

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 827**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2003 E 03712652 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1482967**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas y cosméticas que contienen PLGF-1**

30 Prioridad:

05.03.2002 IT RM20020119

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

08.10.2013

73 Titular/es:

**GEYMONAT S.P.A. (100.0%)
2 VIA S. ANNA
I-03012 ANAGNI FR, IT**

72 Inventor/es:

**MAGLIONE, DOMENICO;
BATTISTI, MAURO;
CONTI, ETTORE;
SALVIA, GIUSEPPE y
TUCCI, MARINA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 424 827 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

Composiciones farmacéuticas y cosméticas que contienen PLGF-1

5 Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere a la preparación de composiciones terapéuticas y cosméticas capaces de aumentar la angiogénesis del tejido conjuntivo cutáneo, subcutáneo y de los órganos internos, que contienen el factor de crecimiento placentario (PLGF). Por lo tanto estas composiciones son adecuadas para el tratamiento de estados patológicos o naturales que se benefician de la formación o regeneración de nuevos vasos en el sistema cutáneo, como por ejemplo esclerodermia en sus diversas manifestaciones, envejecimiento de la piel o pérdida de cabello.

Estado técnico

15 El factor de crecimiento placentario (PLGF) es una glicoproteína homodimérica que regula la angiogénesis. La secuencia polinucleótida completa que codifica la proteína PLGF fue descrita por Maglione y Persico en la patente EP-B-0 550 519 (WO-A-92/06194). Por empalmes alternativos de PGLF ARN se generan tres formas homólogas, en concreto PLGF-1, PLGF-2 y PLGF-3, las cuales poseen secuencias polipeptídicas diferentes y están descritas en la literatura.

20 En el estado técnico se describen, o meramente se suponen, aplicaciones terapéuticas del PLGF-1. La patente EP-B-0550519 se indica el empleo hipotético de PLGF en el tratamiento de estados inflamatorios genéricos, heridas, quemaduras, úlceras y periodos postoperatorios. La solicitud de patente internacional WO-A-01/56593 describe el empleo sistémico parenteral de los factores VEGF y PLGF en el tratamiento y prevención de la isquemia cerebral, miocárdica y periférica. El artículo científico publicado en "Il Farmaco", vol. 55, (2000), páginas 165-167 (Maglione y otros) describe también la eficacia del PLGF-1 para evitar la isquemia miocárdica y reducir la gravedad del infarto. Por último Faille y otros, en el "Journal Invest. Dermatol.", 115(3), Sep. 2000, páginas 388-395, comunican que en los queratocitos implicados en los procesos de reparación del tejido lesionado se induce la producción de PLGF. Ziche y otros, "PLGF-1 is Chemotectic Mitogenic and Angiogenic" [el PLGF-1 es un factor quimiotáctico mitogénico y angiogénico], Laboratory Investigation, USA and Canadian Academy of Pathology. vol. 76, nº. 4, abril 1997 (1997-04), páginas 517-531, revelan un implante corneal de una solución que contiene pequeñas cantidades de PLGF-1 purificado, producido como proteína recombinante en células huésped eucariotas y que por tanto está glicosilado. Este documento no describe el empleo de PLGF-1 para tratar enfermedades de los tejidos conjuntivos cutáneos o subcutáneos, la esclerodermia o el envejecimiento de la piel. Sin embargo la información del estado técnico previo no permite concluir que el PLGF-1 sea efectivo en la prevención o en el tratamiento curativo de enfermedades o alteraciones patológicas relacionadas con el tejido conjuntivo cutáneo, subcutáneo y de los órganos internos. En particular las informaciones del estado técnico previo no permiten concluir que la administración de PLGF exógeno pueda influenciar *in vivo* la vascularización cutánea con respecto a estados patológicos y a situaciones naturales. Un efecto promotor de angiogénesis y en particular de vascularización cutánea a consecuencia de la administración de PLGF exógeno obtenido según la presente invención es especialmente ventajoso para el tratamiento de estados patológicos o fisiológicos susceptibles de mejora mediante un aporte de sangre más efectivo.

Resumen de la presente invención

45 La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que un incremento de los niveles de PLGF-1 en los tejidos que forman el cutis y sobre todo en el tejido conjuntivo va acompañado por un aumento de la vascularización cutánea. Asimismo se ha observado que dicho incremento de los niveles tisulares de PLGF-1 se puede conseguir ventajosamente mediante la administración de PLGF exógeno, empleando las composiciones parenterales o tópicas conforme a la presente invención. La estimulación de la angiogénesis resultó ser útil en el tratamiento de patologías típicas del tejido conjuntivo cutáneo, subcutáneo y de los órganos internos, de la esclerodermia en sus diferentes manifestaciones locales, de la esclerodermia sistémica progresiva y de la esclerosis sistémica, en la reparación de lesiones localizadas y úlceras, en el tratamiento de la calvicie natural o patológica, o en situaciones meramente fisiológicas tales como el envejecimiento de la piel, sobre todo debido a la exposición al sol o a agentes atmosféricos agresivos.

55 El objeto de la presente solicitud es el empleo de PLGF, en particular del tipo 1 de PLGF (PLGF-1), para preparar composiciones terapéuticas o cosméticas promotoras de angiogénesis en el tratamiento preventivo o curativo de enfermedades o alteraciones patológicas naturales relacionadas con el tejido conjuntivo cutáneo o subcutáneo y seleccionadas entre la esclerodermia, en particular esclerodermia localizada, sistémica progresiva, la esclerosis sistémica, el envejecimiento patológico de la piel por exposición a agentes atmosféricos/ambientales o a la radiación solar, y la calvicie de origen patológico.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de PLGF-1 en el tratamiento cosmético preventivo y curativo de la pérdida del cabello y del envejecimiento de la piel.

65 Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene el factor de crecimiento

placentario tipo 1 (PLGF-1) como principio activo y un excipiente farmacéuticamente aceptable, destinada a la promoción de la angiogénesis en el tratamiento preventivo o curativo de enfermedades o alteraciones patológicas relacionadas con el tejido conjuntivo cutáneo o subcutáneo, seleccionadas entre:

- esclerodermia o
- 5 – envejecimiento prematuro de la piel por exposición a agentes atmosféricos agresivos o a la radiación solar prolongada.

Otro aspecto de la presente invención es una composición cosmética de uso tópico que contiene PLGF-1 como principio activo y un excipiente cosméticamente aceptable, la cual se caracteriza porque al menos el 98,5% del PLGF-1 está en forma dímera y multímera activa, como mínimo el 70% en forma dímera y no más del 1,5% en forma monomérica, y porque se encuentra en forma de loción, emulsión W/O, emulsión O/W, suspensión, suspensión liposómica, gel, crema, pasta, ungüento.

Descripción detallada de la presente invención

15 El incremento de los niveles de PLGF-1 en los tejidos que forman la piel, y en particular en los queratinocitos, va acompañado por un aumento local de la vascularización. Este aumento de los niveles de PLGF-1 en los tejidos se puede alcanzar por administración sistémica o local de PLGF-1 exógeno.

20 Ensayos

La acción angiogénica del PLGF-1 se determinó por métodos conocidos efectuados *in vivo* o *in vitro*, tales como el ensayo de vascularización de córnea de conejo o el ensayo de vascularización de la membrana corioalantoidea de pollo. De acuerdo con la presente invención la vascularización cutánea se examinó mediante análisis morfométrico computarizado de muestras de piel, tal como describen Streit y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, Dec. 21st, 25 96(26), 14888-14893). Cortes de piel aislados de animales de laboratorio, tratados o no tratados según la presente invención, se prepararon con tinción inmunohistoquímica, empleando anticuerpos monoclonales anti-CD31 del animal utilizado. Los cortes así tratados se analizaron por microscopía electrónica y el análisis morfométrico de los tejidos se realizó mediante el programa IP-LAB (Scanalytics Inc.). Se determinó el número de vasos por mm², sus 30 tamaños promedio y el área respectiva ocupada por ellos, tal como describen Streit y otros.

En los animales tratados la administración local de PLGF-1 exógeno produjo un incremento significativo de los parámetros vasculares, tal como ilustran los ejemplos.

35 Un segundo método empleado para estimar la actividad angiogénica de la composición según la presente invención es la capilaroscopia y capilarometría microscópica *in vivo*. Esta conocida tecnología consiste en la observación microscópica directa del cutis, preferiblemente tratado con sustancias intensificadoras transparentes tales como vaselina o aceites vegetales. La zona preferida de análisis es la lámina ungular del dedo de la mano. El análisis de los datos obtenidos por capilaroscopia y capilarometría se puede realizar adecuadamente empleando sistemas de registro fotográfico y sistemas de reprocesamiento de datos por ordenador. Los parámetros tenidos en cuenta son la 40 morfología vascular, la morfología del tejido perivascular y el aspecto reológico. La observación morfológica registra cualquier aumento o disminución de la vascularización, la luz capilar y la densidad capilar por mm². La observación tisular evalúa la transparencia del tejido conjuntivo, la presencia de hemorragia o de depósitos de lípidos o colágeno esclerosado alrededor de los vasos capilares. En particular, la observación del tejido conjuntivo perivascular destaca 45 en condiciones normales el asa capilar rodeada por un halo de color más claro denominado halo capilar, formado por tejido laxo rico en glucosaminoglicanos. La desaparición o disminución de dicho halo es una señal de alteración estructural profunda del tejido conjuntivo. Otros tipos de alteración son la menor transparencia tisular que acompaña la esclerodermia. El aspecto reológico valora la velocidad de flujo o la presencia de agregados de eritrocitos o de trombosis.

50 La actividad de las composiciones de la presente invención en el tratamiento de la esclerodermia se evaluó en un modelo animal, tal como describen Yamamoto T. y otros en Arch. Dermatol. Res. Nov. 2000, 292(11), páginas 535-541. Se induce un estado esclerodérmico en ratones C3H mediante un tratamiento con bleomicina (100 mcg/ml) inyectada diariamente por vía subcutánea durante 3 semanas. Al cabo de 3 semanas se sacrifican los animales y se 55 analizan histológicamente muestras de piel de las zonas tratadas. El efecto del tratamiento indica manifestaciones histológicas atribuibles a la esclerotización cutánea inducida por la bleomicina y en concreto engrosamiento de la piel y elevados niveles de hidroxiprolina.

60 PLGF

El factor de crecimiento placentario tipo 1(PLGF-1) utilizado en la presente invención puede ser de origen extractivo u obtenido como un producto de expresión a partir de células huésped modificadas genéticamente. En la forma de ejecución preferida de la presente invención se emplea un factor altamente purificado, en forma sustancialmente homodimérica o multimérica, obtenido conforme al método revelado por los presentes inventores en la solicitud de 65 patente internacional PCT/IT 02/00065. En concreto se emplea un producto que contiene no menos del 98,5% de formas activas dímeras y multímeras, no menos del 70% de forma dímera y en cualquier caso no más del 1,5% de

forma monomérica. En el ámbito de la presente invención también se pueden usar cortes de PLGF-1 funcionalmente activos. Los cortes que muestran al menos el 30% de la actividad específica del factor purificado o, preferiblemente, como mínimo el 50% o, mejor, como mínimo el 90% de la misma actividad se pueden considerar funcionalmente equivalentes al factor natural.

5 Enfermedades

El tratamiento de la esclerodermia es un aspecto de la presente invención y de las composiciones de la misma.

10 La esclerodermia es una enfermedad que afecta al sistema microvascular y al tejido conjuntivo cutáneo, subcutáneo y de los órganos internos. La enfermedad induce la activación de los fibroblastos y una producción excesiva de depósito tisular y perivascular de colágeno, que contribuye en gran medida a la formación de fibrosis y zonas de calcificación y por tanto a la manifestación de los síntomas inducidos por la enfermedad. En particular se observa por capilaroscopia la presencia de grandes cantidades de colágeno esclerotizado alrededor de los vasos cutáneos, que
15 provoca el estrechamiento de la luz vascular.

Existe una esclerodermia local diferenciada, con implicación cutánea, que se caracteriza por un endurecimiento y engrosamiento de la piel a causa de una deposición excesiva e inapropiada de colágeno, y una esclerodermia sistémica progresiva en la cual hay implicación de vasos sanguíneos y esclerosis sistémica con lesiones viscerales asociadas a la fibrosis cutánea. El cutis, sobre todo el de los dedos y las manos, tiene aspecto endurecido, grueso y edematoso. Además la enfermedad se manifiesta a nivel miocárdico con insuficiencia cardíaca, y a nivel pulmonar, gastrointestinal, renal y del sistema ósteo-muscular. Asimismo algunos pacientes desarrollan artropatías erosivas inducidas por fibrosis cutánea, que complican enormemente la movilidad de las articulaciones.

25 En relación con otros fármacos angiogénicos se ha indicado que la promoción de la angiogénesis, en particular de la angiogénesis cutánea, debida al tratamiento con dichos fármacos es beneficiosa para el historial de la enfermedad. En concreto, el análisis capilaroscópico *in vivo* de áreas cutáneas de pacientes afectados de esclerosis sistémica tratada con factores angiogénicos, ha demostrado un aumento estadísticamente importante de la vascularización, tanto en densidad como en calibre medio vascular. Además los nuevos vasos están libres de colágeno esclerosado y por tanto son capaces de mejorar el aporte de sangre al tejido. Este aumento va acompañado por una remisión parcial de las manifestaciones patológicas.

35 Sin pretender unir o limitar la presente invención a teorías científicas, se supone que en el efecto terapéutico ejercido por el PLGF-1 en el tratamiento de la esclerosis sistémica en un modelo animal interviene la acción vasodilatadora que acompaña a la angiogénesis *in vivo*. De hecho se ha demostrado que uno de los efectos inducidos por PLGF-1 es la estimulación de la generación de óxido de nitrógeno (NO), señalado por muchas evidencias científicas como un importante mediador de vasodilatación.

40 El mecanismo de acción, supuestamente basado en el efecto producido por el PLGF-1 al tratar la esclerodermia y sus manifestaciones colaterales, parece concordar hasta ahora con el tratamiento terapéutico de estas patologías. De hecho este tratamiento se basa en el uso combinado de diferentes medicamentos, entre los cuales hay agentes de efecto vascular y principalmente vasodilatador.

45 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al tratamiento de los fenómenos típicos del envejecimiento de la piel. Aunque se considera fundamentalmente cosmético, este tratamiento tiene implicaciones terapéuticas, teniendo en cuenta los fenómenos de deterioración prematura del tejido cutáneo debidos a la exposición prolongada a la radiación solar (fotoenvejecimiento), a otras radiaciones o a otras agresiones ambientales/atmosféricas.

50 La microscopía electrónica de muestras de piel dañada por la luz revela una morfología microvascular típica que, entre otras manifestaciones, se caracteriza por la presencia de capilares patológicamente dilatados, forrados de elastina o rodeados por un denso material amorfo. Asimismo se observa una presencia de células endoteliales activadas que llevan un mayor número de orgánulos citoplasmáticos y vesículas pinocíticas. Se ha comprobado que la estimulación de una nueva vascularización cutánea debida a la administración de PLGF-1, según la presente invención, genera en la piel envejecida, tanto natural como prematuramente, un efecto modulador sobre la matriz extracelular responsable del tono y espesor de la piel. La mayor vascularización capilar debida al tratamiento local prolongado con las composiciones de la presente invención va acompañada por un aumento de los fibroblastos y por la producción de nuevo colágeno, seguida de una mejoría general del aspecto de la piel.

60 Otro aspecto de la presente invención atañe a la pérdida de cabello.

La vascularización cutánea mejorada va acompañada de otra manifestación de importancia tanto terapéutica como cosmética, esto es, la modulación del crecimiento de los anexos cutáneos (pelo, etc.) como prevención contra la pérdida y estímulo de la regeneración.

65 La fase anágena, que corresponde al periodo de crecimiento del cabello, va acompañada por un aumento natural de la vascularización de los folículos capilares. La acción angiogénica del PLGF-1 aplicado localmente promueve este

5 aumento de la vascularización y el consiguiente crecimiento del cabello. El análisis morfométrico computarizado de segmentos de piel próximos al folículo capilar de animales tratados con las composiciones de la presente invención reveló no solamente un aumento de la luz y densidad capilar, y en consecuencia un incremento generalizado de la vascularización perifolicular, sino también un aumento de las dimensiones del bulbo piloso y del propio diámetro del

10 El efecto preventivo de la pérdida del cabello o el efecto promotor de su nuevo crecimiento no solo es aplicable al caso de la pérdida natural, sino también a la pérdida por estados clínicamente relevantes como alopecia, trastornos hormonales, quimioterapia, radioterapia o administración de medicamentos.

15 Cualquier formulación adecuada para la administración local o sistémica de agentes terapéuticos se puede usar de acuerdo con la presente invención. Las formulaciones de uso local se emplean en el campo de las aplicaciones cosméticas.

20 En concreto el factor PLGF-1 se puede administrar por vía parenteral con un efecto sistémico o local, o por vía tópica sobre la piel o las mucosas, con un efecto principalmente local. El efecto sistémico se logra sobre todo mediante administración endovenosa; la administración intraperitoneal o intramuscular también es adecuada. El efecto local se consigue por vía tópica o parenteral intramuscular, subcutánea o intraarticular. El factor PLGF-1 también se puede administrar localmente por vía electrotransportada o ionoforesis. Los implantes subcutáneos también son útiles, si se desea una liberación retardada. La administración oral del factor también es viable, pero menos aconsejable por la condición preecedera del producto activo.

25 Las composiciones para uso parenteral, sistémico o local comprenden soluciones, suspensiones, suspensiones liposómicas, emulsiones W/O o emulsiones O/W. Las composiciones para uso tópico incluyen soluciones, lociones, suspensiones, suspensiones liposómicas, emulsiones W/O o emulsiones O/W, geles, ungüentos, cremas, pomadas y pastas. Según una forma de ejecución preferida la sustancia activa se formula en forma liofilizada, mezclada con aditivos apropiados de liofilización y preparada para redisolverse con diluyentes terapéuticamente aceptables. Como aditivos de liofilización son útiles: tampones, polisacáridos, sacarosa, manitol, inositol, polipéptidos, aminoácidos y cualquier otro aditivo que sea compatible con la sustancia activa. En una forma de ejecución preferida de la presente

30 invención la sustancia activa se disuelve en tampón de fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4/2\text{H}_2\text{O}$), en cantidad tal que la relación PLGF-1/fosfato tras la liofilización quede comprendida entre 1:1 y 1:2. Los diluyentes útiles para el uso parenteral son: agua, soluciones fisiológicas, soluciones de azúcar, soluciones hidroalcohólicas, diluyentes oleosos, polioles como glicerina, etilen- o polipropilenglicol, y cualquier otro diluyente que por esterilidad, pH, fuerza iónica y viscosidad sea compatible con el método de administración.

35 En el caso de emulsiones o suspensiones la composición puede contener tensioactivos adecuados de tipo no iónico, zwitteriónico, aniónico o catiónico comúnmente empleados en la formulación de medicamentos. Las emulsiones hidrófilas de aceite/agua (O/W) se prefieren para uso sistémico parenteral, mientras que las emulsiones lipófilas de agua/aceite (W/O) se prefieren para uso local o tópico.

40 Además las composiciones de la presente invención pueden contener opcionalmente aditivos tales como agentes isotónicos, azúcares o polialcoholes, tampones, agentes quelantes, antioxidantes, antibacterianos.

45 Las composiciones de uso tópico abarcan formas líquidas o semisólidas. Las formas líquidas incluyen soluciones o lociones, que pueden ser acuosas, hidroalcohólicas, como etanol/agua, o alcohólicas, y se obtienen disolviendo la sustancia liofilizada.

50 Como alternativa se pueden formular soluciones de sustancia activa en forma de gel, añadiendo agentes gelificantes conocidos como almidón, glicerina, polietilen- o polipropilenglicol, poli(met)acrilato, isopropanol, hidroxistearato.

55 Otros tipos de composiciones de uso tópico son emulsiones o suspensiones en forma de pomadas, pastas, cremas. Se prefieren las emulsiones W/O, que se absorben más rápidamente. Son ejemplos de excipientes lipófilos: parafina líquida, lanolina anhidra, vaselina blanca, alcohol cetílico, alcohol estearílico, aceites vegetales, aceites minerales. Se pueden usar ventajosamente agentes que aumenten la permeabilidad cutánea para facilitar la absorción. Como ejemplo de dichos agentes cabe citar aditivos fisiológicamente aceptables como poli(alcohol vinílico), polietilenglicol o dimetilsulfóxido (DMSO).

60 Otros aditivos empleados en las composiciones tópicas son agentes isotónicos, como azúcares o polialcoholes, tampones, agentes quelantes, antioxidantes, antibacterianos, espesantes, dispersantes.

65 También se pueden emplear composiciones de liberación retardada para uso local o sistémico, que comprenden polímeros como polilactato, poli(met)acrilato, polivinilpirrolidona, metilcelulosa carboximetilcelulosa y otras sustancias conocidas en el estado técnico. También pueden ser útiles las composiciones en forma de implantes subcutáneos basados p.ej. en polilactato u otros polímeros biodegradables.

Aunque es preferible envasar la sustancia activa en forma liofilizada y por consiguiente estable, las composiciones

5 farmacéuticas pueden comprender ventajosamente sustancias que establezcan el PLGF-1 en sus formas dímera-multímera activas. Estos estabilizantes inhiben la formación de enlaces intermoleculares de disulfuro, evitando la polimerización de la sustancia activa. Sin embargo la cantidad de estabilizante debería medirse cuidadosamente para impedir la reducción simultánea de la sustancia activa a la forma monomérica inactiva. Como ejemplos de tales sustancias cabe mencionar: cisteína, cisteamina o glutatión en forma reducida.

Dosificación

10 La dosificación depende de la vía de administración y de la formulación elegida. Para administraciones parenterales las cantidades oscilan entre 1 mcg/kg/día y 500 mcg/kg/día, preferiblemente entre 10 mcg/kg/día y 200 mcg/kg/día. Estas administraciones se consiguen con composiciones farmacéuticas que contienen aproximadamente 50 mcg hasta 30 mg por dosis unitaria, preferiblemente 500 mcg hasta 10 mg por dosis. Para aplicación tópica terapéutica han resultado efectivas cantidades comprendidas entre 0,1 y 10 mg por gramo de composición. Las composiciones cosméticas de aplicación local para el tratamiento del envejecimiento de la piel o de la pérdida de cabello contienen preferiblemente 0,01 hasta 0,09 mg de sustancia activa por gramo de composición.

20 La duración del tratamiento varía en función de la patología o del efecto deseado. En el caso del tratamiento de la esclerodermia la aplicación varía desde 1 día hasta 12 meses, según la gravedad de la patología. En el caso de un tratamiento contra el envejecimiento natural o prematuro de la piel la aplicación varía desde 1 hasta 400 días, con preferencia dura al menos 30 días. La aplicación también varía desde 1 hasta 400 días en el caso de la prevención contra la pérdida del cabello o del estímulo del nuevo crecimiento de cabello.

Ejemplo 1

25 Solución para uso parenteral:

30 Se envasan por separado 58 miligramos de sustancia liofilizada, que comprenden 25 mg de PLGF-1 puro y 33 mg de tampón de fosfato (10 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ y 23 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/2\text{H}_2\text{O}$), y unos 125 ml de solución fisiológica para uso parenteral, en frascos previstos para mezclar el producto liofilizado con el diluyente inmediatamente antes de usarlo. Una vez disuelta, la concentración de sustancia activa es de 0,2 mg/ml aproximadamente.

Ejemplo 2

35 Emulsión W/O para aplicación tópica:

40 Una cantidad de sustancia liofilizada que comprende 20 mg de sustancia activa se disuelve en 5 ml de solución hidroalcohólica al 10% de etanol que lleva 10% de DMSO. La solución se emulsiona en aceite vegetal esterilizado para aplicación cutánea, usando un tensioactivo apto para emulsiones W/O que posee un coeficiente HLB < 10. La emulsión contiene aproximadamente 2 mg de sustancia activa por gramo de composición.

Ejemplo 3

Emulsión O/W:

45 Una cantidad de sustancia liofilizada que lleva aproximadamente 20 mg de sustancia activa se disuelve en 5 ml de solución hidroalcohólica que contiene 30% de DMSO y se emulsiona con un tensioactivo apropiado en un disolvente lipófilo basado en aceite vegetal. La emulsión O/W resultante tiene una concentración de sustancia activa de 3 mg/g de composición.

50 Ejemplo 4

Composición tópica en forma de gel:

55 Una cantidad de sustancia liofilizada que comprende 10 mg de sustancia activa se disuelve en 20 ml de solución hidroalcohólica al 10% de etanol que contiene 20% de DMSO. Después se adiciona a la solución una mezcla de polietilenglicol (400-4000) y polipropilenglicol. El contenido de sustancia activa es igual a 0,2 mg/g de composición. El gel es adecuado para uso cosmético.

Ejemplo 5

60 Durante 20 días se trataron diariamente 4 ratones SKH-1 sin pelo por vía parenteral subcutánea con 50 microlitros de la solución descrita en el ejemplo 1 (0,2 mg/ml) sobre una superficie de piel (1 cm^2) de la zona dorsal. Otros 4 ratones SKH-1 se trataron durante 30 días con la composición descrita en el ejemplo 2 (2 mg/g) por una vía tópica. Del mismo tipo de ratones, 4 se trataron solo con los excipientes para uso parenteral y otros 4 con los excipientes para uso tópico, siguiendo el mismo régimen de administración. Se examinaron muestras de piel de los animales mediante el análisis morfométrico computarizado descrito por Streit y otros (arriba citado). En concreto se tiñeron

inmuno-histoquímicamente cortes de piel (5 micras), empleando anticuerpos monoclonales anti-CD31 de ratón. Los cortes así tratados se analizaron por microscopía electrónica y el análisis morfométrico de los tejidos se realizó con el programa IP-LAB (Scanalytics Inc.). Los parámetros considerados fueron el área cubierta por vasos (% por mm²) y el tamaño medio de vaso (µm²). Los resultados figuran en la tabla 1.

5

Tabla 1

Parámetro	Placebo parenteral	Placebo tópico	PLGF-1 parenteral	PLGF-1 tópico
Área de vasos (mm ²) (%)	4,3 ± 0,2 %	4,1 ± 0,2 %	6,2 ± 0,3%	5,2 ± 0,6%
Tamaño de vaso (µm ²)	180 ± 9	176 ± 9	279 ± 14	235 ± 12,7

Los valores indicados en la tabla muestran aumentos estadísticamente significativos, tanto respecto al tratamiento parenteral como al tratamiento tópico, aunque el aumento es menos marcado para el tratamiento tópico.

10

Ejemplo 6

En este ejemplo se usó el modelo animal de esclerodermia inducida por bleomicina descrito por Yamamoto y otros (arriba citado).

15

Un primer grupo de ratones C3H se trató con bleomicina (100 mcg/ml) inyectada diariamente por vía subcutánea durante 3 semanas. Otros 3 grupos de ratones C3H se trataron como el primero, pero a su inyección diaria se le añadieron 0,1, 1 y 10 mcg/ml de PLGF-1, respectivamente. A las 3 semanas del tratamiento se sacrificaron los animales y se recogió la piel de las zonas tratadas para someterla a análisis histológicos. El efecto del tratamiento con PLGF-1 a 1 y 10 mcg/ml, aunque no a 0,1 mcg/ml, reflejó una disminución significativa de las manifestaciones histológicas atribuibles a la esclerotización cutánea inducida por bleomicina. En concreto el engrosamiento cutáneo y los niveles de hidroxiprolina son significativamente inferiores respecto a los ratones tratados solo con bleomicina.

20

Ejemplo 7

El dorso de la mano izquierda de personas adultas sanas de edad comprendida entre 50 y 60 años, muy expuestas a agresiones ambientales y a radiación solar, se trató con aplicaciones tópicas cutáneas de la composición en forma de gel descrita en el ejemplo 4. La cantidad aplicada fue de 1 g de gel, correspondiente a 0,2 mg de sustancia activa por día, durante 60 días en verano. El efecto del tratamiento se evaluó por análisis capilaroscópico y capilarométrico, registrando y reprocesando por ordenador los datos observados. El análisis de las superficies no tratadas reflejó el típico cuadro de fotoenvejecimiento cutáneo prematuro, caracterizado por la presencia de capilares patológicamente dilatados, forrados de elastina o rodeados por material amorfo denso.

30

A nivel macroscópico el tratamiento produjo una mejoría general del tono y aspecto de la piel.

35

En concreto los análisis capilaroscópicos destacaron que el aumento de la vascularización capilar era especialmente visible en las zonas perifoliculares del cabello. La comparación, efectuada por capilarometría, de la zona perifolicular de las superficies tratadas o no tratadas con la composición en cuestión reflejó un aumento de aproximadamente el 35,0% del número de vasos por mm². Sabiendo que un incremento de la vascularización del folículo del cabello estimula su crecimiento, los datos aportados en este caso demuestran que el tratamiento tópico con PLGF-1 no solo es efectivo contra el envejecimiento de la piel, sino que también promueve el crecimiento de los capilares y del cabello.

40

45

REIVINDICACIONES

1. Uso del factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) para preparar un medicamento promotor de angiogénesis en el tratamiento preventivo o curativo de enfermedades o alteraciones patológicas relacionadas con el tejido conjuntivo cutáneo o subcutáneo, seleccionadas entre:
- esclerodermia, o
 - envejecimiento cutáneo prematuro debido a la exposición a agentes atmosféricos agresivos o a irradiación solar prolongada, o
 - pérdida patológica del cabello debido a alopecia, trastornos hormonales, quimioterapia, radioterapia o a la administración de medicamentos.
2. Uso del factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) según la reivindicación 1, en que la enfermedad es esclerodermia localizada o esclerodermia sistémica progresiva.
3. Uso del factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) conforme a la reivindicación 2, en que la esclerodermia localizada es cutánea y la esclerodermia sistémica progresiva es miocárdica.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que el medicamento se halla en una forma adecuada para producir un efecto local o sistémico.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que el medicamento se halla en una forma adecuada para la administración endovenosa, intramuscular, intraarticular, subcutánea, tópica o por implante subcutáneo o ionoforesis.
6. Uso del factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) como promotor de la angiogénesis cutánea o subcutánea en la prevención y el tratamiento cosmético del envejecimiento natural de la piel.
7. Uso del factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) como promotor de la angiogénesis perifolicular en la prevención y el tratamiento cosmético de la pérdida natural del cabello.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en que el PLGF-1 está formulado en una composición cosmética para administración tópica.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en que la cantidad de PLGF-1 apropiada para administrar está comprendida entre 1 y 500 μg por kg corporal por día, preferiblemente entre 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$.
10. Factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) para emplear como promotor de angiogénesis en el tratamiento preventivo o curativo de enfermedades o alteraciones patológicas relacionadas con el tejido conjuntivo cutáneo o subcutáneo, seleccionadas entre:
- esclerodermia, o
 - envejecimiento cutáneo prematuro debido a la exposición a agentes atmosféricos agresivos o a irradiación solar prolongada, o
 - pérdida patológica del cabello debido a alopecia, trastornos hormonales, quimioterapia, radioterapia o a la administración de medicamentos.
11. Factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) para emplear según la reivindicación 10, en que la enfermedad es esclerodermia localizada o esclerodermia sistémica progresiva.
12. Factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) para emplear según la reivindicación 10, en que la esclerodermia localizada es cutánea y la esclerodermia sistémica progresiva es miocárdica.
13. Factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) para emplear según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en forma adecuada para producir un efecto local o sistémico.
14. Factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) para emplear según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en forma adecuada para administración endovenosa, intramuscular, intraarticular, subcutánea, tópica o por implante subcutáneo o ionoforesis.
15. Factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) para emplear según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, caracterizado porque el PLGF-1 es un producto de expresión procedente de células huésped modificadas genéticamente.
16. Factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) para emplear según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en que al menos el 98,5% del PLGF-1 está en forma dímera y multímera activa, al menos el 70% en forma dímera y no más del 1,5% en forma monomérica.

17. Composición farmacéutica que contiene el factor de crecimiento placentario tipo 1 (PLGF-1) como principio activo y un excipiente farmacéuticamente aceptable, destinada a la promoción de la angiogénesis en el tratamiento preventivo o curativo de enfermedades o alteraciones patológicas relacionadas con el tejido conjuntivo cutáneo o subcutáneo, seleccionadas entre:
- 5 – esclerodermia o
– envejecimiento prematuro de la piel por exposición a agentes atmosféricos agresivos o a la radiación solar prolongada.
18. Composición para emplear según la reivindicación 17, en que al menos el 98,5% del PLGF-1 está en forma dímera y multímera activa, al menos el 70% en forma dímera y no más del 1,5% en forma monomérica.
- 10
19. Composición para usar según la reivindicación 18, en que el PLGF-1 es un producto de expresión procedente de células huésped modificadas genéticamente.
- 15
20. Composición para emplear según la reivindicación 17, que por dosis unitaria de uso parenteral contiene 50 µg hasta 30 mg de PLGF-1 y para uso tópico 0,1 mg hasta 10 mg de PLGF-1 por gramo de composición.
21. Composición para emplear según la reivindicación 17, en forma de solución, loción, emulsión W/O, emulsión O/W, suspensión, suspensión liposómica, gel, crema, pasta, ungüento o implante subcutáneo.
- 20
22. Composición cosmética de uso tópico que contiene PLGF-1 como principio activo y un excipiente aceptable cosméticamente, caracterizada porque al menos el 98,5% del PLGF-1 está en forma dímera y multímera activa, al menos el 70% en forma dímera y no más del 1,5% en forma monomérica, y porque se encuentra en forma de loción, emulsión W/O, emulsión O/W, suspensión, suspensión liposómica, gel, crema, pasta, ungüento.
- 25
23. Composición de uso tópico según la reivindicación 22, caracterizada porque el PLGF-1 es un producto de expresión procedente de células huésped modificadas genéticamente.
- 30
24. Composición de uso tópico según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, que comprende una o más sustancias elegidas entre cisteína, cisteamina o glutatión en forma reducida, capaces de estabilizar el PLGF-1 en sus formas dímera-multímera activas.