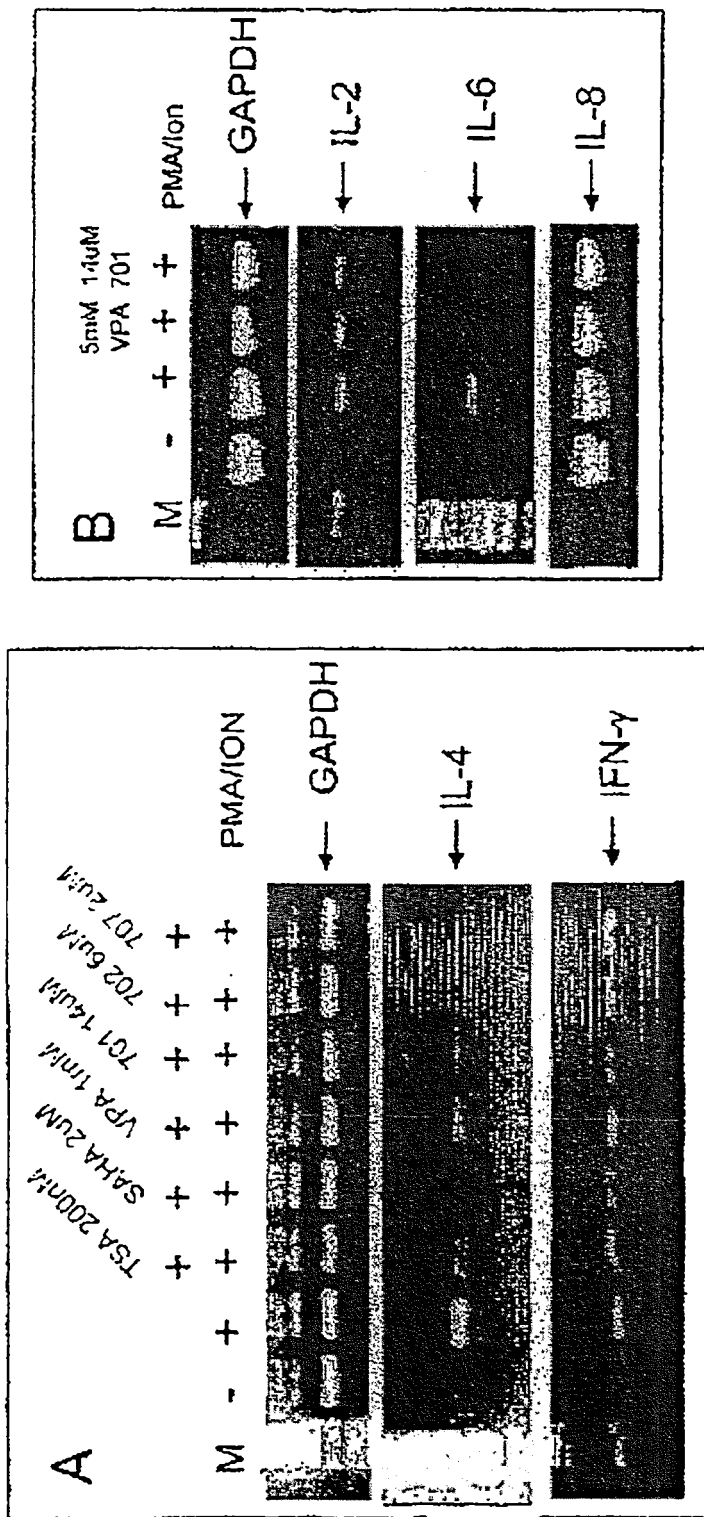


Figura 13

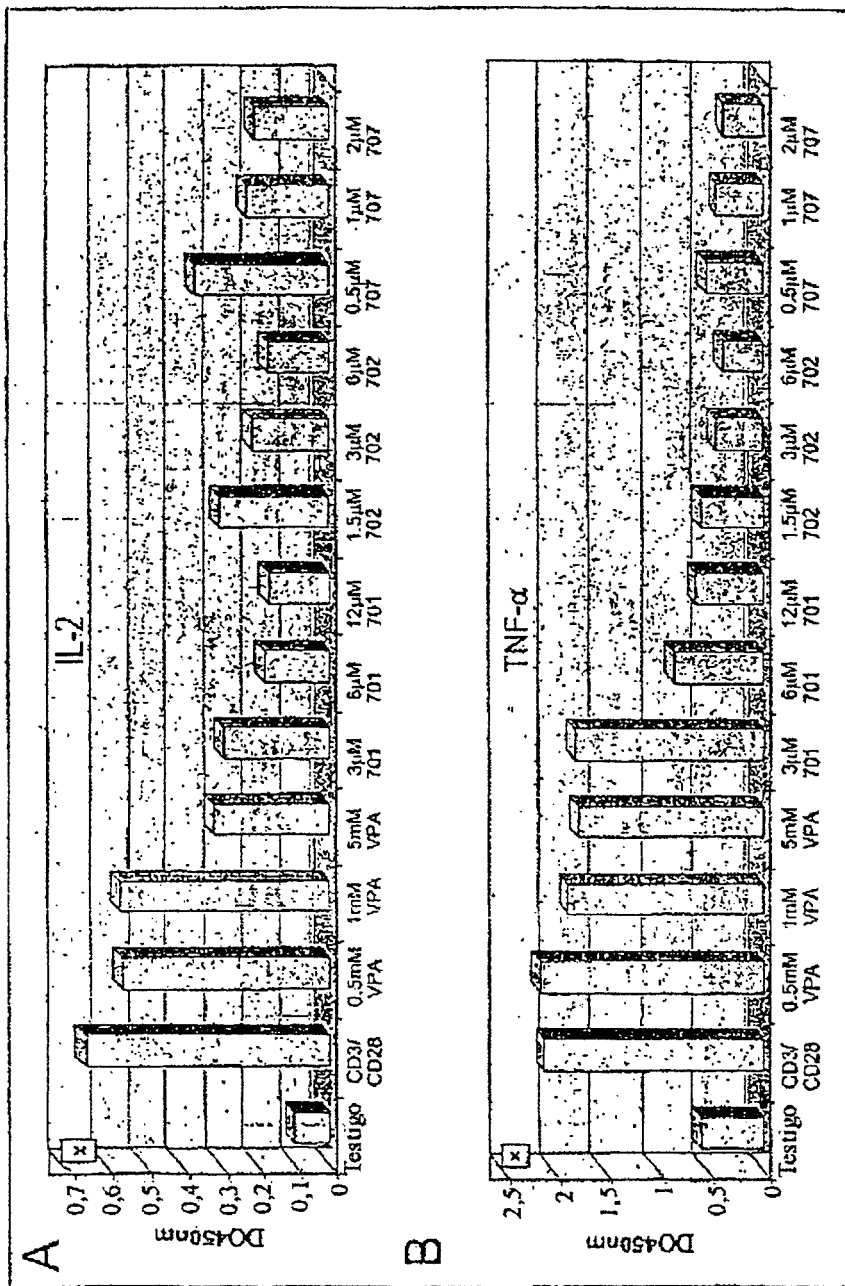


Figura 15

Programa de tratamiento clínico usando VPA

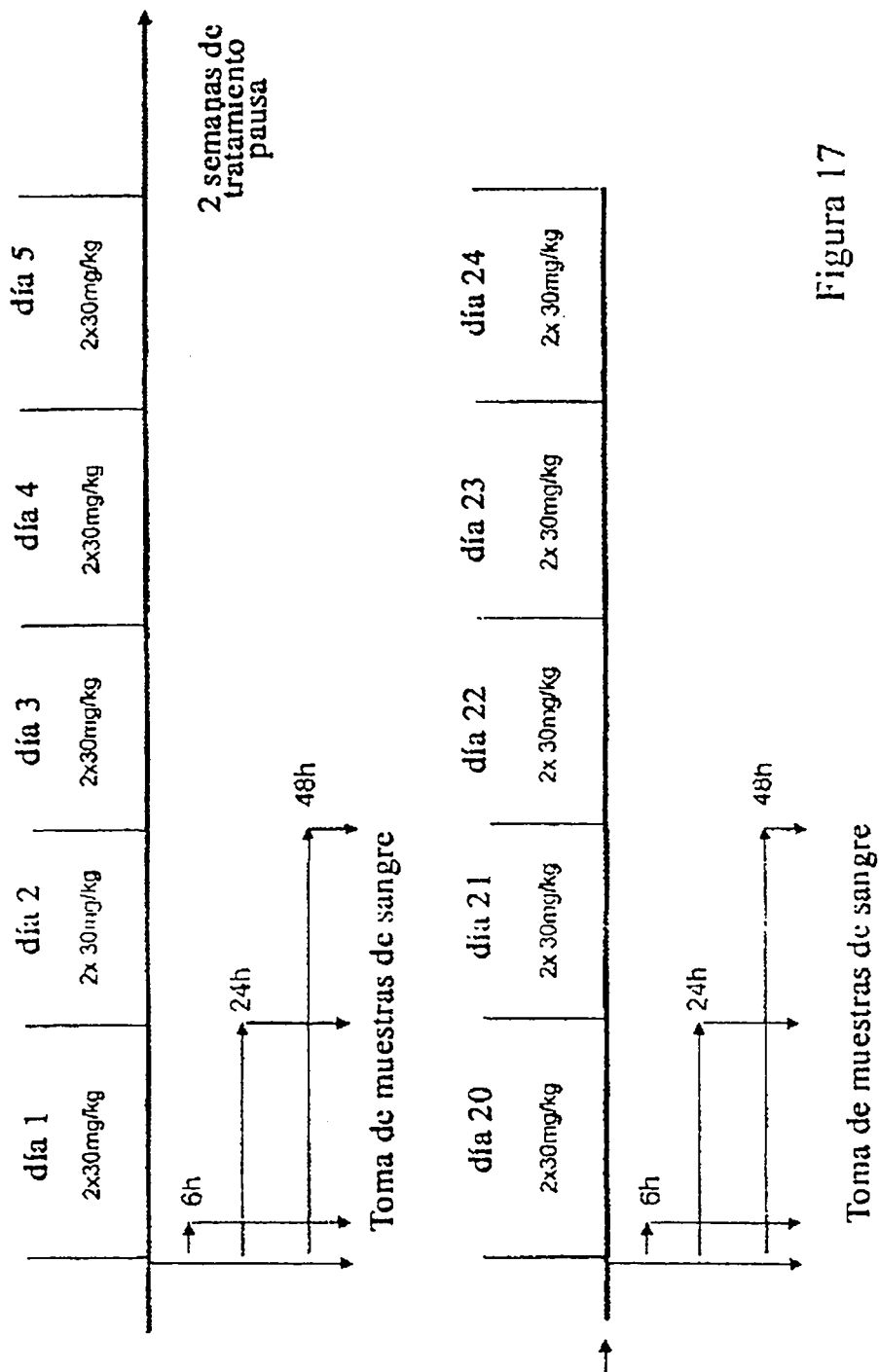


Figura 17

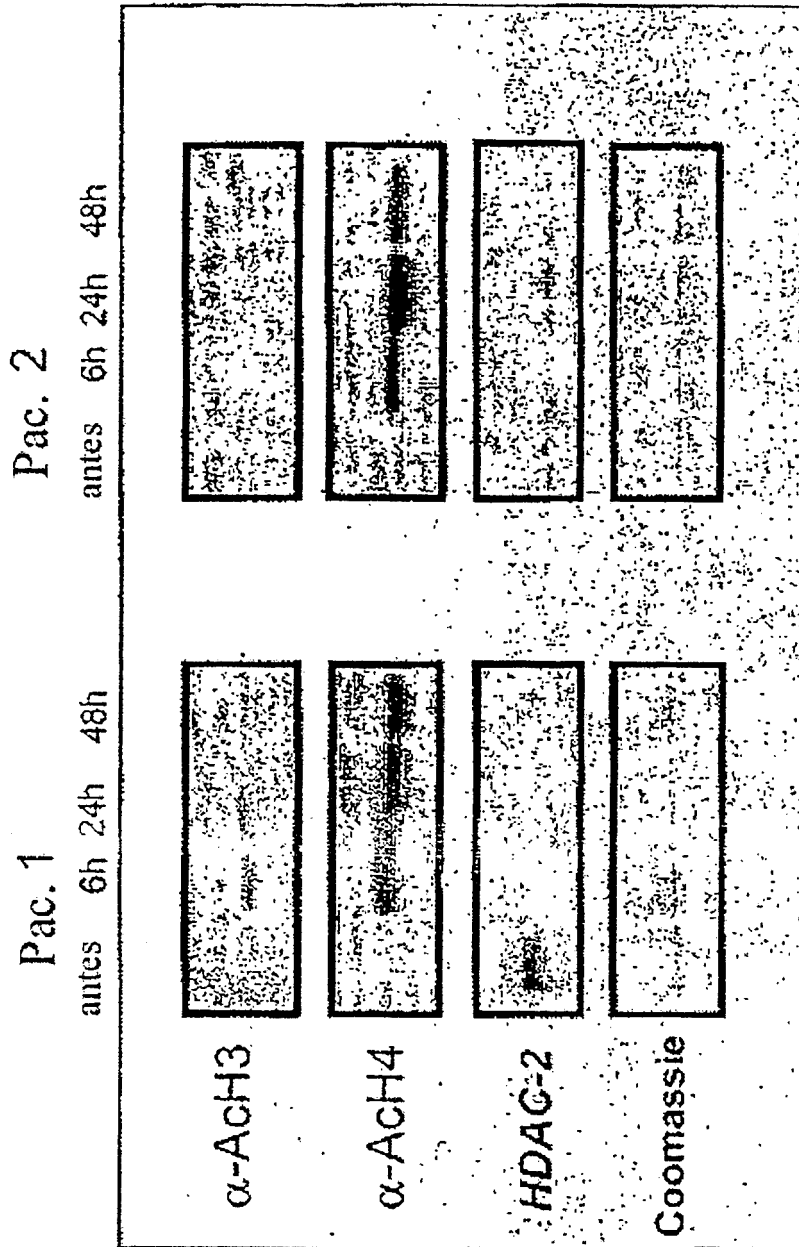


Figura 18

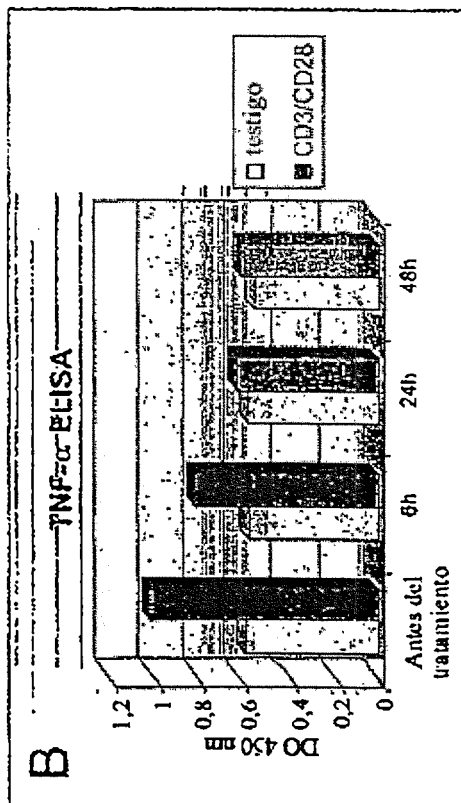
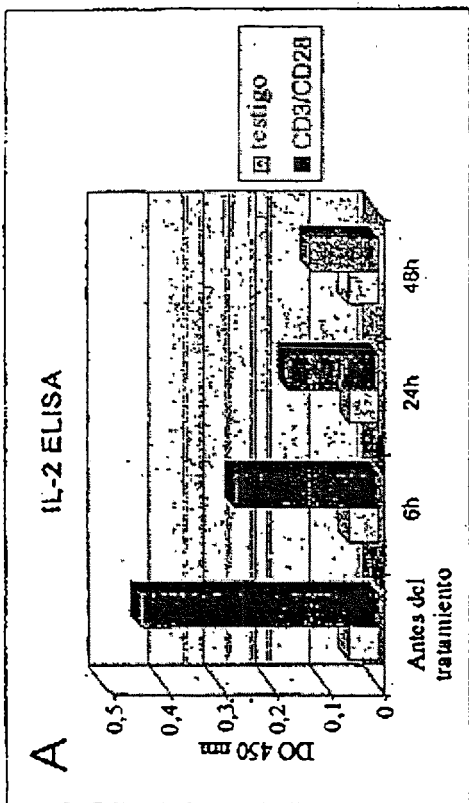
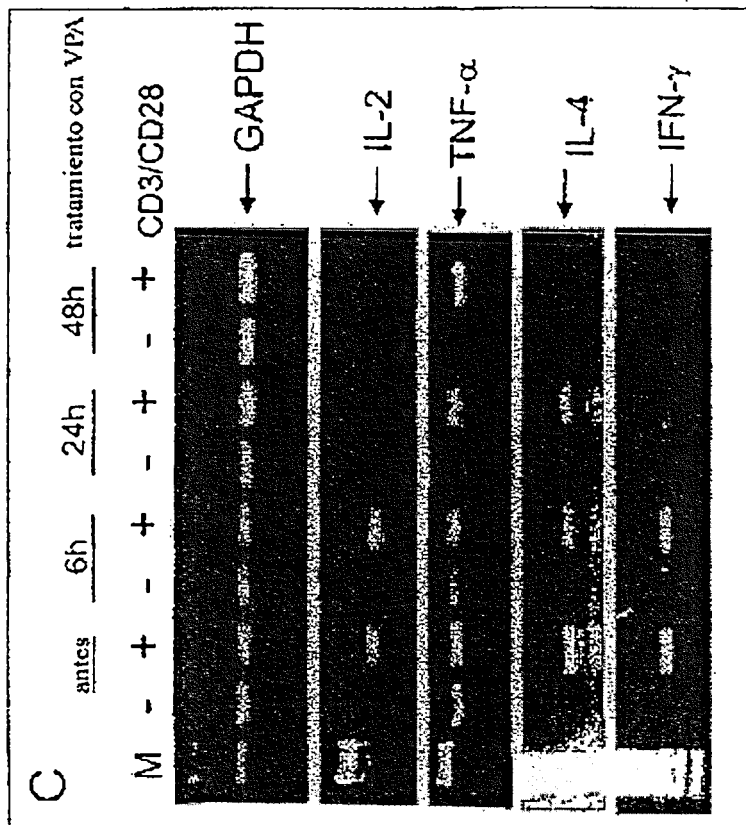


Figura 19

ES 2 310 734 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> G2M Cancer Drugs AG

5 <120> Uso tópico de ácido valproico para la prevención o tratamiento de trastornos de la piel

<130> Uso tópico

10 <150> EP 03014278.0

<151> 25-06-2003

<160> 20

15

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

20

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Cebador

<400> 1

30

ggatgaaggct ggagtcacacg

20

35

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

40

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

45

<400> 2

caaagttgtc atggatgacc

20

50

<210> 3

<211> 20

55

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

60

<223> Cebador

<400> 3

65

atgtacagga tgcaactcct

20

ES 2 310 734 T3

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador
10
<400> 4

15 **tcaagttagt gttgagatga** 20

<210> 5
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
25 <223> Cebador

<400> 5
30 **atgggtctca cctcccaact** 20

<210> 6
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador

<400> 6
45 **tcagctcgaa cactttgaat** 20

50 <210> 7
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
55
<220>
<223> Cebador

60 <400> 7

65 **atgaggatgc ttctgcattt gág** 23

<210> 8
<211> 22

ES 2 310 734 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 8

10 **tccactcggg gttcattaca cc** **22**

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

25 <400> 9

atgaactcct tctccacaag cgcc **24**

30 <210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Cebador

40 <400> 10

ctacatttgc cgaagagccc tcag **24**

45 <210> 11
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Cebador

55 <400> 11

60 **atgacttcca agctggccggt ggc** **23**

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

65

ES 2 310 734 T3

<220>
<223> Cebador

5 <400> 12

ttatgaattc tcagccctct tc 22

10 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 13

ttgcctggtc ctctgactg 20

25 <210> 14
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Artificial

<220>
35 <223> Cebador

<400> 14

40 **gatgtctggg tcttggttct** 20

<210> 15
<211> 24
45 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> Cebador

<400> 15

55 **atgtgtcacc agcagttggt catc** 24

<210> 16
60 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

65 <220>
<223> Cebador

ES 2 310 734 T3

<400> 16

ctatagtagc ggtcctgggc

20

5

<210> 17

<211> 24

<212> ADN

10

<213> Artificial

<220>

15

<223> Cebador

<400> 17

atgagcactg aaagcatgat ccgg

24

20

<210> 18

<211> 22

25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30

<223> Cebador

<400> 18

tcacagggca atgatcccaa ag

22

35

<210> 19

<211> 29

40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

45

<223> Cebador

<400> 19

atgaaatata caagttatat cttggcitt

29

50

<210> 20

<211> 20

55

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

60

<223> Cebador

<400> 20

ttactgggat gctcttcgac

20

65