



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 528**

51 Int. Cl.:
A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06750246 .8**
96 Fecha de presentación : **12.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1871353**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **Vitamina K para la prevención y el tratamiento de una erupción cutánea secundaria a una terapia anti-EGFR.**

30 Prioridad: **15.04.2005 US 671563 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2011

73 Titular/es: **Albert Einstein College of Medicine of
Yeshiva University, A Division of Yeshiva
University
1300 Morris Park Avenue
Bronx, New York 10461, US**

72 Inventor/es: **Pérez-Soler, Román y
Ling, Yi-He**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

DESCRIPCIÓN

Vitamina K para la prevención y el tratamiento de una erupción cutánea secundaria a una terapia anti-EGFR

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 A lo largo de esta solicitud se hace referencia a diversas publicaciones entre paréntesis. Las citas completas para estas referencias pueden encontrarse al final de la memoria descriptiva inmediatamente antes de las reivindicaciones. Las divulgaciones de estas publicaciones se incorporan por la presente mediante referencia en su totalidad en la presente solicitud para describir más a fondo la técnica de la que trata la presente solicitud.

10 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una proteína de transmembrana expresada en todas las superficies epiteliales. Representa un importante papel fisiológico en la reparación y la regeneración epitelial. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un péptido secretado por las glándulas salivares y otras glándulas asociadas con superficies epiteliales que se une a un área específica en el dominio extracelular del EGFR. Al unirse genera una señal que se transmite dentro de la célula. El primer episodio intracelular como resultado de la unión a EGF es un cambio de conformación en el dominio intracelular de EGFR que permite que el 5'-trifosfato de adenosina (ATP) entre en el llamado dominio de tirosina quinasa (TK), un bolsillo que contiene un residuo de tirosina, y done un grupo fosfato al residuo de tirosina. El EGFR intracelular que soporta una tirosina fosforilada se vuelve capaz de asociarse con otras proteínas intracelulares y origina una serie de reacciones bioquímicas que se propagan aguas abajo a través de una red muy compleja. Las ramas mejor conocidas de esta red son la ruta de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), que da como resultado división de células tumorales durante la activación, y la ruta de AKT, que da como resultado una supervivencia celular potenciada durante la activación. Por lo tanto, los resultados de la activación de EGFR son una proliferación celular incrementada y una tolerancia celular potenciada a diferentes ataques.

25 Muchos tumores sobreexpresan EGFR en comparación con tejidos normales vecinos o la superficie epitelial a partir de la cual se originan o tienen una versión mutada de EGFR, intrínsecamente activada o con una susceptibilidad potenciada a la activación. Se cree que tal sobreexpresión es uno de los muchos mecanismos por los que las células tumorales alcanzan una ventaja de crecimiento, una característica clave del fenotipo maligno. Por consiguiente, se cree que bloquear la ruta de señalización de EGFR es una estrategia racional para el tratamiento de muchas enfermedades malignas humanas. Básicamente, existen dos modos de inhibir aguas arriba la ruta de señalización de EGFR: 1) prevenir la unión de EGF y otros ligandos peptídicos naturales al dominio de EGFR extracelular mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos, y 2) prevenir la entrada de ATP y otros donantes de fosfato en el bolsillo de TK del dominio de EGFR intracelular mediante el uso de pequeñas moléculas que estructuralmente se ajustan muy bien al bolsillo (los llamados inhibidores de TK de EGFR).

35 Después de años de esfuerzos de descubrimiento y evaluación clínica, se ha mostrado recientemente que los inhibidores de EGFR son agentes antitumorales contra una variedad de tumores sólidos incluyendo, pero no limitados a, carcinoma colorrectal, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de cabeza y cuello y gliomas malignos (Conen et ál., 2003; Lage et ál., 2003; Lorusso, 2003; Vanhoefere et ál., 2004). Efectos clínicos definidos como alivio de síntomas o prolongación de la supervivencia se han demostrado desde hace mucho tiempo con el anticuerpo anti-EGFR cetuximab (Erbix®) y los inhibidores de tirosina quinasa (TK) de EGFR gefitinib (Iressa®) y erlotinib (Tarceva®). Se están desarrollando muchos agentes adicionales pertenecientes a esta clase. Hasta hoy, indicaciones aprobadas por la FDA incluyen carcinoma colorrectal quimiorrefractario y cáncer pulmonar no microcítico, carcinoma de cabeza y cuello y carcinoma pancreático. Están en marcha muchos estudios clínicos que usan estos agentes solos o en combinación, para pacientes refractarios o no tratados previamente con quimioterapia con una variedad de otras enfermedades malignas. Se anticipa que tantos como 200.000 pacientes en los EE. UU. de A. pueden recibir estos agentes cada año en un futuro próximo.

45 Aunque estos agentes no provocan toxicidades potencialmente letales, el principal efecto secundario es una erupción cutánea que se produce en 60-70% de los pacientes, afecta principalmente a la cara y el tronco y provoca incomodidad y cambios cosméticos desfavorables en muchos casos. Los principales síntomas provocados por la erupción cutánea son picor, sequedad e infección secundaria. La presencia y la intensidad de la erupción están claramente relacionadas con la dosis y el tiempo mediano de presencia es 10 días después del inicio de la terapia. 50 Aproximadamente 10% de los pacientes interrumpen la terapia debido a la toxicidad cutánea.

La mayoría de los estudios clínicos ha mostrado que la mayoría de los pacientes que desarrollan erupción cutánea como resultado de una terapia anti-EGFR tienden a vivir más. Se cree que la presencia de erupción cutánea requiere tanto inhibición eficaz de EGFR en la piel como un sistema inmunitario competente que sea capaz de responder al ataque tisular provocado por tal inhibición con una respuesta inflamatoria apropiada. Como existe una evidencia creciente de que la erupción cutánea es un indicador sustituto de eficacia antitumoral y beneficio 55

clínico(Cohen et ál., 2003), incrementar la dosificación de agentesanti-EGFR para provocar una erupción cutánea puede convertirse en una práctica común. Si ese es el caso, el tratamiento de la erupción cutánea también se volverá de importancia creciente. No existen métodos racionales, científicamente probados y clínicamente eficaces disponibles para el tratamiento de esta forma de erupción cutánea. Antibióticos tópicos o sistémicos, agentes antiinflamatorios, retinoides, lubricantes tópicos y otros tipos de remedios se han probado de un modo empírico con resultados pobres o inconsistentes. Hasta el día de hoy no se ha establecido una terapia o prevención para esta nueva enfermedad cutánea, una afección que se espera que afecte a aproximadamente 150.000 individuos en los EE. UU. de A. cada año en un futuro muy próximo.

La vitamina K se ha usado para el tratamiento de trastornos de los vasos sanguíneos de la piel, tratamiento cosmético de la piel y tratamiento de la piel después de un tratamiento con láser (Patente de EE. UU. N° 5.510.391;Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° US2003/0170187; Publicaciones Internacionales PCT N° WO 97/39746, WO 02/13780, WO 03/101415, WO 2004/019923;Lou et ál., 1999; Shah et ál., 2002). Sin embargo, la administración tópica de vitamina K3 puede provocar dermatitis (Page et ál.,1942) y vesiculación de la piel (Ulbrich, 1961).

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona Vitamina K1 o Vitamina K3 para el uso en un método para tratar o prevenir una erupción cutáneasecundaria a una terapia anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en un sujeto que recibe dicha terapia, comprendiendo el método aplicar la Vitamina K1 o la Vitamina K3 a la piel en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la erupción cutánea, en donde la Vitamina K1 o laVitamina K3 se formula en una formulación farmacéutica adecuada para la administración tópica.

La presente invención también proporciona el uso de Vitamina K1 oVitamina K3 en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una erupción cutáneasecundaria a una terapia anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en donde la composición farmacéutica se formula para la administración tópica y comprende una cantidad de Vitamina K1 oVitamina K3 eficaz para tratar o prevenir dichaerupción cutánea.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1A-1C. Efectos de las Vitaminas K1, K2 y K3 (VK1, VK2, VK3) sobre la fosforilación de EGFR (A), AKT(B) y Stat-3 (C) en células de carcinoma vulvar A431 humano. Células A431 (1×10^6 células/pocillo) se cultivaron en placa en una placa de 6 pocillos y se incubaron en medio RPMI-1640 con suero al 10% durante la noche. Las células se expusieron a las concentraciones indicadas de VK1,VK2 y VK3 durante 2 horas. Después de la exposición, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS)fría, y se sometieron a lisis con 50 μ l de tampón de lisis. Cantidades iguales de lisado (30 μ g de proteína) se sometieron a una PAGE en presencia deSDS al 7,5% o al 12%. EGFR, phos-EGFR, AKT, phos-AKT, Stat-3 y phos-Stat-3 se detectaron mediante análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos correspondientes. La Vitamina K3 estimulaba EGFR, Akt y Stat-3. La Vitamina K1 también activaba EGFR,mientras que la Vitamina K2 tenía poco o ningún efecto.

Figura 2. La Vitamina K3 (menadiona) previene la inhibición de la fosforilación de EGFR provocada por erlotinib, un inhibidor de tirosina quinasa de EGFR, en células A431. Células A431 (1×10^6 células/pocillo) se cultivaron en placa en una placa de 6 pocillos y se incubaron en medio RPMI-1640 sin suero bovino fetal durante 24 horas. Después de la hipoalimentación, las células se expusieron a diferentes concentraciones devitamina K3 sola (0,01-0,5 mM) o con erlotinib 2 μ M durante 2 horas, o se estimularon con 100 ng/ml de EGF durante 5min. Después de la exposición, las células se lavaron dos veces con solución de PBS fría, y se sometieron a lisis con 50 μ l de tampón de lisis. Cantidades iguales de lisado (30 μ g de proteína) se sometieron a una PAGE en presencia de SDS al 7,5%. EGFR y EGFR fosforilado se detectaron mediante análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos correspondientes.

Figura 3. Efecto de VK3 (menadiona) sobre la inhibición del crecimiento celular inducida por erlotinib en células A431. Las células se cultivaron en placa en una placa de 96 pocillos durante la noche. Las células se expusieron a diferentes concentraciones de erlotinib solo o en combinación con VK3 (menadiona) 50 μ M o 100 μ M durante 72 horas. Después de la exposición, las células se recogieron mediante tripsinización y la viabilidad celular se determinó mediante conteo celular usando un hemacitómetro. Cada punto representa la media de dos experimentos independientes.

Figura 4A-4B. La fosforilación inducida por VK3 de EGFR es reversible en células A431. Las células se expusieron a VK3 0,1mM durante 1 hora. Después de la exposición, las células se lavaron tres veces con medio frío y a continuación se reincubaron en medio reciente libre de VK3 con suerobovino fetal al 10% durante los tiemposindicados. Las células se recogieron y se sometieron a lisis con tampón de lisis. Cantidades iguales de lisado celular se sometieron a PAGE en presencia de SDS al 7,5% (A). El EGFR total y el EGFR fosforilado (p-EGFR) se detectaron mediante análisis der inmunotransferencia usando los anticuerpos correspondientes. Control (Con)

significa células que no se exponían a VK3. El p-EGFR relativo se expresó como la intensidad de bandas de p-EGFR en cada uno de los puntos temporales medida mediante una densitometría láser en comparación con la del control como uno (B).

Figura 5. La Vitamina K3 inhibe la actividad de fosfatasa. Células A431 se expusieron a VK3 0,1 mM durante 1 hora. Después de la exposición, las células se lavaron tres veces con medio frío y a continuación se reincubaron en medio libre de VK3 con suero bovino fetal al 10% durante el tiempo indicado. Las células se recogieron y los extractos celulares se prepararon para el ensayo de actividad de fosfatasa usando pNPP (4-nitrofenilfosfato disódico) como un sustrato. Control (Con) significa la actividad de fosfatasa en células sin exposición a VK3. La actividad relativa de fosfatasa se expresó en comparación con la del control como uno. La inhibición de fosfatasa inducida por VK3 es reversible después de la retirada de VK3.

Figura 6. Efecto de la Vitamina K3 (menadiona) sobre la inhibición inducida por erlotinib de la fosforilación de EGFR en piel de ratón. La Vitamina K3 rescata la inhibición inducida por erlotinib de la fosforilación de EGFR en tejido cutáneo de ratón. A los ratones se les administraron P.O. diariamente 50 mg/kg de erlotinib; la piel del ratón se frotó con solución etanólica de VK3 15 mM. Después del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se recogió tejido cutáneo. Se usaron 100 mg de tejido cutáneo para la preparación de extractos tisulares. Cantidades iguales de extractos de tejido cutáneo (80 µg de proteína) se sometieron a una PAGE en presencia de SDS al 7,5%. El EGFR total y el p-EGFR se detectaron mediante análisis de inmunotransferencia.

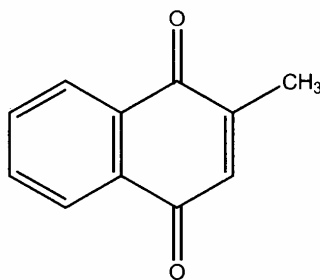
Figura 7. Efecto de VK3, Cream B y Cream VK sobre la fosforilación de EGFR en tejido cutáneo de ratón. Los ratones se frotaron con VK3 30 mM o 100 mM (en etanol), o con las mismas dosis de Cream B o Cream VK. Después del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se tomaron tejidos cutáneos para la preparación de extractos tisulares. Cantidades iguales de extractos tisulares (80 µg de proteína) se sometieron a una PAGE en presencia de SDS al 7,5%. El EGFR total y el p-EGFR se detectaron mediante análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos policlonales anti-EGFR y p-EGFR. Cream B es un producto de libre adquisición (BabyCakes) que contiene Vitamina K3 de acuerdo con su etiqueta; la concentración no se especifica. Cream VK es una crema de Vitamina K al 5% de libre adquisición. En contraste con la VK3 30 mM o 100 mM, las cremas comerciales no muestran efecto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

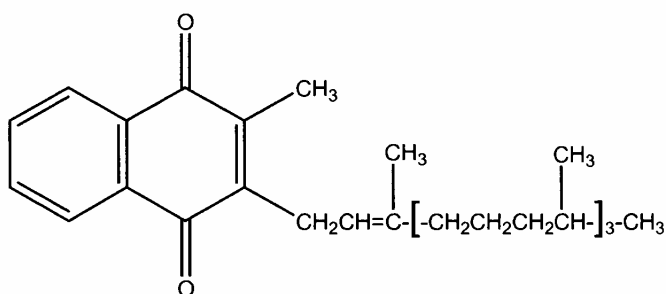
La presente invención se dirige a Vitamina K1 o Vitamina K3 para el uso en un método para tratar una erupción cutánea secundaria a una terapia anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en un sujeto que recibe dicha terapia, comprendiendo el método aplicar un análogo de vitamina K a la erupción cutánea en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la erupción cutánea, en donde la Vitamina K1 o Vitamina K3 se formula en una formulación farmacéutica adecuada para la administración tópica. La presente invención también proporciona el uso de Vitamina K1 o Vitamina K3 en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una erupción cutánea secundaria a una terapia anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en donde la composición farmacéutica se formula para la administración tópica y comprende una cantidad de Vitamina K1 o Vitamina K3 eficaz para tratar o prevenir dicha erupción cutánea. Según se usa en la presente memoria, el término "tratar" una erupción cutánea secundaria a una terapia anti-EGFR significa reducir o eliminar la erupción cutánea, y/o disminuir o eliminar el incremento o la extensión de la erupción cutánea en la piel del sujeto.

Sujetos que reciben terapia anti-EGFR incluyen pacientes que reciben tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR tal como cetuximab y/o un inhibidor de tirosina quinasa de EGFR tal como gefitinib o erlotinib. La Vitamina K1 es 2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona y la Vitamina K3 es 2-metil-1,4-naftoquinona (menadiona).

La Vitamina K3 tiene la estructura:



La Vitamina K1 tiene la estructura:



Formas preferidas de la vitamina K1 son el isómero trans de la vitamina K1 o una mezcla de los isómeros trans y cis, ya que el isómero cis tiene poca o ninguna actividad biológica (Matschiner et ál., 1972).

La Vitamina K1 se presenta en la naturaleza. La Vitamina K3 es un análogo sintético. Se han descrito procedimientos para preparar análogos devitamina K, p. ej. las Patentes de EE. UU. N° 4.374.775, 4.906.411, 5.412.124, 5.637.741, 5.770.774 y 6.579.994 ySah (1949-50). LasVitaminasK1 y K3 están disponibles, p. ej., de Sigma-Aldrich.

Las Vitaminas K1 y K3 pueden activar EGFR, Akt y/o Stat-3. Según se usa en la presente memoria, "activar" EGFR, Akt y/o Stat-3 significa incrementar la forma fosforilada de EGFR, Akt y/o Stat-3.

Según se usa en la presente memoria, para tratar una erupción cutánea, la Vitamina K1 o K3 se aplica tópicamente a la piel. Los compuestos de Vitamina K son fácilmente solubles en alcohol etílico y disolventes orgánicos y pueden prepararse en formulaciones para uso tópico a las concentraciones deseadas. El análogo de vitamina K puede aplicarse a la piel usando, p. ej., cremas, geles, emulsiones, lociones, líquidos y/o liposomas. La formulación puede ser una formulación que proporcione liberación sostenida del análogo de vitamina K. Formulaciones cutáneas tópicas pueden incluir, porejemplo, ingredientes que incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes: alcohol etílico, alcohol isopropílico, alcohol bencílico, alcohol cetílico, alcohol estearílico, gránulos de lecitina, palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo, propilparabén, metilparabén, un tensioactivo (p. ej., Pluronic F-127 NF), Dowicil 200, un aceite mineral, un aceite natural, un aceite silicónico, parafina, glicerina, diéster de ácido esteárico, estearato de glicerol, estabilizantes tales como ciclodextrina y filtros ultravioleta (UV).

20 La Vitamina K1 o K3 puede aplicarse a la piel hasta la dosis máxima tolerada, que puede variar de sujeto a sujeto y depender del análogo de vitamina K específico usado en el tratamiento. La dosis máxima tolerada puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica. Preferiblemente, la Vitamina K1 o K3 se aplica a la piel a una concentración de al menos 100 μ M o al menos 15 μ g/ml. Preferiblemente, la vitamina K3 se aplica a una concentración de 50 μ g/ml a 200 μ g/ml, máspreferiblemente 75 μ g/ml a 100 μ g/ml. Preferiblemente, la vitamina K1
25 se aplica a la piel a una concentración de al menos 450 μ g/ml.

El tratamiento con la Vitamina K1 o K3 puede comenzar, por ejemplo, el día del inicio de la terapia con un agente anti-EGFR o tan pronto como aparezca la erupción cutánea según sea prescrito de otro modo por un médico. La Vitamina K1 o K3 se administra periódicamente durante el transcurso de la terapia con el agente anti-EGFR. La frecuencia de la administración variará de acuerdo con la formulación, por ejemplo, de 1 a 3 veces al día, diariamente o una vez al día si y uno no o según sea prescrito de otro modo por un médico. Una formulación de liberación sostenida requerirá una administración menos frecuente que una formulación que no proporcione liberación sostenida o lenta del análogo de vitamina K.

La invención proporciona un método para prevenir una erupción cutánea secundaria a una terapia anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en un sujeto que recibe tal terapia, comprendiendo el método aplicar un análogo de vitamina K a la piel en una cantidad eficaz para prevenir la erupción cutánea, según se describe en la presente memoria para el tratamiento de una erupción cutánea secundaria a una terapia anti-EGFR se produce comúnmente en la cara y el tronco. Preferiblemente, la vitamina K se aplica a áreas del cuerpo en las que la erupción cutánea aparece típicamente secundaria a una terapia anti-EGFR, tales como la cara y el tronco, o a un área del cuerpo en la que el sujeto ha experimentado una erupción cutánea antes de la terapia anti-EGFR. Para prevenir la erupción cutánea, la vitamina K o K3 puede aplicarse a la piel empezando, por ejemplo, el día del inicio de la terapia con el agente anti-EGFR o según sea prescrito de otro modo por un médico.

La invención presenta una composición farmacéutica que comprende una cantidad de cualquiera de los análogos de vitamina K descritos en la presente memoria eficaz para tratar y/o prevenir una erupción cutánea secundaria a una terapia anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Las composiciones también pueden incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable. Según se usa en la presente invención, el término "vehículo" abarca

vehículos farmacéuticos estándar tales como alcohol etílico y disolventes orgánicos. En una realización preferida, la composición farmacéutica se formula para la administración tópica. La Vitamina K1 o K3 puede formularse en una formulación de liberación sostenida.

- 5 Esta invención se entenderá mejor a partir de los Detalles Experimentales que siguen. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los métodos y los resultados específicos analizados son meramente ilustrativos de la invención que se describe más a fondo en las reivindicaciones que siguen posteriormente.

DETALLES EXPERIMENTALES

Materiales y Métodos

- 10 Se usaron dos líneas celulares humanas que sobreexpresan EGFR no mutado: carcinoma vulvar A431 y carcinoma de cabeza y cuello HN5. Las células se expusieron a diferentes concentraciones de diferentes análogos de vitamina K en presencia de uno de tres inhibidores de EGFR: el anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab (Erbix®) y los inhibidores de tirosina quinasa (TKI) de EGFR erlotinib (Tarceva®) y gefitinib (Iressa®). La citotoxicidad se evaluó mediante conteo celular. Las células se sometieron a lisis y los efectos de diferentes análogos de vitamina K sobre la activación de EGFR, la quinasa Akt, y el transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT-3) se evaluaron mediante análisis de transferencia western usando anticuerpos para las formas fosforiladas (activadas) de EGFR, Akt y Stat-3. Los anticuerpos policlonales de anti-EGFR, anti-phos-EGFR (Tyr1068), anti-AKT, anti-phos-AKT (Ser473), anti-Stat-3 y anti-phos-Stat-3 (Tyr-705) se adquirieron de Cell Signaling (Beverly, MA). Las Vitaminas K1, K2 y K3 se adquirieron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). La activación de EGFR, Akt y Stat-3 se evaluó en presencia y ausencia de tratamientos anti-EGFR de las células. La activación de EGFR mediante análogo de vitamina K también se evaluó usando piel de ratón, que se homogeneizó y se sometió a lisis después del tratamiento con análogo de vitamina K. La actividad de fosfatasa se determinó usando pNPP (4-nitrofenilfosfato disódico) como un sustrato.

Resultados

- 25 Los efectos de las Vitaminas K1, K2 y K3 sobre la activación (fosforilación) de EGFR, Akt y Stat-3 obtenidos a partir de células A431 sometidas a lisis se muestran en la Figura 1A-1C. La Vitamina K3 activaba EGFR y los componentes de señalización intracelulares aguas abajo Akt y Stat-3. Los efectos se observaron claramente a una concentración de Vitamina K3 de 100 μ M, o aproximadamente 17 μ g/ml. La Vitamina K1 solo era eficaz para activar EGFR y Akt a la mayor concentración usada (1000 μ M o aproximadamente 450 μ g/ml). La Vitamina K2 tenía poco o ningún efecto a las concentraciones usadas (hasta 1000 μ M). Así, la Vitamina K3 es un estimulante mucho más potente de EGFR, Akt y Stat-3 que la Vitamina K1 o la Vitamina K2. La aplicación de Vitamina K3 a piel normal de ratón también activaba EGFR.

- 35 La activación con Vitamina K3 de EGFR, Stat-3 y Akt se probó en presencia de tratamientos anti-EGFR. Células A431 o células HN5 almacenadas en medio libre de suero se trataron con el inhibidor de tirosina quinasa de EGFR erlotinib (2 μ M) y con Vitamina K3 (0,01-0,5 mM). La Vitamina K3 activaba EGFR (Figura 2) y Stat-3 (a concentraciones de 0,1 y 0,5 mM de vitamina K3) y Akt (a una concentración de 0,5 mM de vitamina K3) en presencia de erlotinib. De forma similar, la Vitamina K3 (0,1 y 0,5 mM) también activaba EGFR, Stat-3 y Akt en presencia del anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab. La Vitamina K3 también rescata la inhibición inducida por erlotinib de la fosforilación de EGFR en tejido cutáneo de ratón, como se muestra en la Figura 6.

- 40 Las células se trataron con EGF en exceso para determinar si el EGF podía prevenir la inhibición de EGFR mediante diferentes tratamientos anti-EGFR. El EGF era eficaz para prevenir la inhibición de EGFR mediante el anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab, que actúa en la porción extracelular del EGFR. En contraste, el tratamiento de células con EGF (2 μ g/ml) no previene la inhibición de EGFR mediante el inhibidor de tirosina quinasa de EGFR erlotinib, que actúa en la porción intracelular del EGFR (Figura 2).

- 45 La exposición de células de carcinoma vulvar A431 humano al inhibidor de tirosina quinasa de EGFR erlotinib da como resultado la muerte celular. La coincubación de las células con Vitamina K3 (50-100 μ M) disminuía la citotoxicidad del inhibidor de EGFR en 4-6 veces. La Figura 3 ilustra resultados obtenidos con dos concentraciones diferentes de Vitamina K3 en el rescate de células tratadas con erlotinib. Los efectos de la vitamina K3 son reversibles. La Figura 4A-4B muestra que la fosforilación inducida por vitamina K3 de EGFR es reversible en células A431.

- 50 La Vitamina K3 actúa al menos en parte inhibiendo la actividad de fosfatasa, según se muestra en la Figura 5. El efecto es reversible 2-3 horas después de la retirada de la Vitamina K3.

El efecto de la Vitamina K3 se examinó en la piel de animales que reciben el inhibidor de TK de EGFR erlotinib, 100mg/kg x 10 días (días 1-10). En comparación con piel de control en ratones que no recibían erlotinib, la piel

tratada con Vitamina K3 en animales que recibían erlotinib mostraba una expresión de p-EGFR significativa, mientras que la piel no tratada con Vitamina K3 en los mismos animales mostraba regulación a la baja de p-EGFR. (Figura 6). La piel de los ratones se frotó con Vitamina K3 en etanol (15 mM dos veces al día x 5 días durante los días 5 a 10). El efecto de la Vitamina K3 se comparó con el de las dos cremas de libre adquisición. Cream B (Baby Cakes) es un producto de libre adquisición que contiene Vitamina K3 de acuerdo con su etiqueta; la concentración no se especifica. Cream VK es una crema con Vitamina K al 5% de libre adquisición. El efecto de VK3, Cream B y Cream VK sobre la fosforilación de EGFR en tejido cutáneo de ratón se muestra en la Figura 7. Los ratones se frotaron con Vitamina K3 (en etanol) 30 mM o 100 mM x 3 dosis cada 12 horas, o con las mismas dosis de Cream B o Cream VK. En contraste con VK3 30 mM o 100 mM, que activa el EGFR, las cremas comerciales no muestran efecto.

10 Análisis

La presente solicitud divulga que la Vitamina K3 puede prevenir los efectos inhibidores de EGFR de una terapia anti-EGFR en líneas celulares tumorales de origen epitelial que sobreexpresan EGFR. El eje de EGFR en estas células es representativo del eje de EGFR en queratinocitos cutáneos. La Vitamina K3 tenía un efecto estimulante sobre la ruta de señalización intracelular de EGFR, que era eficaz incluso en presencia de terapia anti-EGFR. La Vitamina K3 también activaba EGFR procedente de piel de mamífero (ratón) normal. Se observaron efectos estimulantes más débiles sobre EGFR con Vitamina K1 pero no con Vitamina K2. Los presentes resultados demuestran la eficacia inesperada de la Vitamina K3, en comparación con la Vitamina K1 o K2 o con dos cremas cutáneas de Vitamina K de libre adquisición, para combatir la terapia anti-EGFR. El uso de vitamina K3 para el tratamiento y la prevención de una erupción cutánea según se divulga en la presente solicitud es contrario a la intuición a la vista de informes previos de que la administración tópica de vitamina K3 provoca dermatitis (Page et ál., 1942) y vesiculación de la piel (Ulbrich, 1961). También se observó que la Vitamina K3 inhibía la actividad de fosfatasa celular, proporcionando así el uso de inhibidores de fosfatasa para el tratamiento y la prevención de una erupción cutánea y trastornos cutáneos o mucosales relacionados.

Referencias

- 25 Bae EY, Oh H, Oh WK, Kim MS, Kim BS, Kim BY, Sohn CB, Osada H, Ahn JS. A new VHR dual-specificity protein tyrosine phosphatase inhibitor from *Dendrobium moniliforme*. *Planta Med.* 70(9):869-70, 2004.

Cohen EE, Rosen F, Stadler WM, Recant W, Stenson K, Huo D, Vokes EE. Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 21(10):1980-7, 2003.
- 30 Gerling N, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J. The tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate mimics NGF-induced neuroprotective signaling in rat hippocampal neurons. *Neurochem Int.* 2004 Jun;44(7):505-20, 2004.

Lage A, Crombet T, González G. Targeting epidermal growth factor receptor signaling: early results and future trends in oncology. *Ann Med.* 35(5):327-36, 2003.

Lee K, Burke TR Jr. CD45 protein-tyrosine phosphatase inhibitor development. *Curr Top Med Chem.* 3(7):797-807, 2003.
- 35 Liem DA, Gho CC, Gho BC, Kazim S, Manintveld OC, Verdouw PD, Duncker DJ. The tyrosine phosphatase inhibitor bis(maltolato)oxovanadium attenuates myocardial reperfusion injury by opening ATP-sensitive potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Jun;309(3):1256-62. Epub 2004 Mar 1.

LoRusso PM. Phase I studies of ZD1839 in patients with common solid tumors. *Semin Oncol.* 30 (1 Supl 1):21-9, 2003.
- 40 Lou WW, Quintana AT, Geronemus RG, Grossman MC. Effects of topical vitamin K and retinol on laser-induced purpura on nonlesional skin. *Dermatol Surg.* 25(12):942-4, 1999.

Matschiner JT, Bell RG. Metabolism and vitamin K activity of cis phylloquinone in rats. *J Nutr.* 102(5):625-629, 1972.

Page, RC y Bercovitz, Z. Dermatitis from topical administration of 2-methyl-1:4-naphthoquinone (synthetic vitamin K analogue). *Am. J. Med. Sci.* 203: 566-569, 1942.
- 45 Sah, PP. Synthesis of 3-methyl-4-amino-1-naphthol hydrochloride (vitamin K7) and related vitamin-K-active compounds. *Z Vitam Horm Fermentforsch* 3(3-4):324-45, 1949-1950.

Shah NS, Lazarus MC, Bugdodel R, Hsia SL, He J, Duncan R, Baumann L. The effects of topical vitamin K on bruising after laser treatment. *J Am Acad Dermatol.* 47(2):241-4, 2002.

Ulbrich, AP. Topical application of menadione, a synthetic vitamin K: preliminary report. J. Am. Osteopathic Assoc.60: 370-374, 1961.

Vanhoefer U, Tewes M, Rojo F, Dirsch O, Schleucher N, Rosen O, Tillner J, Kovar A, Braun AH, Trarbach T, SeeberS, Harstrick A, Baselga J. Phase I study of the humanized antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibodyEMD72000 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor receptor. J Clin Oncol.22(1):175-84,2004.

Publicación Internacional PCT N° WO 97/39746, 30 de octubre de 1997, Method of and composition for treating disorders of the skin using vitamin K.

Publicación Internacional PCT N° WO 02/13780, 21 de febrero de 2002, Cosmetic cream.

Publicación Internacional PCT N° WO 03/101415, 11 de diciembre de 2003, Compositing comprising vitamin K.

Publicación Internacional PCT N° WO 2004/019923, 11 de marzo de 2004, Compositions comprising vitamin K for treating or preventing age-related stiffening of arteries.

Patente de EE. UU. N° 4.374.775, expedida el 22 de febrero de 1983, Dötz KH, Process for preparing vitamin K.

Patente de EE. UU. N° 4.906.411, expedida el 6 de marzo de 1990, Shinnaka A et ál., Process for producing 2-methyl-1,4-naphthoquinone.

Patente de EE. UU. N° 5.155.031, expedida el 13 de octubre de 1992, Posner et ál., Use of pervanadate as an inhibitor of phosphotyrosine phosphatase.

Patente de EE. UU. N° 5.412.125, expedida el 2 de mayo de 1995, Hamamura K et ál., Preparation process of naphthoquinone derivative and intermediate for the preparation thereof.

Patente de EE. UU. N° 5,510,391, expedida el 23 de abril de 1996, Elson ML, Method of treating blood vessel disorders of the skin using vitamin K.

Patente de EE. UU. N° 5,637,741, expedida el 10 de junio de 1997, Matsumoto Y et ál., Process for producing 2-methyl-1,4-naphthoquinone.

Patente de EE. UU. N° 5,770,774, expedida el 23 de junio de 1998, Joo YJ et ál., Method for preparing 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K3).

Patente de EE. UU. N° 6,428,949 B1, expedida el 6 de agosto de 2002, Bandman et ál., Human phosphatase inhibitor protein.

Patente de EE. UU. N° 6,579,994, expedida el 17 de junio de 2003, Sankarasubbier N et ál., Process for preparation of 2-methyl-1,4-naphthoquinone.

Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° US 2003/0170187, publicada el 11 de septiembre de 2003, Marchal A, Skin treatments containing nano-sized vitamin K.

Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° US 2004/0138218 A1, publicada el 15 de julio de 2004, Pallen et ál., Novel protein tyrosine phosphatase inhibitor.

REIVINDICACIONES

1. Vitamina K1 o Vitamina K3 para el uso en un método para tratar o prevenir una erupción cutánea secundaria a una terapia anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en un sujeto que recibe dicha terapia, comprendiendo el método aplicar la Vitamina K1 o la Vitamina K3 a la piel en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la erupción cutánea, en donde la Vitamina K1 o la Vitamina K3 se formula en una formulación farmacéutica adecuada para la administración tópica.
2. Vitamina K1 o Vitamina K3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la terapia anti-EGFR es un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR.
3. Vitamina K1 o Vitamina K3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo anti-EGFR es cetuximab.
4. Vitamina K1 o Vitamina K3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la terapia anti-EGFR es un tratamiento con un inhibidor de tirosina quinasa de EGFR.
5. Vitamina K1 o Vitamina K3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el inhibidor de tirosina quinasa de EGFR es gefitinib o erlotinib.
6. Vitamina K3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la vitamina K3 se aplica a la piel en una concentración de al menos 15 µg/ml.
7. Vitamina K3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la vitamina K3 se aplica a la piel en una concentración de 50 µg/ml a 200 µg/ml.
8. Vitamina K3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la vitamina K3 se aplica a la piel en una concentración de 75 µg/ml a 100 µg/ml.
9. Vitamina K1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la vitamina K1 se aplica a la piel en una concentración de al menos 450 µg/ml.
10. Vitamina K1 o Vitamina K3 para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la Vitamina K1 o la Vitamina K3 se formula como una formulación de liberación sostenida.
11. Vitamina K1 o Vitamina K3 para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la Vitamina K1 o la Vitamina K3 se aplica a la cara o al tronco.
12. Uso de Vitamina K1 o Vitamina K3 en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una erupción cutánea secundaria a una terapia anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en donde la composición farmacéutica se formula para la administración tópica y comprende una cantidad de Vitamina K1 o Vitamina K3 eficaz para tratar o prevenir dicha erupción cutánea.
13. El uso de Vitamina K3 de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición se formula con al menos 15 µg/ml de vitamina K3.
14. El uso de Vitamina K3 de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición se formula con de 50 µg/ml a 200 µg/ml de vitamina K3.
15. El uso de Vitamina K3 de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición se formula con de 75 µg/ml a 100 µg/ml de vitamina K3.
16. El uso de Vitamina K1 de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición se formula con al menos 450 µg/ml de vitamina K1.
17. El uso de Vitamina K1 o Vitamina K3 de acuerdo con las reivindicaciones 12-16, en donde la Vitamina K1 o la Vitamina K3 se formula como una formulación de liberación sostenida.

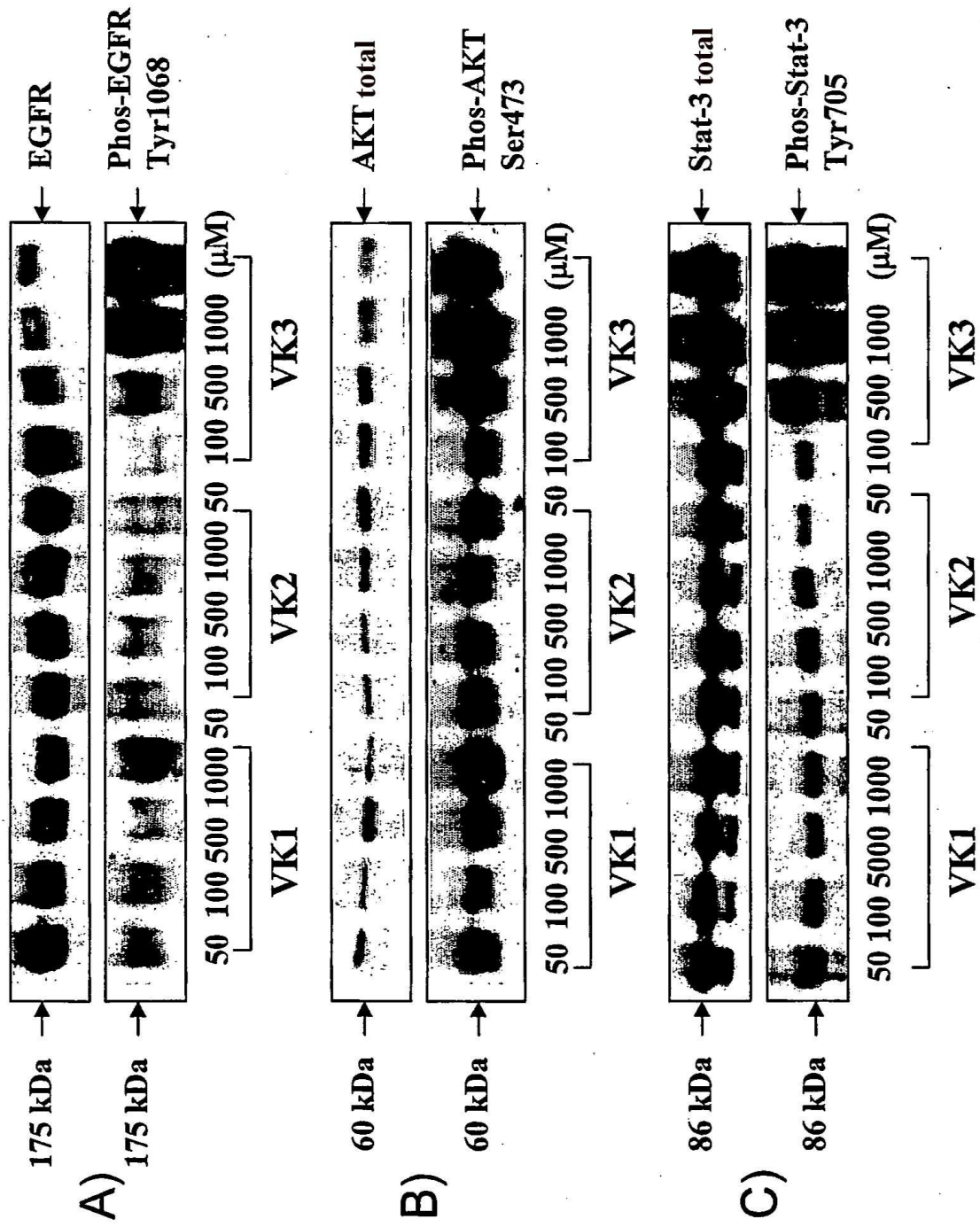


FIGURA 1A-1C

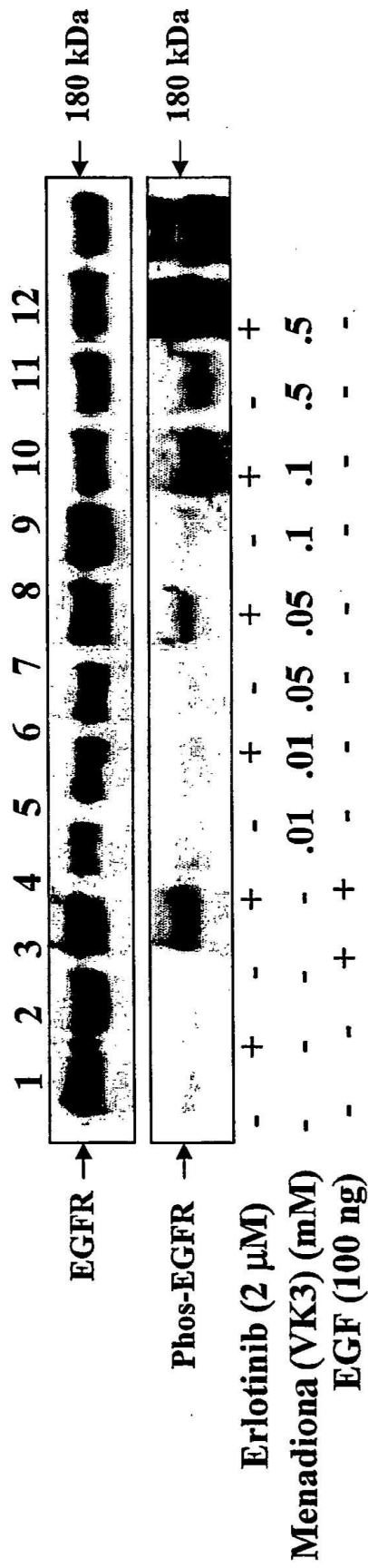


FIGURA 2

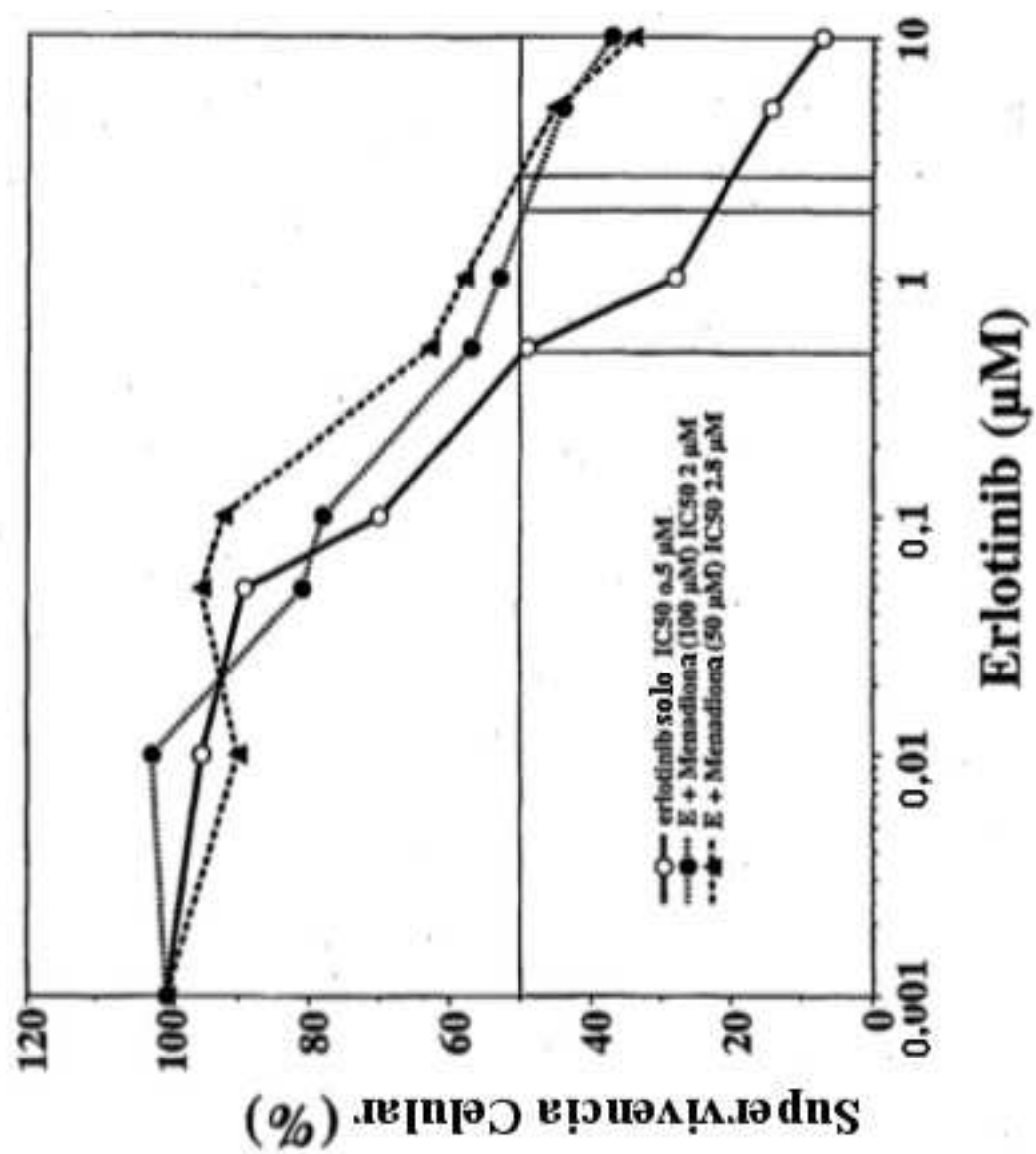


FIGURA 3

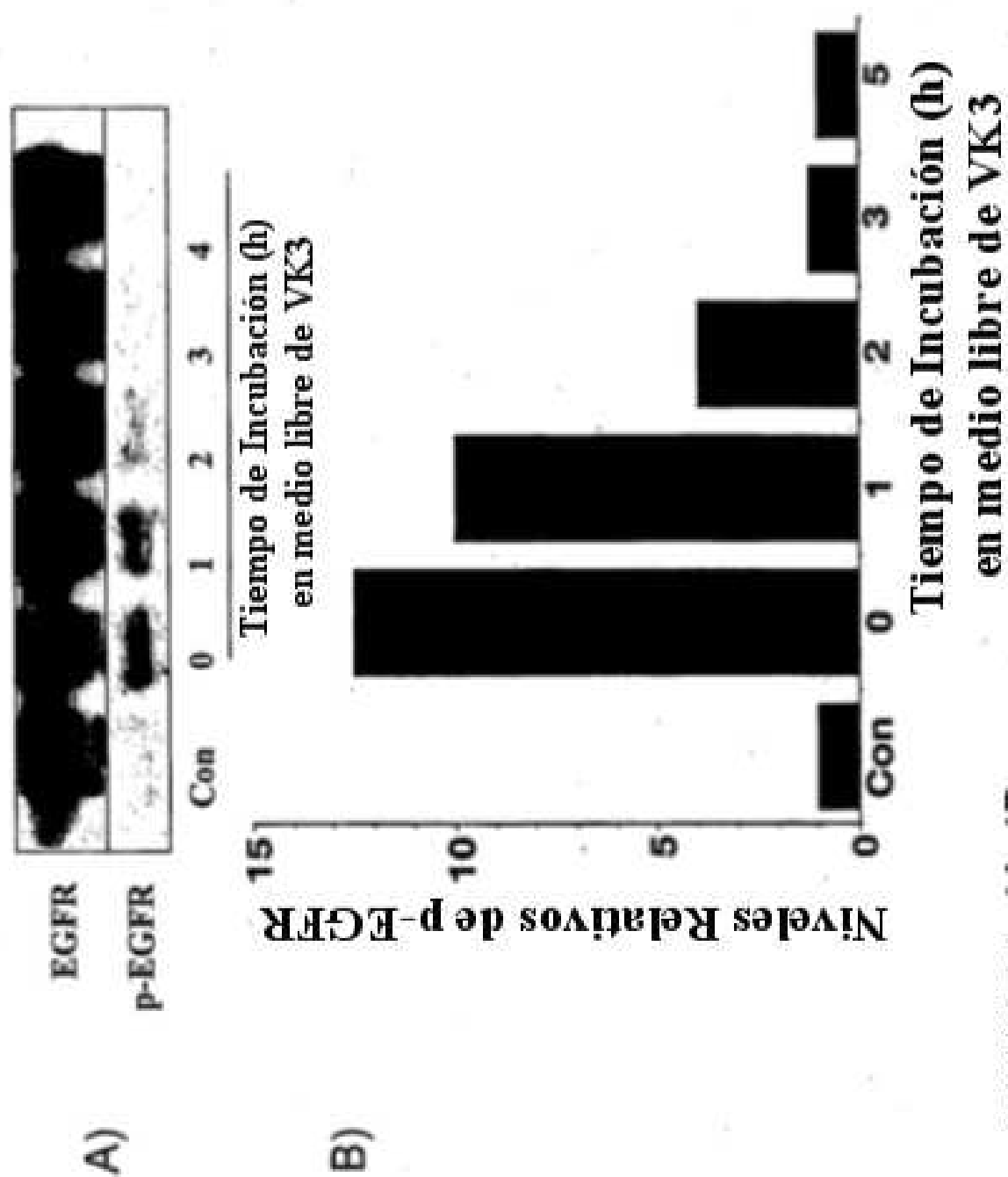
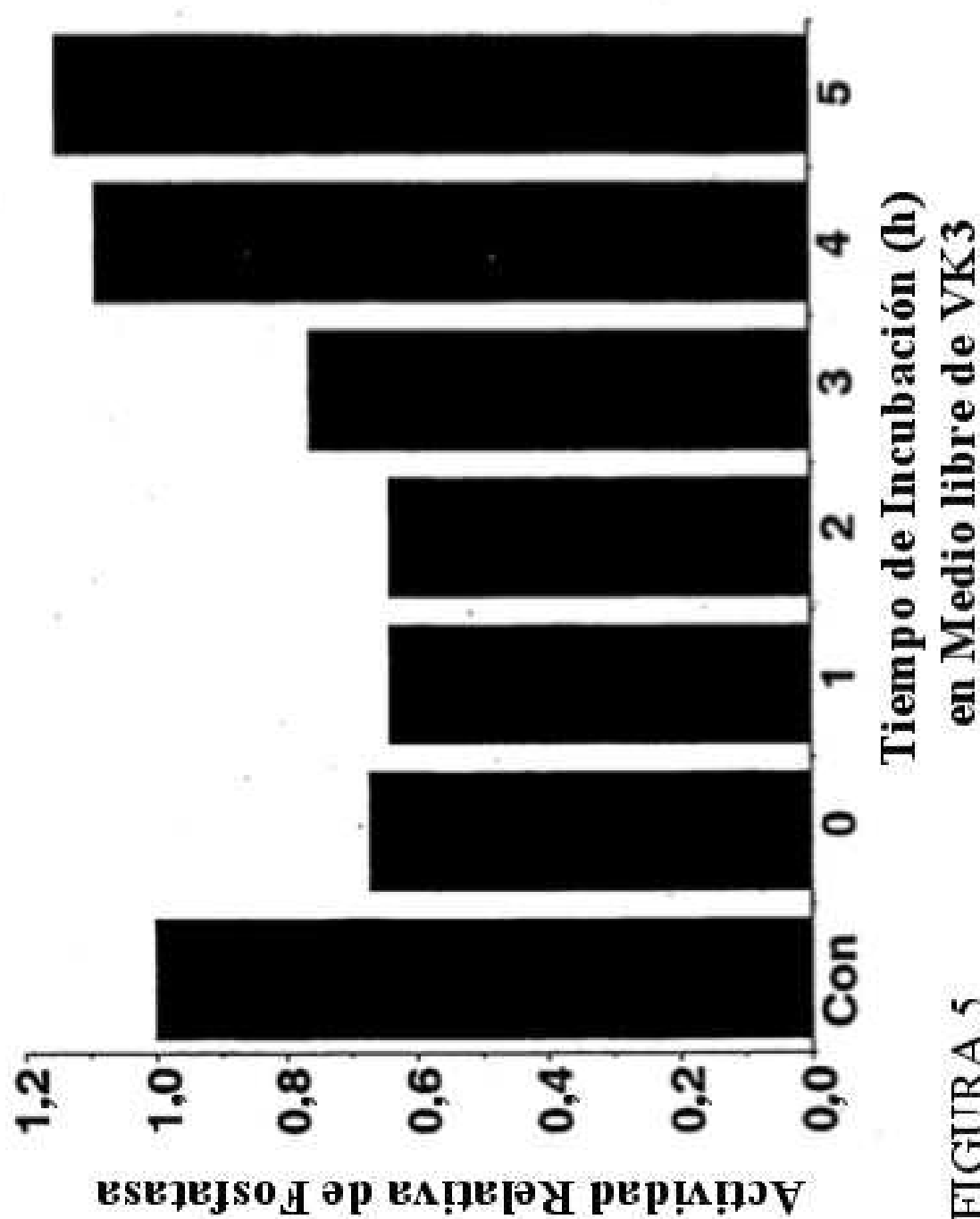


FIGURA 4A-4B



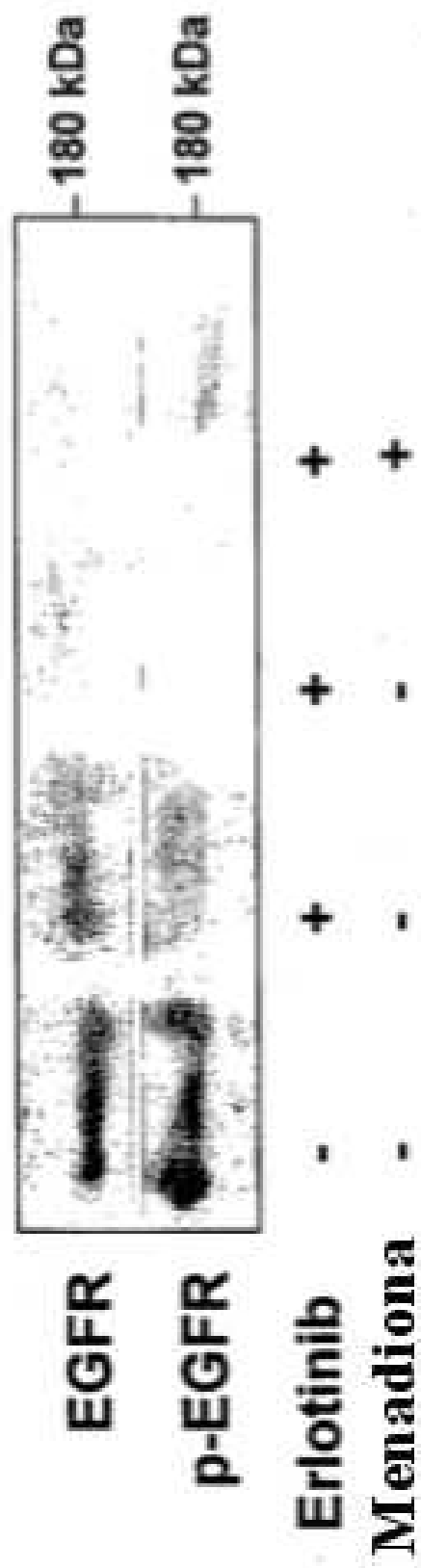


FIGURA 6

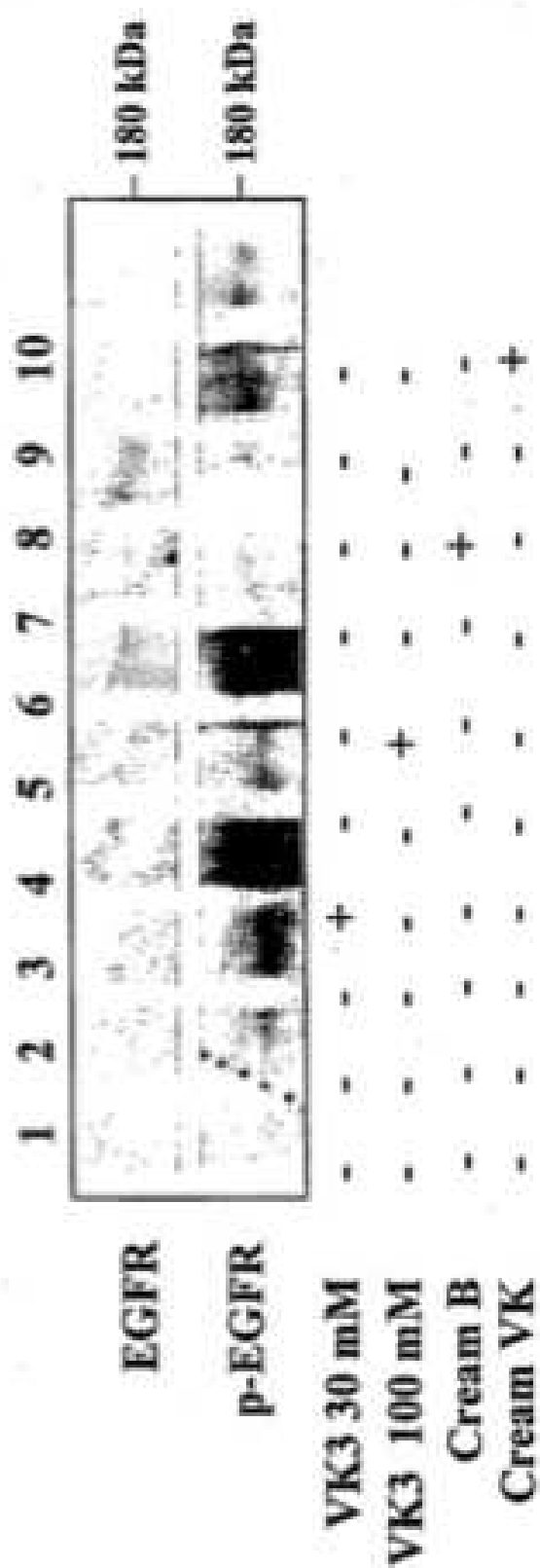


FIGURA 7