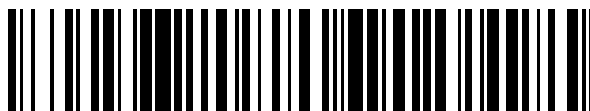


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 508 591**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7076 (2006.01)

A61P 17/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2011** **E 11736467 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014** **EP 2585077**

54 Título: **Agente para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz**

30 Prioridad:

25.06.2010 JP 2010145319

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

16.10.2014

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
9, Kanda-Tsukasa-machi 2-chome Chiyoda-ku
Tokyo 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

**KAWAMURA, MITSUAKI;
SHINOHARA, SHIGEO;
HARANO, FUMIKI;
AOKI, AKIHIRO y
UENO, ERI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 508 591 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

Agente para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz.

10 **Antecedentes de la técnica**

En años recientes el efecto sobre la piel de la exposición a la luz, tal como la irradiación solar, se está convirtiendo en un grave problema mundial. En particular, en los Estados Unidos, Europa y Australia, el incremento de la incidencia del cáncer de piel se ha convertido en un problema serio. Uno de los factores del incremento del cáncer de piel es un incremento continuo del grado de exposición a la luz ultravioleta en la vida diaria debido a la destrucción de la capa de ozona por los clorofluorocarbonos. En el mundo actual resulta imposible evitar el riesgo de formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, concretamente el riesgo de fotocarcinogénesis (es decir, cáncer de piel inducido por la exposición a la luz, tal como la luz ultravioleta).

Convencionalmente se combinan el tratamiento quirúrgico, la quimioterapia y la terapia de radiación en el tratamiento del cáncer de piel. Sin embargo, dependiendo del momento de la detección y el grado de los síntomas del cáncer de piel, es habitual que el cáncer de piel no sea tratado eficazmente y que el tratamiento pueda crear una carga considerable sobre la vida diaria. Estos problemas degradan significativamente la calidad de vida (CdV) de los individuos. Por lo tanto, existe una fuerte demanda de establecimiento de un método para la prevención de la incidencia del cáncer de piel.

Convencionalmente la prevención del cáncer de piel causado por la luz ultravioleta se lleva a cabo mediante un método conocido en el que la piel se protege de la luz ultravioleta utilizando un fármaco aplicado externamente que contiene un agente absorbente de la luz ultravioleta, tal como el metoxicinamato de octilo, el butil-metoxidibenzoiometano y la benzofenona, y un agente dispersante de la luz ultravioleta, tal como el óxido de titanio y el óxido de cinc.

Sin embargo, aunque los agentes absorbentes de la luz ultravioleta y los agentes dispersantes de la luz ultravioleta evitan la exposición a la luz ultravioleta, se ha informado de que estos agentes presentan efectos adversos, tales como la irritación de la piel. En otras palabras, aunque estos agentes inhiben la formación de células de la piel anormales causadas por la exposición a la luz, estos agentes presentan el potencial de causar trastornos debido al estímulo de contacto y similares.

Además, dichos fármacos que contienen los ingredientes anteriormente indicados deben aplicarse en la piel antes de la exposición a la luz ultravioleta, debido a que el objetivo es evitar la exposición de la piel a la luz ultravioleta. De acuerdo con lo anterior, en el caso de los agentes absorbentes de la luz ultravioleta y los agentes dispersantes de la luz ultravioleta, no puede evitar la exposición de la piel a la luz ultravioleta en el caso de que el usuario olvide aplicarse dichos agentes en la piel o en el caso de que estos agentes sean eliminados de la piel por la sudoración o similares, conduciendo a la inducción de daño al ADN. Como resultado, no puede evitarse el riesgo de formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en el caso de que resulte posible inhibir la formación de células anormales en el tejido de la piel con un ingrediente que no afecte adversamente a la piel, incluso cuando la piel es expuesta directamente a luz solar, tal como luz ultravioleta, resultará una medida preventiva eficaz frente a la formación de células de la piel anormales, lo que no puede conseguirse con los agentes absorbentes de la luz ultravioleta o los agentes dispersantes de la luz ultravioleta. Bajo estas circunstancias existe una fuerte demanda de desarrollo de un agente preventivo capaz de suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz del tejido de la piel, que no cause irritaciones en la piel y similares.

Además, los ácidos nucleicos de purina, tales como los adenosín-fosfatos, presentan los efectos siguientes: retención de la humedad y prevención o mejora de las arrugas (ver la literatura de patentes nº 1), la prevención o mejora de la pigmentación (ver la literatura de patentes nº 2), la estimulación de la producción de colágeno (ver la literatura de patentes nº 3), y similares, y han atraído la atención como ingredientes con efectos cosmética y farmacéuticamente beneficiosos sobre la piel.

Además, existen documentos conocidos, respecto al efecto anticáncer de los ácidos nucleicos de purina, en los que se investiga la supresión del crecimiento de las células de cáncer inducido por sustancias químicas (ver la literatura no de patentes nº 1 y nº 2). Sin embargo, estas investigaciones no han confirmado realmente el efecto de los ácidos nucleicos de purina sobre las células de cáncer causado por la luz solar, tal como la luz ultravioleta. El efecto se ha investigado meramente mediante la administración en la cavidad abdominal, lo que no resulta fácilmente disponible para el usuario.

Tal como se ha indicado anteriormente, no se ha realizado ninguna investigación sobre la relación entre la fotocarcinogénesis y la aplicación externa (dérmica) de los ácidos nucleicos de purina y es completamente desconocido cómo los ácidos nucleicos de purina afectan a la supresión de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, o la prevención o el tratamiento de la fotocarcinogénesis al aplicarlos externamente.

Lista de referencias

Literatura de patentes

LTP 1: publicación de patente japonesa no examinada nº de publicación 2006-225271
LTP 2: publicación de patente japonesa no examinada nº de publicación 2006-206575
LTP 3: WO2005/34902

Literatura no de patentes

LNP 1: Cancer Letters 6:291-300, 1979.
LNP 2: Euro. J. Cancer Clin. Oncol. 24:1491-1497, 1988.

El documento JP 2007-238588 A se refiere a una crema mixta obtenida mediante la mezcla de polvo de granada con colágeno en polvo y levadura de panadería o AMP y pigmento melanina, que se afirma que presenta un efecto de prevención o mejora de la reducción de la belleza de la piel y la capacidad de retención de la humedad, las venas varicosas de las extremidades inferiores y el cáncer de piel causado por cambios relacionados con la edad.

El documento JP 2007-161693 A se refiere a una crema mixta que comprende polvo de granada, colágeno en polvo, levadura de panadería o AMP y pigmento melanina, que se afirma que resulta eficaz para trastornos climactericos, deficiencia en la secreción hormonal tras la menopausia, enfermedad de Parkinson, etc.

El documento nº JP 2006-096730 A se refiere a un agente mejorador de las arrugas que se caracteriza por que comprende (A) por lo menos una fracción de proteínas soluble extraída de las semillas de *Hibiscus esculentus* y (B) un ingrediente activador celular.

El documento JP 2009-227632 A se refiere a una preparación externa para la piel que contiene un glucógeno sintetizado enzimáticamente como componente activo y que contiene además una o más sustancias seleccionadas de entre vitaminas, azúcares, derivados de azúcares, aminoácidos, alcoholes polihídricos, colágenos, ácidos orgánicos, extractos vegetales, extractos de hierbas, extractos naturales, urea y otros componentes utilizables en absorbentes de luz ultravioleta, agentes antiinflamatorios, agentes activadores celulares, agentes antioxidantes, agentes hidratantes, agentes blanqueadores de la piel, etc.

Sumario de la invención

Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente de supresión de la formación de células de la piel anormales (concretamente el desarrollo del cáncer de piel) inducida por la exposición a la luz, tal como la luz ultravioleta.

Solución al problema

Se han realizado estudios exhaustivos en el contexto de la presente memoria en un intento de conseguir el objetivo anteriormente indicado y se ha descubierto que los ácidos nucleicos de purina, tales como los adenosín-fosfatos, pueden reducir la mutación del ADN en las células de la piel causada por la exposición a la luz, y ejercen un efecto de supresión de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, concretamente un efecto de prevención de la fotocarcinogénesis, mediante la inducción de apoptosis en las células mutadas, y que los ácidos nucleicos de purina pueden inhibir o prevenir eficazmente la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, concretamente el desarrollo de cáncer de piel, al aplicarlos en la piel no sólo antes sino también después de la exposición a la luz. La presente invención se ha completado mediante estudios adicionales basados en los resultados anteriormente indicados.

Concretamente, la presente invención proporciona las invenciones descritas a continuación.

Ítem 1. Un ácido nucleico de purina para la utilización en la supresión de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, en la que el ácido nucleico de purina se aplica externamente, y en el que el ácido nucleico de purina es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste de adenosín monofosfatos y sales de los mismos.

Ítem 2. El ácido nucleico de purina según el Ítem 1, en el que la supresión de la formación de células de la piel anormales se acompaña de reparación del ADN o supresión de la mutación del ADN.

5 Ítem 3. El ácido nucleico de purina según el Ítem 1 o 2, en el que la supresión de la formación de células de la piel anormales se acompaña de la inducción de apoptosis.

Ítem 4. El ácido nucleico de purina según cualquiera de los Ítems 1 a 3, en el que la supresión de la formación de células de la piel anormales es la prevención de tumores de la piel.

10 Ítem 5. El ácido nucleico de purina según el Ítem 4, en el que la prevención de tumores de la piel se acompaña de la supresión del inicio de los tumores de la piel.

15 Ítem 6. El ácido nucleico de purina según el Ítem 4 o 5, en el que la prevención de los tumores de la piel está destinada a la prevención del cáncer de piel.

Ítem 7. Una composición para la utilización en la supresión de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, que comprende por lo menos un elemento de entre el grupo que consiste de adenosín monofosfatos y sales de los mismos a modo de ingrediente activo.

20 Ítem 8. La composición según el Ítem 7, que comprende por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste de adenosín monofosfatos y sales de los mismos en una cantidad de entre 0,5% y 20% en peso basada en el peso total de la composición.

25 Ítem 9. La composición según el Ítem 7 u 8 para la utilización en la reparación del daño al ADN inducido por la exposición a la luz.

Ítem 10. La composición según el Ítem 7 u 8 para la utilización en la supresión de la formación de células de la piel anormales.

30

Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, resulta posible reducir la cantidad de mutantes del ADN en las células de la piel generada por la exposición a la luz, e inhibir o prevenir eficazmente la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, concretamente la fotocarcinogénesis. Por lo tanto, la presente invención proporciona una medida preventiva eficaz para reducir el riesgo de formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, concretamente el riesgo de desarrollar cáncer de piel. Además, debido a que el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales presenta una acción de reparación del ADN y una acción de supresión de mutaciones, puede esperarse la supresión o la prevención de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, tal como la fotocarcinogénesis, al aplicar el agente en la piel antes o después de la exposición a la luz. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la utilización regular del agente permite suprimir o prevenir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz sin requerir esencialmente la utilización del agente antes de salir al exterior, y sin causar irritaciones en la piel.

45

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1a] La figura 1a muestra los resultados de la evaluación del efecto del adenosín monofosfato sobre la actividad de la caspasa en queratinocitos epidérmicos humanos normales en el Ejemplo 1.

50

[Figura 1b] La figura 1b muestra los resultados de la evaluación del efecto del adenosín monofosfato sobre la actividad de la caspasa en queratinocitos epidérmicos humanos irradiados con luz ultravioleta en el Ejemplo 1.

[Figura 2] La figura 2 muestra los resultados de la evaluación del efecto de la adenosín monofosfato sobre la mutación del ADN (CPD) en queratinocitos epidérmicos de ratón irradiados con luz ultravioleta en el Ejemplo 2.

55

[Figura 3] La figura 3 muestra los resultados de imágenes que muestran el lomo de los ratones en cada grupo del Ejemplo 3, en el que los ratones irradiados con luz ultravioleta en el lomo fueron alimentados en grupos separados: un grupo de aplicación de solución de ensayo, en el que se había aplicado una solución acuosa de etanol que contenía adenosín monofosfato; un grupo de aplicación de una base, en el que se había aplicado una solución acuosa de etanol, y un grupo sin aplicación, en el que no se había realizado ninguna aplicación.

60

[Figura 4] La figura 4 muestra los resultados obtenidos mediante la medición de la proporción de la población de ratones en la que se había observado un tumor (incidencia de tumor: %) en cada grupo del Ejemplo 3, en el que los ratones irradiados con luz ultravioleta en el lomo fueron alimentados en grupos separados: un grupo de aplicación de solución de ensayo, en el que se había aplicado una solución acuosa de etanol que contenía

65

adenosín monofsfato; un grupo de aplicación de una base, en el que se había aplicado una solución acuosa de etanol; y un grupo sin aplicación, en el que no se había realizado ninguna aplicación.

Descripción de las formas de realización

En la presente invención se utilizan ácidos nucleicos de purina para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz.

En otras palabras, se utiliza un ácido nucleico de purina como agente para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz en la presente invención. El agente en ocasiones se denomina en la presente memoria "el agente de la presente invención".

Además, la composición de la presente invención utilizada para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz contiene un ácido nucleico de purina como principio activo.

En la memoria, entre los ejemplos de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz se incluyen los tumores en la piel.

En la memoria, los términos "supresión" y "prevención", tal como en la supresión y prevención de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz puede interpretarse que presentan un significado similar.

Entre los ejemplos de "supresión de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz" se incluyen la "prevención del cáncer de piel".

En la memoria, la expresión "se acompaña de" se refiere a la incidencia de un suceso asociada a la incidencia de otro suceso. No importa qué suceso es la causa o la consecuencia, y no es necesario que estos sucesos se produzcan simultáneamente.

En la presente invención, el ácido nucleico de purina es por lo menos un elemento seleccionado de entre adenosín monofosfatos tales como adenosín-2'-monofosfato, adenosín-3'-monofosfato y adenosín-5'-monofosfato y sales de los mismos, preferentemente adenosín-5'-monofosfato (AMP).

Además, la forma sal no se encuentra particularmente limitada en la medida de que sea farmacéutica o cosméticamente aceptable. Entre los ejemplos concretos de la misma se incluyen sales de metal alcalino, tales como sales sódicas y sales potásicas; sales de metal alcalino-térreo, tales como sales de magnesio, sales de calcio y sales de bario; sales de aminoácido básico, tales como arginina y lisina; amonio y sales amónicas, tales como sal de triciclohexilamonio; y diversas sales de alcanolamina, tales como monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, monoisopropanolamina, diisopropanolamina y triisopropanolamina. De entre ellos, resultan preferibles las sales de metal alcalino y resultan adicionalmente preferibles las sales sódicas.

Dichos ácidos nucleicos de purina pueden utilizarse solos, o en cualquier combinación de dos o más como principios activos del agente de supresión de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz.

El contenido de ácido nucleico de purina en la composición de la presente invención, que comprende un ácido nucleico de purina como principio activo y se utiliza para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, puede determinarse convenientemente según el tipo de ácidos nucleicos de purina, forma de la formulación, efecto deseado y similares. Concretamente, el contenido de ácido nucleico de purina en la composición es de entre 0,5% y 20% en peso, preferentemente de entre 0,5% y 10% en peso, más preferentemente de entre 1% y 10% en peso, todavía más preferentemente de entre 1% y 7% en peso, y particularmente preferentemente de entre 2% y 5% en peso, basado en el peso total de la composición. La formación de células de la piel anormales puede inhibirse o prevenirse más eficazmente en el caso de que satisfaga el intervalo de contenidos anterior.

El agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz puede prepararse en diversas formas mediante la combinación de una base o vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable, además del ácido nucleico de purina. Cualquier base o vehículo conocido utilizado convencionalmente en preparaciones externas para la piel puede utilizarse como la base y vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.

Además, en caso necesario, pueden añadirse diversos aditivos utilizables para preparaciones externas para la piel al agente de la presente invención para la supresión de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz. Entre los ejemplos de dichos aditivos se incluyen surfactantes, materiales colorantes (tintes y pigmentos), materiales saborizantes, antisépticos, bactericidas (antibacterianos), espesantes, antioxidantes, agentes secuestrantes, agentes de enfriamiento, desodorizantes, humectantes, agentes absorbentes de la luz ultravioleta, agentes dispersantes de la luz ultravioleta, vitaminas, extractos vegetales, astringentes, agentes antiinflamatorios

(agentes antiflogísticos), blanqueadores, activadores celulares, vasodilatadores, aceleradores de la circulación sanguínea, aceleradores de la función de la piel, y similares.

El agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz ejerce una acción preventiva frente a la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz al aplicarlo externamente en un área de la piel que ha sido expuesta o puede resultar expuesta a luz, tal como luz ultravioleta. De acuerdo con lo anterior, el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz se prepara en forma de una preparación externa para la piel, que puede utilizarse diariamente, tal como un fármaco de aplicación externa, un cuasifármaco de aplicación externa, o un producto cosmético (por ejemplo un producto para el cuidado de la piel).

La forma de dosificación del agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz no se encuentra particularmente limitada en la medida en que sea aplicable en la piel. Entre los ejemplos de la misma se incluyen pastas, espumas, geles blandos, líquidos, emulsiones, suspensiones, cremas, pomadas, geles, láminas, aerosoles, esprays, linimentos y similares. De entre estas formas de dosificación resultan preferibles los líquidos, emulsiones y geles. Estas formas de dosificación se preparan según un método habitual en el campo comercial relevante.

El agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz se utiliza concretamente con el objetivo de prevenir los tumores de la piel o el cáncer de piel inducidos por la exposición a la luz. En la presente invención, el tipo de luz que induce la formación de células de la piel anormales que debe inhibirse o prevenirse por la presente invención no se encuentra particularmente limitado. Entre los ejemplos del mismo se incluyen la luz solar natural, la luz y la radiación ultravioleta, resultando preferible la luz ultravioleta, y resultando más preferible la luz UV-B. Concretamente, el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz se utiliza particularmente convenientemente para la prevención de la fotocarcinogénesis inducida por la exposición a la luz ultravioleta (particularmente UV-B) contenida en la luz solar.

Además, en el caso de que el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz se utilice para la prevención de la fotocarcinogénesis, el tipo de cáncer de piel que debe prevenirse mediante la presente invención no se encuentra particularmente limitado en la medida en que resulta inducido en asociación con la exposición a la luz. Entre los ejemplos concretos del mismo se incluyen el melanoma maligno, el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas.

El agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz se aplica en una zona de la piel que ha sido expuesta o puede resultar expuesta a la luz. En otras palabras, el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz puede aplicarse en una zona de la piel que ha sido expuesta a la luz, o aplicarse en una zona de la piel que puede resultar expuesta a la luz antes de que se exponga en efecto a la luz.

Al aplicar en la piel el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, puede determinarse la dosis y frecuencia del mismo de manera que se aplique una cantidad adecuada en la piel una vez al día o con una frecuencia de 2 a 5 veces al día, según el tipo y concentración de ácido nucleico de purina, edad y sexo del sujeto, área de piel aplicada, cantidad de luz a la que se ha expuesto o podría exponerse la piel, y similares. Además, la dosis del agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz puede fijarse de manera que la cantidad de ácido nucleico de purina por cm^2 de área de piel sea de aproximadamente 0,01 a 10 mg, preferentemente de 0,1 a 5 mg.

Tal como se ha puesto de manifiesto a partir de lo anterior, el ácido nucleico de purina puede evitar la fotocarcinogénesis. De acuerdo con lo anterior, el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz puede servir como agente para prevenir la fotocarcinogénesis. En el caso de que se utilice el ácido nucleico de purina como agente para prevenir la fotocarcinogénesis, el tipo y la concentración del ácido nucleico de purina, otros ingredientes, la forma de dosificación, el sitio de aplicación, el método de aplicación y similares son los mismos que los indicados para el agente para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz.

El ácido nucleico de purina puede inducir la apoptosis de las células de la piel que se han convertido en anormales debido a la exposición a la luz. De acuerdo con lo anterior, el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz puede servir como agente para inducir la apoptosis de células de la piel que se han convertido en anormales debido a la exposición a la luz. En el caso de que el ácido nucleico de purina se utiliza como el agente de inducción de apoptosis de células de la piel que se han convertido en anormales debido a la exposición a la luz, el tipo y la concentración del ácido nucleico de purina, otros ingredientes, la forma de dosificación, el sitio de aplicación, el método de aplicación y similares son los mismos que los indicados para el agente para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz.

El ácido nucleico de purina puede inhibir el inicio del cáncer de piel. De acuerdo con lo anterior, el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz puede servir como agente para suprimir el inicio del cáncer de piel. En el caso de que el ácido nucleico de purina se utilice como el agente para suprimir el inicio del cáncer de piel, el tipo y concentración del ácido nucleico de purina, otros ingredientes, la forma de dosificación, el sitio de aplicación, el método de aplicación y similares son los mismos que los indicados para el agente para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz.

El ácido nucleico de purina puede inhibir la inducción de cáncer de piel. De acuerdo con lo anterior, el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz puede servir como agente para suprimir la estimulación de cáncer de piel. En el caso de que el ácido nucleico de purina se utilice como el agente para suprimir la estimulación de cáncer de piel, el tipo y la concentración del ácido nucleico de purina, otros ingredientes, la forma de dosificación, el sitio de aplicación, el método de aplicación y similares son los mismos que los indicados para el agente para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz.

Además, el ácido nucleico de purina puede reducir la cantidad de ADN mutado en las células de la piel causada por la exposición a la luz y estimular la reparación del ADN. De acuerdo con lo anterior, el agente de la presente invención para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz puede actuar de una manera tal como las indicadas anteriormente, y puede servir como agente para reparar el daño al ADN, suprimir las mutaciones del ADN o reducir las mutaciones del ADN. En el caso de que el ácido nucleico de purina se utiliza como agente para reparar el daño al ADN, suprimir las mutaciones del ADN o reducir las mutaciones del ADN, el tipo y la concentración del ácido nucleico de purina, otros ingredientes, la forma de dosificación, el sitio de aplicación, el método de aplicación y similares son los mismos que los indicados para el agente para suprimir la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz.

Ejemplos

La presente invención se describe a continuación haciendo referencia a los ejemplos de ensayos y ejemplos. Observar que, en los ejemplos siguientes y similares, los números expresados en "%" que indican el contenido son en porcentaje en peso, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1: acción de inducción de apoptosis en células mutantes causada por irradiación con luz ultravioleta

El presente ejemplo examinó el cambio de la actividad de la caspasa al irradiar con luz ultravioleta células epidérmicas humanas tratadas con adenosín-5'-monofosfato disódico (AMP2Na).

<Método de ensayo>

Se precultivaron queratinocitos epidérmicos humanos (obtenidos de Kurabo Industries Ltd.) utilizando medio de cultivo EpiLife-KG2 (producido por Kurabo Industries Ltd.) en placas de Petri recubiertas de colágeno de 10 cm (producidas por Asahi Glass Co., Ltd.) y se sembraron a una densidad de 30.000 células/pocillo en una microplaca de 96 pocillos recubierta con colágeno. Tras el cultivo en el medio de cultivo EpiLife-KG2 durante 8 horas, se sustituyó el medio de cultivo por medio de cultivo EpiLife (producido por Kurabo Industries Ltd.), seguido del cultivo durante 16 horas adicionales. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo por medio de cultivo que contenía AMP2Na ajustado a diversas concentraciones. Tras el tratamiento con el medio durante 2 horas, las células se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y las células lavadas se irradiaron con 30 mJ/cm² de UV-B utilizando un dispositivo de irradiación ultravioleta (HN-400, producido por ABE RIKOSHA). Se añadió nuevamente medio de cultivo EpiLife, seguido del cultivo durante 6 horas. A continuación, se midió la actividad de la caspasa-3 expresada en las células utilizando un kit de ensayo de caspasa-3 SensoLyte™ Rh110 (producido por AnaSpec, Inc.). Las células que no habían sido irradiadas con UV-B ni tratadas con AMP2Na fueron utilizadas como grupo de control. Además, con el fin de examinar el efecto del AMP2Na sobre la actividad de caspasa de las células normales, se determinó la actividad de la caspasa de las células que no habían sido irradiadas con UV-B pero tratadas con AMP2Na.

<Resultados>

Las figuras 1a y 1b muestran los resultados obtenidos. Resulta evidente a partir de los resultados que, aunque las células no irradiadas con luz ultravioleta no mostraron prácticamente ningún incremento de la actividad de caspasa a pesar del tratamiento con AMP2Na, las células irradiadas con luz ultravioleta mostraron un incremento significativo de la actividad de la caspasa con el pretratamiento de AMP2Na.

La caspasa es un miembro de la familia de las cisteína proteasas que causa apoptosis de las células. La actividad de la caspasa se considera generalmente como un índice para medir el nivel de la actividad apoptótica.

Las células disponen de un mecanismo para inducir la apoptosis por sí mismas de manera que se autoeliminan, como mecanismo biológico de defensa frente a diversos estímulos que dañan el ADN, tales como los rayos X y la luz ultravioleta. El presente ensayo demuestra además que no se produce ningún cambio de la actividad de la caspasa en las células no irradiadas con luz ultravioleta con independencia de si las células habían sido tratadas o no con AMP2Na. Lo anterior indica que AMP2Na no incrementa la actividad de caspasa y no induce apoptosis en las células normales. En contraste, resulta evidente a partir del incremento de la actividad de caspasa que la apoptosis resultó inducida en las células irradiadas con luz ultravioleta. Además, el presente ensayo muestra un incremento adicional de la actividad en las células tratadas con AMP2Na antes de la irradiación ultravioleta, indicando que la apoptosis había sido inducida en las células mutantes.

Ejemplo 2: evaluación de la acción de reducción de las mutaciones del ADN inducida por la irradiación ultravioleta

En el presente Ejemplo se irradiaron con luz ultravioleta células epidérmicas de ratón normales y a continuación se cultivaron en un medio de cultivo que contenía AMP2Na. Mediante la utilización de la cantidad de dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPD) como índice se examinó la acción del AMP2Na sobre la reducción de las mutaciones del ADN.

<Método de ensayo>

Se cultivaron células JB6 derivadas de células epidérmicas de ratón normales (obtenidas de la ATCC) en un medio de cultivo MEM que contenía FBS hasta que alcanzaron la subconfluencia. A continuación, se sembraron 4×10^5 células en cultivo en una placa de 3,5 cm con MEM (medio esencial mínimo) que contenía FBS (suero de feto bovino). El día después de la siembra se sustituyó el medio de cultivo por un medio de cultivo MEM sin suero para privarlas de suero. A continuación se sustituyó el medio de cultivo por PBS, seguido de la irradiación con 15 mJ/cm² de UV-B. Tras la irradiación con luz ultravioleta, se sustituyó el medio de cultivo por medio de cultivo MEM sin suero que contenía 0,01 mM, 0,1 mM ó 1 mM de AMP2Na o medio de cultivo sin AMP2Na (control). Tras la sustitución del medio de cultivo, se cultivaron las células con 5% de CO₂ a 37°C durante 48 horas, y después se recogieron.

Se extrajo el ADN genómico de las células recogidas, utilizando un kit de ADN FastPure (marca comercial) (Takara Bio Inc.). La extracción se llevó a cabo según el manual del kit.

La cantidad de CPD en el ADN genómico extraído de cada célula se midió utilizando un ELISA. En particular, el ADN genómico extraído se calentó a 100°C durante 10 minutos y se enfrió sobre hielo. A continuación, se dispensó ADN genómico (50 µl/pocillo) en una microplaca de 96 pocillos recubierta con sulfato de protamina, y se secó. Al día siguiente, se lavó cada uno de los pocillos con PBS-T (PBS con Tween-20) y se dispensó PBS que contenía FBS en cada uno de los pocillos. A continuación se mantuvieron los pocillos a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente, tras lavar con PBS-T, se dispensó anticuerpo de ratón anti-CDP (obtenido de Cosmo Bio Co., Ltd.) en cada uno de los pocillos y a continuación se mantuvieron los pocillos a 37°C durante 30 minutos. Tras lavar con PBS-T, se distribuyó anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con biotina (obtenido de Southern Biotech) en cada uno de los pocillos y éstos se mantuvieron a continuación a 37°C durante 30 minutos. Tras lavar los pocillos, se dispensó peroxidasa de rábano picante marcada con estreptavidina en cada uno de los pocillos y estos se mantuvieron a continuación a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS-T y solución de tampón de citrato-fosfato y después se dispensó en cada uno de los pocillos solución de tampón de citrato-fosfato que contenía peróxido de hidrógeno y o-fenilendiamina. Se mantuvieron los pocillos a 37°C durante 30 minutos para el desarrollo de color. A continuación se añadió solución acuosa 2 M de ácido sulfúrico a los pocillos para terminar la reacción de desarrollo de color. A continuación se midieron los valores de absorbancia a 492 nm y se calculó la cantidad de CPD en el ADN genómico con el fin de determinar la tasa de cambio de CPD (variación de la cantidad relativa de CPD: %) bajo cada condición asignando a la cantidad de CDP en el caso del cultivo en medio de cultivo sin AMP2Na un valor de 100%.

<Resultados>

La figura 2 muestra los resultados obtenidos. Los resultados muestran que la cantidad relativa de CPD en las células a las que se había añadido AMP2Na tras la irradiación con luz ultravioleta se redujo en comparación con el grupo de control. Por lo tanto, los resultados confirmaron que el AMP2Na reduce las mutaciones del ADN causadas por la irradiación con luz ultravioleta. Los resultados demuestran que, al cultivar las células en 0,1 mM y 1 mM de medio de cultivo que contenía AMP2Na, la reducción de la cantidad relativa de CPD en comparación con el grupo de control era significativa, y que el daño al ADN causado por la irradiación con luz ultravioleta se había suprimido significativamente. Basándose en lo anterior, se espera que el ingrediente anteriormente indicado presente el efecto de prevenir, en particular, el inicio de la carcinogénesis.

Debe apreciarse que el ejemplo 1 es un ensayo *in vitro* llevado a cabo con células. En una aplicación práctica, considerando las diferencias individuales, la permeabilidad en la piel y la penetrabilidad en las células, debe

considerarse el ajuste de la concentración de AMP2Na a aproximadamente 10 a 1.000 veces más que la concentración de AMP2Na utilizada *in vitro*, tal como se ha indicado anteriormente.

Ejemplo 3: evaluación del efecto preventivo del cáncer de piel en ratones irradiados con luz ultravioleta

En el presente ejemplo se irradiaron ratones desnudos con luz ultravioleta y se examinó el efecto preventivo del AMP2Na de la fotocarcinogénesis en los ratones.

<Método de ensayo>

Se obtuvieron ratones Hos:HR-1 hembra de 5 semanas de edad de Japan SLC, Inc. y desde la edad de 7 semanas, se llevó a cabo la irradiación con luz ultravioleta (UV-B) del lomo de los animales. La irradiación con luz ultravioleta (cantidad de irradiación por unidad de tiempo: 60 mJ/cm²) se llevó a cabo una vez al día, 5 días a la semana durante 12 semanas.

A continuación, se preparó una solución acuosa de etanol al 20% que contenía 3% de AMP2Na disuelto en la misma (solución de ensayo) y una solución acuosa de etano al 20% que no contenía AMP2Na (base).

Tras alimentar los ratones irradiados con luz ultravioleta, bajo condiciones normales durante 1 semana, se dividieron en 3 grupos (6 ratones en cada grupo) bajo las condiciones mostradas en la Tabla 1, y se alimentaron durante 12 semanas.

Tabla 1

	Condiciones de ensayo
Grupo de aplicación de solución de ensayo	Solución de ensayo (0,1 ml) aplicada en todo el lomo de los ratones dos veces al día, 5 días a la semana durante 12 semanas de alimentación
Grupo de aplicación de base	Base (0,1 ml) aplicada en todo el lomo de los ratones dos veces al día, 5 días a la semana durante 12 semanas de alimentación
Grupo sin aplicación	Ratones alimentados durante 12 semanas sin aplicación de la solución de ensayo o base.

<Resultados>

Se observó el estado de la piel del lomo de los ratones en cada grupo en la 6a semana desde el inicio de la aplicación de la solución de ensayo y la base. Se determinó el desarrollo de los tumores y se contó el número de tumores. La figura 3 muestra los resultados de imágenes del lomo de los ratones en cada grupo, obtenidos en la 6a semana desde el inicio de la aplicación de la solución de ensayo o la base. La figura 4 muestra la proporción de la población de los ratones en que se observó un tumor (incidencia de tumor: %) en cada grupo en la 6a semana desde el inicio de la aplicación de la solución de ensayo o la base.

Tal como se pone de manifiesto a partir de la figura 3, se observó la formación de tumor en el lomo de los ratones tras la irradiación con luz ultravioleta en el grupo de aplicación de base y en el grupo sin aplicación, pero no en el grupo de aplicación de solución de ensayo. Además, tal como se muestra en la figura 4, la incidencia de tumor tras la irradiación de luz ultravioleta fue de 67% en el grupo de aplicación de base y de 83% en el grupo sin aplicación, mientras que fue de 0% en el grupo de aplicación de solución de ensayo. Se puso de manifiesto que el AMP2Na era capaz de prevenir eficazmente la incidencia de cáncer de piel inducido por la luz ultravioleta.

Debe apreciarse que el número medio de tumores desarrollado en cada ratón en cada grupo en la 6a semana desde el inicio de la aplicación de la solución de ensayo o de base era el siguiente: 0 en el grupo de aplicación de solución de ensayo; 2 en el grupo de aplicación de base y 1,8 en el grupo sin aplicación. Estos resultados también confirman que el AMP2Na presenta un excelente efecto preventivo del cáncer de piel inducido por luz ultravioleta.

Además, la incidencia de tumor en la 12a semana desde el inicio de la aplicación de la solución de ensayo o la base fue de 83% en el grupo de aplicación de base, de 100% en el grupo sin aplicación y de 17% en el grupo de aplicación de solución de ensayo. Lo anterior demuestra que el AMP2Na presenta una acción de fuerte supresión del desarrollo de tumores causado por la irradiación con luz ultravioleta. De acuerdo con lo anterior, también se espera que el ingrediente resulte eficaz en la supresión de la inducción de carcinogénesis.

Ejemplo de prescripción

Se preparó un agente preventivo de la fotocarcinogénesis en forma de emulsión que presentaba la composición siguiente:

Adenosín monofosfato disódico	3 (% en peso)
Etanol	3

ES 2 508 591 T3

Glicerina	110
Emulsionante, adyuvante de emulsificación	10
Espesante	c.s.
Antiséptico, ajustador del pH, materiales saborizantes	c.s.
Agua purificada	equilibrio
Total	100% en peso

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ácido nucleico de purina para la utilización en la supresión de la formación de células de la piel anormales causadas por la exposición a la luz, en el que el ácido nucleico de purina se aplica externamente y en el que el ácido nucleico de purina es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en adenosín monofosfatos y sales de los mismos.
- 10 2. Ácido nucleico de purina para la utilización según la reivindicación 1, en el que la supresión de la formación de células de la piel anormales se acompaña de la reparación del ADN o la supresión de las mutaciones del ADN.
3. Ácido nucleico de purina para la utilización según la reivindicación 1 o 2, en el que la supresión de la formación de células de la piel anormales se acompaña de la inducción de la apoptosis.
- 15 4. Ácido nucleico de purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la supresión de la formación de células de la piel anormales es la prevención de los tumores de la piel.
5. Ácido nucleico de purina para la utilización según la reivindicación 4, en el que la prevención de los tumores de la piel se acompaña de la supresión del inicio de tumores.
- 20 6. Ácido nucleico de purina para la utilización según la reivindicación 4 o 5, en el que la prevención de los tumores de la piel está destinada a la prevención del cáncer de piel.
- 25 7. Composición para la utilización en la supresión de la formación de células de la piel anormales causada por la exposición a la luz, que comprende por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en adenosín monofosfatos y sales de los mismos como principio activo.
8. Composición para la utilización según la reivindicación 7, que comprende por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en adenosín monofosfatos y sales de los mismos en una cantidad de 0,5% a 20% en peso basada en el peso total de la composición.
- 30 9. Composición para la utilización según la reivindicación 7 u 8, para la utilización en la reparación de los daños al ADN inducidos por la exposición a la luz.
- 35 10. Composición para la utilización según la reivindicación 7 u 8, para la utilización en la supresión de la formación de células de la piel anormales.

Fig. 1a

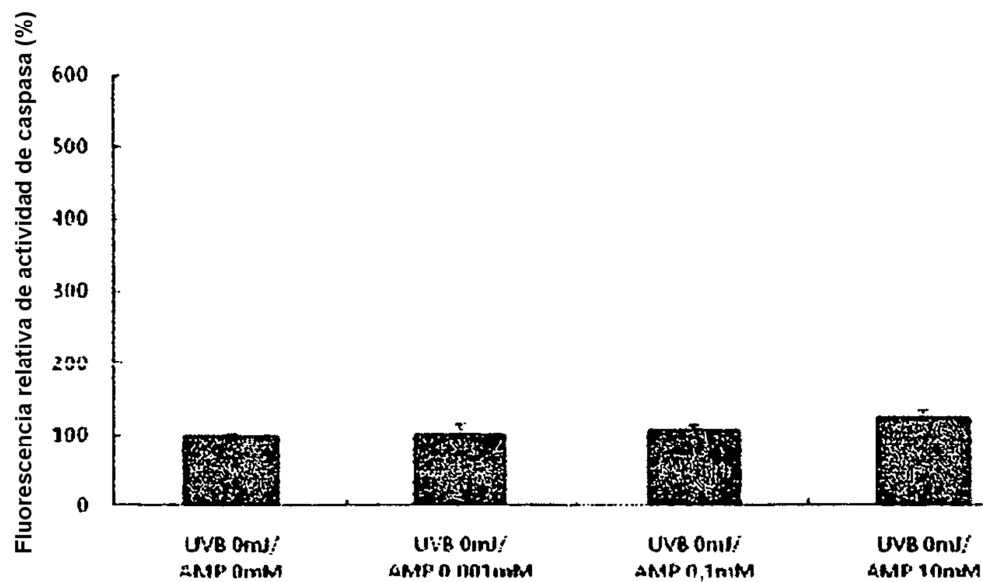


Fig. 1b

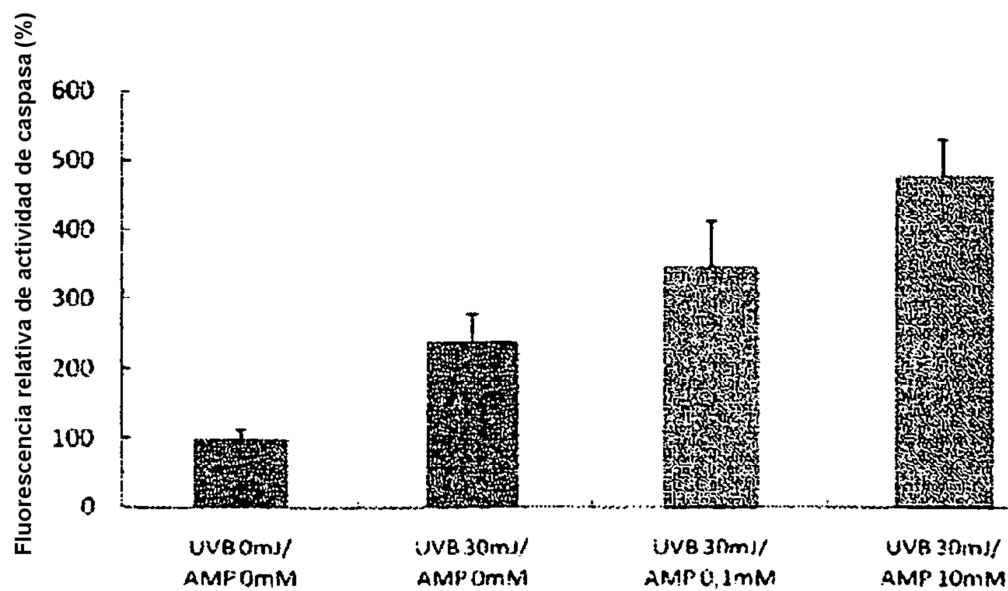


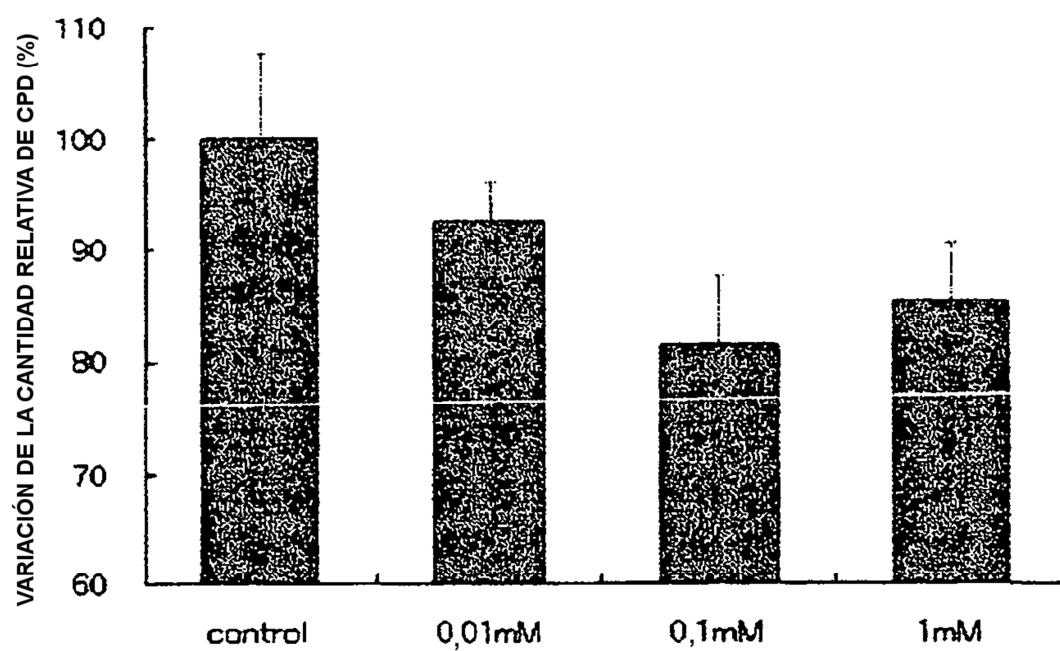
Fig. 2**VARIACIÓN DE LA CANTIDAD RELATIVA DE CPD (%)**

Fig. 3

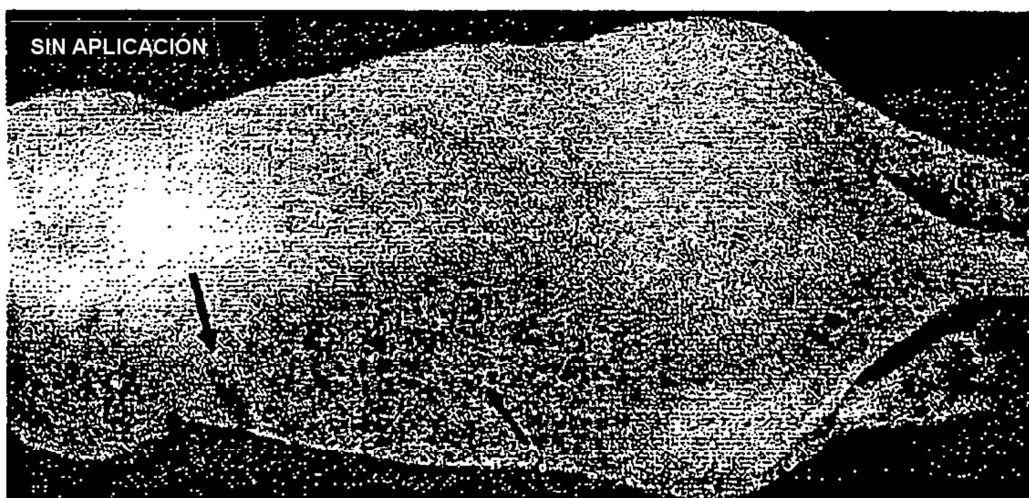
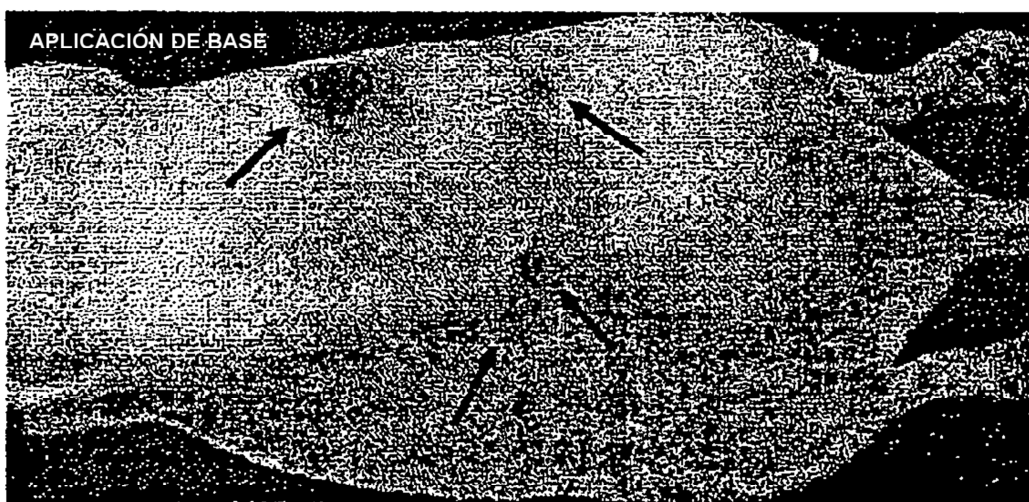


Fig. 4

