

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 119**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 31/593** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 10803440 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2515874**

54 Título: **Nanocristales de monohidrato de calcipotriol**

30 Prioridad:

**22.12.2009 WO PCT/DK2009/000267**  
**07.01.2010 US 293091 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.11.2014**

73 Titular/es:

**LEO PHARMA A/S (100.0%)**  
**Industriparken 55**  
**2750 Ballerup , DK**

72 Inventor/es:

**PETERSSON, KARSTEN**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 523 119 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

Nanocristales de monohidrato de calcipotriol

## 5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el monohidrato de calcipotriol en forma de nanocristales y la inclusión de los nanocristales en una composición farmacéutica para usar en la prevención o tratamiento de enfermedades y afecciones dérmicas.

## 10 Antecedentes de la invención

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que se manifiesta como placas descamativas, eritematosas, secas que resultan de la hiperqueratosis. Las placas se encuentran más frecuentemente en los codos, rodillas y cuero cabelludo, aunque lesiones más extensas pueden aparecer en otras partes del cuerpo, notablemente en la región lumbosacra. El tratamiento más común de la psoriasis suave a moderada implica la aplicación tópica de una composición que contiene un corticosteroide como el ingrediente activo. Aunque eficaces, los corticosteroides tienen la desventaja de un número de efectos adversos tales como atrofia dérmica, estrias, erupciones acneiformes, dermatitis perioral, crecimiento excesivo de hongos y bacterias de la piel, hipopigmentación de la piel pigmentada y rosácea.

20 Por muchos años, sin embargo, un tratamiento no esterooidal ventajoso de la psoriasis ha consistido en el tratamiento tópico con el compuesto análogo de la vitamina D, calcipotriol, formulado en una composición de ungüento (comercializada como ungüento Daivonex<sup>®</sup> o Dovonex<sup>®</sup> por LEO Pharma) en la que el calcipotriol se presenta en una composición en solución o crema (comercializada como crema Daivonex<sup>®</sup> o Dovonex<sup>®</sup> por LEO Pharma) en la que el calcipotriol se presenta en una suspensión de micropartículas. El solvente en la composición de ungüento es propilenglicol que tiene la ventaja de potenciar la penetración del ingrediente activo en la piel, que conduce a una eficacia mejorada, pero que también se conoce por actuar como un irritante de la piel. Así, se informó que la inclusión de propilenglicol en composiciones tópicamente frecuentemente causa que los pacientes desarrollen dermatitis por contacto (un estudio informó una serie de reacciones irritantes al propilenglicol de 12.5 % , cf . M. Hannuksela y otros, Contact Dermatitis 1, 1975, págs. 112-116), y el número de reacciones irritantes aumenta cuando se usa propilenglicol en altas concentraciones (revisado por J. Catanzaro y J. Graham Smith, J. Am. Acad. Dermatol. 24, 1991, pp. 90-95). Debido a la penetración mejorada del calcipotriol en la piel como resultado, *entre otros*, de la presencia del propilenglicol, se encontró que el ungüento Daivonex<sup>®</sup> era más eficaz en el tratamiento de las lesiones psoriásicas que la crema Daivonex<sup>®</sup>, pero también causó irritación en la piel en una proporción significativa de pacientes de psoriasis.

## 35 Resumen de la invención

40 La piel humana, particularmente la capa externa, el estrato córneo, proporciona una barrera eficaz contra la penetración de patógenos microbianos y químicos tóxicos. Si bien esta propiedad de la piel es generalmente beneficiosa, complica la administración dérmica de productos farmacéuticos ya que una gran cantidad, si no la mayoría, del ingrediente activo aplicado sobre la piel de un paciente que padece de una enfermedad dérmica puede no penetrar en las capas viables de la piel donde ejerce su actividad. Para asegurar la penetración adecuada del ingrediente activo a la dermis y la epidermis, generalmente se prefiere incluir el ingrediente activo en un estado disuelto, típicamente en presencia de un solvente en la forma de un alcohol, por ejemplo etanol, o diol, por ejemplo propilenglicol. El propilenglicol es un potenciador de penetración bien conocido, es decir, una sustancia que es capaz de penetrar el estrato córneo y "atraer" los componentes de bajo peso molecular tal como los componentes terapéuticamente activos en el vehículo en la epidermis. El propilenglicol puede por sí mismo dar lugar a una irritación significativa de la piel, y es además capaz de "llevar" componentes de bajo peso molecular y potencialmente irritantes del vehículo dentro de la epidermis, que conduce al efecto irritante general de los vehículos convencionales que incluyen al propilenglicol. Por esta razón, la presencia del propilenglicol como solvente en composiciones destinadas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel puede exacerbar la respuesta inflamatoria.

50 En la investigación que conduce a la presente invención, fue un objetivo proporcionar una composición tópica que comprende calcipotriol como el ingrediente activo, que tiene propiedades de penetración en la piel y actividad biológica comparables con las del ungüento Daivonex<sup>®</sup>, pero que no contiene propilenglicol como el solvente.

Sorprendentemente se encontró posible preparar monohidrato de calcipotriol en forma de nanocristales que son químicamente estables (es decir no degradados en 24-epi calcipotriol u otros productos de degradación) como

inesperadamente cantidades no significativas de calcipotriol amorfo se forman como resultado de alto estrés o fuerzas de impacto o altas temperaturas durante el nanodimensionado. Además, los nanocristales son físicamente estables ya que no se observa agregación o crecimiento del cristal o cambio en la forma del cristal (polimórfico) en una suspensión de los nanocristales después de la preparación. Los nanocristales se formulan fácilmente en composiciones de crema y ungüento tópicos a partir de los que el calcipotriol (monohidrato) puede penetrar en capas viables de la piel (es decir la dermis y la epidermis) en cantidades comparables a la penetración del calcipotriol del ungüento Daivonex<sup>®</sup> y resulta en niveles similares o más altos de actividad biológica (según se determina por la activación *in vitro* de un gen objetivo) sin recurrir a la inclusión de un potenciador de la penetración tal como el propilenglicol que es un potencial irritante de la piel.

En consecuencia, en un aspecto la presente invención se refiere a una suspensión de monohidrato de calcipotriol en forma de nanocristales de una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm determinado por dispersión dinámica de luz, la suspensión comprende además una fase acuosa que incluye un surfactante no iónico, polimérico en una cantidad suficiente para prevenir la formación de agregados y/o el crecimiento de cristales de los nanocristales de monohidrato de calcipotriol.

En otro aspecto, la solicitud se refiere a un proceso para preparar nanocristales de monohidrato de calcipotriol de una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm determinado por dispersión dinámica de luz, el proceso comprende las etapas de

(a) disminuir el monohidrato de calcipotriol cristalino en una fase acuosa que comprende surfactante no iónico, polimérico en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % en peso de dicha fase acuosa, lo que resulta en la formación de micropartículas con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 5-20  $\mu\text{m}$  y un tamaño medio de partícula de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ;

(b) someter la suspensión de la etapa (a) a un primer ciclo de homogeneización a alta presión a una presión de aproximadamente 300-800 bar por un período de tiempo suficiente para obtener aproximadamente 15-40 % de cristales de monohidrato de calcipotriol con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm;

(c) someter la suspensión de la etapa (b) a un segundo ciclo de homogeneización a alta presión a una presión de aproximadamente 800-1200 bar un período de tiempo suficiente para obtener aproximadamente 40-80 % de cristales de monohidrato de calcipotriol con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm;

(d) someter la suspensión de la etapa (c) a un tercer ciclo de homogeneización a alta presión a una presión de aproximadamente 1200-1700 bar un período de tiempo suficiente para obtener aproximadamente 90 % o más de cristales de monohidrato de calcipotriol con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm; y

(e) opcionalmente aislar los nanocristales de monohidrato de calcipotriol resultantes de la fase acuosa.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende los nanocristales de monohidrato de calcipotriol descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

Aun en un aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición que comprende nanocristales de monohidrato de calcipotriol o nanosuspensión para el tratamiento de enfermedades o afecciones dérmicas tales como soriasis, sebosoriasis, pustulosis palmoplantar, dermatitis, ictiosis, rosácea o acné.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que muestra la distribución de tamaño de partícula de los nanocristales de monohidrato de calcipotriol preparados por el presente proceso, determinado por dispersión dinámica de luz.

La Figura 2a es un gráfico que compara el espectro Raman de una nanosuspensión de monohidrato de calcipotriol en 2 % poloxámero 188 con un espectro Raman de monohidrato de calcipotriol no sujeto a nanodimensionado. La figura muestra que el proceso de nanodimensionado de acuerdo con la invención no resulta en ningún cambio en la forma del cristal de monohidrato de calcipotriol.

Las Figuras 2b y 2c son gráficos que muestran los resultados del análisis de calorimetría de barrido diferencial (DSC por sus siglas en inglés) de dos lotes de nanocristales de monohidrato de calcipotriol preparados por el presente proceso. La DSC se llevó a cabo a 100 °C/min (Fig. 2b), y a 100 °C/min (línea sólida), 300 °C/min (línea punteada), y a 500 °C/min

(línea discontinua) (Figura 2c). La línea ligeramente más gruesa en el gráfico refleja un evento exotérmico que ocurre a aproximadamente 8°C y se cree que es debido a la cristalización del calcipotriol amorfo.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la velocidad de liberación del calcipotriol a partir de la presente nanosuspensión en comparación a la velocidad de liberación a partir del ungüento Daivonex<sup>®</sup>. Parece por la figura que la velocidad de liberación es significativamente más alta a partir de las formulaciones de nanosuspensión que a partir del ungüento Daivonex<sup>®</sup>. "Crema de Nanosuspensión" es la crema de acuerdo al Ejemplo 3. "Nanosusp. ung. acua" corresponde a la Composición A del Ejemplo 2 sin glicerol, mientras "Nanosusp. ung. gli" es la Composición A del Ejemplo 2.

La Figura 4a es un gráfico que muestra la penetración dentro de la piel y el flujo a través de la piel a partir de dos ungüentos de nanosuspensión, Composición A y C del Ejemplo 2. "Ungüento WSP " es la Composición A, mientras "Ungüento Sonnecone" es la Composición C.

La Figura 4b es un gráfico que muestra la penetración dentro de la piel y el flujo a través de la piel del calcipotriol a partir de ungüentos de nanosuspensión, la Composición A, C y D, de la invención en comparación al ungüento Daivonex<sup>®</sup>. Parece a partir de la figura que la penetración dentro de la piel viable a partir de ungüentos de nanosuspensión es comparable a aquella a partir del ungüento Daivonex<sup>®</sup>, mientras el flujo es significativamente más bajo, lo que resulta en menos exposición sistémica al calcipotriol.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la penetración dentro de la piel y flujo a través de la piel del calcipotriol a partir de una crema de nanosuspensión de la invención en comparación a la crema Daivonex<sup>®</sup>. Parece a partir de la figura que la penetración del calcipotriol a partir de la crema de nanosuspensión dentro de la piel viable es significativamente más alta a partir de la crema de nanosuspensión que a partir de la crema Daivonex<sup>®</sup>.

La Figura 6 es una representación esquemática de la activación del gen que codifica la catelicidina por la vitamina D<sub>3</sub> en los queratinocitos humanos. El mecanismo de activación del gen de la catelicidina se usa en un ensayo biológico por medio del uso de la epidermis humana reconstituida (queratinocitos humanos cultivados a fin de formar las capas epidérmicas característica de la piel humana) sobre la que se aplican las composiciones que contienen calcipotriol de la invención para activar catelicidina como se describe en detalle en el Ejemplo 8 más abajo.

Descripción detallada de la invención

#### *Definiciones*

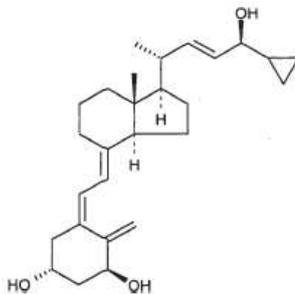
En el presente contexto, el término "nanocristales" significa partículas de cristal de monohidrato de calcipotriol, que están en el intervalo de nanodimensión, es decir entre 1 y 1000 nm en diámetro. Los nanocristales favorablemente tienen una distribución de tamaño de partícula tal que  $\geq 90$  % de los nanocristales tienen un tamaño de partícula entre 100 y 900 nm, en particular entre 200 y 600 nm.

El término "nanosuspensión" significa nanocristales como se definió anteriormente suspendidos en una fase acuosa.

El término "distribución de tamaño de partícula" significa el tramo entre el cristal de monohidrato de calcipotriol más pequeño y más grande determinado por dispersión dinámica de luz (además conocida como espectroscopia de correlación de fotón) por medio del uso de un Zetasizer Nano ZS o ZS90 de acuerdo a las instrucciones del fabricante (disponibles de Malvern Instruments, Reino Unido). La dispersión dinámica de luz determina el tamaño de partículas sólidas suspendidas en un líquido al iluminar las partículas con un láser y analizar las fluctuaciones de intensidad en la luz dispersada que resultan de los movimientos Brownianos de las partículas en el líquido. Las fluctuaciones de la intensidad se correlacionan al tamaño de la partícula en que partículas más grandes se mueven más lentamente que partículas más pequeñas, es decir la fluctuación de la intensidad es más lenta.

El término "amorfo" significa una sustancia sólida sin un arreglo ordenado de sus moléculas, es decir lo opuesto de cristalino.

"Calcipotriol" es un análogo de la vitamina D de la fórmula



Se ha constatado que el calcipotriol existe en dos formas cristalinas, un anhidrato y un monohidrato. El monohidrato de calcipotriol y su preparación se describen en el documento WO 94/15912.

El término "estabilidad química" o "químicamente estable" significa que los nanocristales de monohidrato de calcipotriol no se degradan significativamente en el tiempo a 24-epi calcipotriol u otros productos de degradación del calcipotriol en suspensión o en el producto farmacéutico final. En caso de este último, "estabilidad química" indica que no más del 10 %, preferentemente no más del 6 %, del monohidrato de calcipotriol se degrada durante la vida útil del producto, típicamente 2 años, a temperatura ambiente. Una aproximación de estabilidad química a temperatura ambiente se obtiene al someter los nanocristales o una composición que los contiene a estudios de estabilidad acelerados a 40 °C. Si menos del 10 % de la sustancia se degrada después de 3 meses a 40 °C, esto usualmente se corresponde a una vida útil de 2 años a temperatura ambiente.

El término "estabilidad física" o "físicamente estable" significa que los nanocristales de monohidrato de calcipotriol tienen esencialmente la forma del cristal idéntica a la del monohidrato de calcipotriol de referencia, que no se sometió a nanodimensionado, según se determina por espectroscopía Raman, es decir no exhibe polimorfismo como resultado del nanodimensionado. Además, "estabilidad física" indica que los nanocristales no exhiben agregación o crecimiento del cristal en las suspensiones o composiciones farmacéuticas reivindicadas en las que se incorporan.

El término "sustancialmente no-acuoso" significa que el contenido de agua libre (como oposición al agua enlazada al cristal) de los nanocristales de monohidrato de calcipotriol liofilizados o secados por aspersion es menos que aproximadamente 2 % en peso, preferentemente menos que aproximadamente 1 % en peso, tal como menos que aproximadamente 0.5 % en peso, de los nanocristales. Similarmente, el contenido de agua libre en una composición de ungüento "sustancialmente anhidro" es menos que aproximadamente 3 % en peso, preferentemente menos que aproximadamente 2 % en peso, tal como menos que aproximadamente 1 % o 0.5 % en peso, de la composición.

El término "capacidad de solubilización" indica la capacidad de un solvente o mezcla de solventes para disolver una sustancia dada, expresada como la cantidad requerida para efectuar la solubilización completa de la sustancia.

El término "penetración en la piel" significa la difusión del ingrediente activo en las diferentes capas de la piel, es decir estrato córneo, la epidermis y la dermis.

El término "permeación de la piel" significa el flujo del ingrediente activo a través de la piel dentro de la circulación sistémica o, en el caso de estudios *in vitro* tales como los informados en el Ejemplo 7 más abajo, el fluido receptor del aparato de celdas de Franz usado en el experimento.

El término "actividad biológica" significa la actividad de un derivado o análogo de la vitamina D cuando se aplica a la piel en una composición de la invención. La actividad biológica de las composiciones se determina en un ensayo *in vitro* por la medición de la activación de un gen objetivo que codifica el biomarcador de catelicidina en un modelo de epidermis humana reconstruida que involucra queratinocitos humanos cultivados, como se describe en detalles en el Ejemplo 8 más abajo.

*Preparación de nanocristales de monohidrato de calcipotriol*

En años recientes la preparación de nanocristales o nanosuspensiones de ingredientes terapéuticamente activos se ha investigado cada vez más como una forma de proporcionar una velocidad de disolución mejorada de fármacos pobremente solubles. La mayor área de superficie de los nanocristales asegura una mayor velocidad de disolución cuando se administra el fármaco. La tecnología se ha usado hasta ahora mayormente en la formulación de ingredientes activos para la administración oral o intravenosa.

Varios métodos para hacer nanocristales fármacos se han descrito en la literatura. Ampliamente, los métodos se pueden dividir en dos categorías, es decir molienda y homogeneización a alta presión.

La patente de Estados Unidos US 5,145,684 describe un método de preparar nanopartículas cristalinas por molienda de bola por 4-5 días en presencia de modificadores de superficie tal como polivinil pirrolidona, alcohol polivinílico, lecitina u otro surfactante. La molienda de bola del monohidrato de calcipotriol bajo estas condiciones probablemente resulte ya sea directamente en la degradación química del monohidrato de calcipotriol o en la formación de grandes cantidades de calcipotriol amorfo, que no sería favorable para una suficiente estabilidad de almacenamiento/vida útil de una composición farmacéutica que lo contiene ya que un material amorfo es relativamente más vulnerable a la degradación química que el material cristalino.

La patente de Canadá CA 2375992 describe un método de preparar partículas de fármaco con un tamaño de partícula de menos que 5  $\mu\text{m}$ , preferentemente menos que 1  $\mu\text{m}$ , por homogeneización a alta presión en un homogeneizador de pistón hueco en un medio anhidro a una temperatura por debajo de 20 °C, en particular por debajo de 0 °C. El nanodimensionado se lleva a cabo al someter las partículas del fármaco micronizado a 10-20 ciclos de homogeneización a alta presión a 1500 bar. En el presente método, se usa un medio acuoso para la disminución del calcipotriol ya que el uso de un medio anhidro (parafina líquida) no resultó en ninguna reducción significativa del tamaño de los cristales del monohidrato de calcipotriol.

El documento WO 2004/054549 describe una formulación tópica de nanopartículas de espirolactona en una base de crema que comprende monoglicéridos en agua. Las nanopartículas se preparan por medio del uso de homogeneización de alta presión de pistón hueco.

La homogeneización a alta presión a 1500 bar por varios ciclos se encontró que era inadecuada para la disminución del monohidrato de calcipotriol ya que este procedimiento conduce a la agregación de los cristales de monohidrato de calcipotriol incluso en presencia de un surfactante adecuado.

El documento WO 2008/058755 describe la preparación de nanocristales de sustancias cosméticamente activas por molienda de bola o perla seguido por homogeneización a alta presión. La combinación de los dos métodos se indica que es ventajosa por encima de la homogeneización a alta presión por sí misma ya que la última requiere muchos ciclos de homogeneización a alta presión (1500 bar). El método de combinación hace posible usar solamente un ciclo de homogeneización a más baja presión para obtener partículas nanodimensionadas.

En una modalidad preferida, la invención se refiere a un proceso para preparar nanocristales de monohidrato de calcipotriol de una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm determinado por dispersión dinámica de luz, el proceso comprende las etapas de

(a) disminuir el monohidrato de calcipotriol cristalino en una fase acuosa que comprende surfactante no iónico, polimérico en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % en peso de dicha fase acuosa, lo que resulta en la formación de micropartículas con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 5-20  $\mu\text{m}$  y un tamaño medio de partícula de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ;

(b) someter la suspensión de la etapa (a) a un primer ciclo de homogeneización a alta presión a una presión de aproximadamente 300-800 bar por un período de tiempo suficiente para obtener aproximadamente 15-40 % de cristales de monohidrato de calcipotriol con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm;

(c) someter la suspensión de la etapa (b) a un segundo ciclo de homogeneización a alta presión a una presión de aproximadamente 800-1200 bar un período de tiempo suficiente para obtener aproximadamente 40-80 % de cristales de monohidrato de calcipotriol con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm;

(d) someter la suspensión de la etapa (c) a un tercer ciclo de homogeneización a alta presión a una presión de aproximadamente 1200-1700 bar un período de tiempo suficiente para obtener aproximadamente 90 % o más de cristales de monohidrato de calcipotriol con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm; y

(e) opcionalmente aislar los nanocristales de monohidrato de calcipotriol resultantes de la fase acuosa.

En la suspensión final (después de la etapa (d)) la cantidad de nanocristales de monohidrato de calcipotriol con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm es de preferencia aproximadamente 95 % o más.

5 El presente método se diferencia del descrito en el documento WO 2008/058755 por combinar la etapa de disminución inicial (a) con tres ciclos sucesivos de homogeneización a alta presión, cada ciclo se lleva a cabo a una presión que aumenta. Esto es diferente al procedimiento preferido del documento WO 2008/058755 donde a la molienda de bola del ingrediente activo sigue un ciclo de homogeneización a alta presión a baja presión (tal como 100 bar, cf Ejemplos 8 y 9) lo que resulta en la reducción del tamaño de partícula deseada. Tal procedimiento se encontró que es insuficiente para proporcionar un tamaño de partícula y distribución de tamaño de partícula de cristales de monohidrato de calcipotriol satisfactorios, es decir solamente aproximadamente 15-40 % de los cristales estarían dentro de la distribución de tamaño de partícula deseado.

10 Además, se encontró innecesario llevar a cabo el presente proceso con control de temperatura a diferencia del procedimiento descrito en el documento WO 2008/058755 donde, para dos de tres ingredientes activos, la temperatura tiene que mantenerse por debajo de 20 °C e idealmente entre 0 °C y 5 °C. No tener que aplicar control de temperatura ofrece la ventaja de un procedimiento simplificado. Es sorprendente, sin embargo, que no se requiera control de temperatura en el presente proceso ya que el calcipotriol es sensible a los aumentos de temperatura y se esperaría que se degradara químicamente sin control de la temperatura del proceso de disminución.

#### 20 *Modalidades de la invención*

25 La presente suspensión puede contener un surfactante no iónico, polimérico que se añade para prevenir la agregación de los nanocristales de calcipotriol y/o para prevenir el crecimiento del cristal. El surfactante debe preferentemente ser uno que no cause ninguna solubilización significativa de los nanocristales de monohidrato de calcipotriol, es decir debe tener una pobre capacidad de solubilización, y puede seleccionarse favorablemente del grupo que consiste de los surfactantes poloxámero o polisorbato, y alquil éteres de polioxietileno de C<sub>6-24</sub>. El poloxámero puede seleccionarse del grupo que consiste en poloxámero 124, poloxámero 188, poloxámero 237, poloxámero 338 y poloxámero 407. En particular, el poloxámero 188 se encontró que tiene una pobre capacidad de solubilización con respecto a solubilizar el calcipotriol y es por lo tanto el surfactante favorito actualmente para usar en la presente nanosuspensión. Cuando se usa un polisorbato como el surfactante, éste puede seleccionarse del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 61, polisorbato 80 y polisorbato 81. El alquil éter de polioxietileno de C<sub>6-24</sub> actualmente preferido es cetomacrogol 1000.

30 La cantidad de surfactante en la fase acuosa puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.01 % a aproximadamente 5 % en peso de la suspensión. Se prefiere generalmente que la cantidad de surfactante en la fase acuosa esté en el intervalo de aproximadamente 0.6-1.2 % en peso de la suspensión.

35 Dependiendo de las condiciones aplicadas durante la disminución y homogeneización de alta presión, los nanocristales de monohidrato de calcipotriol presentes en la suspensión resultante pueden tener un tamaño medio de partícula de 200-350 nm, 350-400 nm o 400-500 nm determinado por dispersión dinámica de luz.

40 La nanosuspensión puede liofilizarse o secarse por aspersion a nanocristales que comprenden surfactante en la superficie. Los nanocristales liofilizados o secados por aspersion pueden después usarse para la incorporación en composiciones no-acuosas.

45 Sorprendentemente se encontró que los presentes procedimientos de nanodimensionado resultan en la generación de cantidades insignificantes solamente de calcipotriol amorfo. Es bien conocido para los expertos en la técnica que la presencia de compuestos amorfos hacen al material inestable debido a la falta de arreglo molecular en la red cristalina que expone el material a la degradación química o al reordenamiento de la estructura del cristal a una forma polimórfica diferente (cf. Chow y otros, J. Pharm. Sci. 97(8), 2008, págs. 2855-2877). Como se determinó por calorimetría de barrido diferencial por medio del uso de un instrumento Perkin-Elmer DSC 8500 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, no fue posible detectar cantidades significativas del calcipotriol amorfo al límite de detección del instrumento (aproximadamente 5 %), cf. Figura 2b.

50 En el presente proceso, los cristales de calcipotriol inicialmente se someten a molienda, o premolienda, en una fase acuosa por medio del uso de bolas o perlas de un diámetro en el intervalo de 1-4 mm, tal como 2-3 mm. Las bolas o perlas pueden estar compuestas de cristal o materiales similarmente duros tal como óxido de zirconio. La molienda puede realizarse

convenientemente por 2-5 horas, tal como 3 horas, a aproximadamente 500-4000 rpm, tal como aproximadamente 1000-3000 rpm, por ejemplo aproximadamente 2000 rpm.

5 El surfactante usado para la molienda puede convenientemente ser un surfactante no iónico, polimérico que se añade a la fase acuosa en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3 % en peso de la suspensión, en particular aproximadamente 2 % en peso de la suspensión. El surfactante puede preferentemente seleccionarse del grupo de surfactantes poloxámero o polisorbato como se describe anteriormente. La suspensión subsecuentemente se usa directamente en las etapas de homogeneización a alta presión, y se ha obtenido un resultado particularmente favorable con respecto a la distribución del tamaño de partícula por medio del uso de poloxámero 188. Debe notarse que debido al presente proceso de fabricación donde el equipo de molienda que se usa en la etapa (a) se enjuaga con agua, y el equipo de homogeneización a alta presión se enjuaga con agua después de la etapa (d), la concentración de surfactante en la suspensión final está en el intervalo de aproximadamente 0.6-1.2 % en peso de la suspensión.

10 Las etapas de homogeneización a alta presión (b)-(d) se llevan a cabo por medio del uso de un homogeneizador de pistón hueco, por ejemplo Emulsiflex C3 (disponible de Avestin) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Para el nanodimensionado de monohidrato de calcipotriol se encontró favorable que el primer ciclo de homogeneización a alta presión de la etapa (b) se lleve a cabo a una presión de aproximadamente 500-650 bar. El tiempo necesario para obtener 15-40 % de nanocristales de monohidrato de calcipotriol con la distribución de tamaño de partícula deseada está en el intervalo de 7-15 minutos, por ejemplo 8-12 minutos, tal como aproximadamente 10 minutos.

20 El segundo ciclo de homogeneización a alta presión de la etapa (c) puede llevarse a cabo convenientemente a una presión de aproximadamente 1000-1100 bar. El tiempo necesario para obtener 40-80 % de nanocristales de monohidrato de calcipotriol con la distribución de tamaño de partícula deseada está en el intervalo de 7-15 minutos, por ejemplo 8-12 minutos, tal como aproximadamente 10 minutos.

25 El tercer ciclo de homogeneización a alta presión de la etapa (d) puede llevarse a cabo convenientemente a una presión de aproximadamente 1400-1500 bar. El tiempo necesario para obtener 90 % o más nanocristales de monohidrato de calcipotriol con la distribución de tamaño de partícula deseada está en el intervalo de 7-15 minutos, por ejemplo 8-12 minutos, tal como aproximadamente 10 minutos.

30 Si los nanocristales de monohidrato de calcipotriol están destinados para la inclusión en una formulación no-acuosa, ellos pueden convenientemente someterse a liofilización o secado por aspersión (a un contenido de agua (libre de agua) de menos que aproximadamente 2 % en peso, tal como menos que aproximadamente 1 % o menos que aproximadamente 0.5 % en peso, de los nanocristales.

35 La suspensión que comprende los nanocristales, puede incluirse en una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable que es compatible con el ingrediente activo.

40 Cuando se mezclan con excipientes farmacéuticamente aceptables para proporcionar una composición como se describe más abajo, la cantidad de surfactante polimérico no-iónico está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0.03-0.06 % en peso de la composición.

45 En una modalidad, la presente composición es un ungüento. De acuerdo a la clasificación actual de la FDA, un ungüento es una forma de dosificación semisólida que puede contener agua y sustancias volátiles en una cantidad de hasta 20 % en peso y que contiene más que 50 % en peso de hidrocarburos, ceras o polioles en el vehículo. Así, de acuerdo con la invención, el ungüento puede ser una composición agua-en-aceite en cuyo caso la nanosuspensión se puede añadir como tal a los componentes lipofílicos de la composición, de forma tal que la composición contiene hasta 10 % en peso o, preferentemente, hasta 5 % en peso de la fase acuosa. Alternativamente, la composición puede ser un ungüento no-acuoso que contiene menos que aproximadamente 2 %, preferentemente menos que 1 %, de agua libre por peso de la composición.

50 El portador ungüento puede convenientemente contener una parafina seleccionada de parafinas que consisten de hidrocarburos con longitudes de cadena desde C<sub>5-60</sub> y mezclas de estos. Un portador ungüento usado frecuentemente es la vaselina, o parafina blanda blanca, que se compone de hidrocarburos de diferentes longitudes de cadena que alcanzan hasta aproximadamente C<sub>40-44</sub>, o una mezcla de vaselina y parafina líquida (consistente de hidrocarburos de diferentes longitudes de cadena que alcanzan hasta C<sub>28-40</sub>). Mientras la parafina proporciona oclusión de la superficie de piel tratada, lo que reduce la pérdida transdérmica de agua y potencia el efecto terapéutico del ingrediente activo de la composición, esta

5 tiende a tener una sensación grasienta o pegajosa, que persiste durante bastante tiempo después de la aplicación, y no es fácil de untar. Por lo tanto puede ser preferible emplear parafinas que consisten en hidrocarburos de longitud de cadena algo más baja, tales como parafinas que consiste en hidrocarburos con longitudes de cadena que alcanzan hasta C<sub>14-16</sub>, C<sub>18-22</sub>, C<sub>20-22</sub>, C<sub>20-26</sub> o mezclas de estos. Se encontró que tales parafinas son cosméticamente más aceptables ya que son menos grasientas o pegajosas en las aplicaciones y más fácilmente untables. Se espera por lo tanto que resulten en una mejor conformidad del paciente. Las parafinas adecuadas de este tipo se fabrican por Sonneborn y se comercializan bajo el nombre comercial Sonnecone, por ejemplo Sonnecone CM, Sonnecone DM1, Sonnecone DM2 y Sonnecone HV. Estas parafinas se describen y caracterizan más aún en el documento WO 2008/141078. (La composición de hidrocarburo de las parafinas se determinó por cromatografía gaseosa).

10 Para impartir una viscosidad deseada a la presente composición, puede incluir adecuadamente un ingrediente lipófilo que aumente la viscosidad tal como una cera. La cera puede ser una cera mineral compuesta por una mezcla de hidrocarburos de alto peso molecular, por ejemplo alcanos de C<sub>35-70</sub> saturados, tal como cera microcristalina. Alternativamente, la cera puede ser una cera vegetal o animal, por ejemplo ésteres de ácidos grasos de C<sub>14-32</sub> y alcoholes grasos de C<sub>14-32</sub>, tal como cera de abejas. La cantidad de ingrediente que aumenta la viscosidad puede variar de acuerdo al poder viscosificante del ingrediente, pero puede típicamente estar en el intervalo de aproximadamente 1 -20 % en peso de la composición. Cuando el ingrediente que aumenta la viscosidad es cera microcristalina está presente típicamente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 5 -15 % en peso, por ejemplo aproximadamente 10 % en peso, de la composición.

20 Para mantener una buena estabilidad física de la composición, en particular para evitar la separación de las fases acuosa y lipídica en la misma, puede ser ventajoso incluir un emulsionante agua-en-aceite con un valor HLB de 3-8. Ejemplos de tales emulsionantes son alquil éteres de polioxietileno de C<sub>8-22</sub>, por ejemplo, estearil éter de polioxietileno, cetil éter de polioxietileno, oleil éter de polioxietileno o lauril éter de polioxietileno. La cantidad de emulsionante está típicamente en el intervalo de 2-10 % p/p de la composición.

25 La composición puede adicionalmente comprender un emoliente que puede actuar para suavizar la epidermis engrosada de la placa psoriásica. Un emoliente adecuado para incluir en la presente composición puede ser una cera de silicona o un aceite de silicona volátil ya que la presencia de silicona adicionalmente se encontró que ayuda a la penetración del calcipotriol en la piel. Las composiciones que incluyen silicona se encontró además que dan como resultado menos irritación de la piel. Los aceites de silicona adecuados para incluir en la presente composición se pueden seleccionar de ciclometicona y dimeticona. La cantidad de aceite de silicona incluido en la presente composición está típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 % en peso, por ejemplo aproximadamente 5 % en peso, de la composición.

30 En el ungüento Daivonex<sup>®</sup>, la presencia de propilen glicol se cree que es un contribuyente principal para la irritación de la piel experimentada por muchos pacientes. Sin embargo, se encontró que el calcipotriol puede ser en sí mismo ligeramente irritante en algunos pacientes (A. Fullerton y J. Serup, Br. J. Dermatol. 137, 1997, págs. 234-240 y A. Fullerton y otros, Br. J. Dermatol. 138, 1998, págs. 259-265). Por consiguiente, puede ser ventajoso incluir un compuesto anti-irritante en la presente composición, tal como glicerol, sorbitol, sacarosa, sacarina, mentol, eucaliptol o nicotinamida. El glicerol se ha descrito como una sustancia que es capaz de proteger la piel contra sustancias irritantes (J. Bettinger y otros, Dermatology 197, 1998, págs. 18-24) y hemos encontrado que reduce la liberación de IL-1 en una manera dosis-dependiente: así, se encontró que la presencia de 15 % en peso de glicerol en un ungüento de calcipotriol resulta en un nivel significativamente más bajo de liberación de IL-1a que la inclusión de 10 % en peso de glicerol que, en cambio, resulta en un nivel significativamente más bajo de liberación de IL-1a que la inclusión de 5 % en peso de glicerol.

45 Sin embargo, adicionalmente al efecto anti-irritante, sorprendentemente se encontró que el glicerol es capaz de potenciar la actividad biológica del calcipotriol ya que la expresión de catelicidina (en el ensayo descrito en el Ejemplo 4 más abajo) se encontró que aumentó con una baja cantidad de glicerol en la composición (es decir se expresa más catelicidina cuando la cantidad de glicerol es 5 % en peso que cuando la cantidad de glicerol es 10 % o 15 %, respectivamente): esto implica que con respecto a la inclusión de glicerol tiene que alcanzarse un balance entre un efecto anti-irritante favorable y un efecto potenciador favorable. Encontramos que la inclusión de aproximadamente 5-10 % en peso de glicerol en la presente composición resulta en un efecto anti-irritante significativo así como una potenciación significativa de la actividad biológica del calcipotriol.

55 El calcipotriol se conoce por ser una sustancia que es extremadamente sensible a condiciones ácidas (pH por debajo de aproximadamente 7.0 en composiciones acuosas o sustancias de reacción ácida en composiciones no acuosas) que contribuyen a la rápida degradación del calcipotriol. Para garantizar una adecuada estabilidad química de la sustancia a lo largo de la vida útil de la composición, es aconsejable incluir un compuesto capaz de neutralizar las impurezas ácidas que

5 pueden estar presentes en uno o más de los excipientes de la composición y que son perjudiciales para la estabilidad química de calcipotriol. Si la composición es acuosa, el compuesto neutralizante de ácido puede seleccionarse de un amortiguador tal como el amortiguador fosfato que se puede incluir en una cantidad de 0.025-0.065 % en peso de la composición. Si, por otra parte, la composición es no-acuosa, el compuesto neutralizante de ácido puede favorablemente ser una amina tal como trietanolamina, trometamol, monoetanolamina o dietanolamina, incluida en la composición en una cantidad de 0.1-2 % en peso de la composición.

10 En otra modalidad, la presente composición es una crema que puede comprender componentes similares al ungüento, pero que típicamente es una emulsión aceite-en-agua que contiene una cantidad sustancial de agua.

En una modalidad específica, la presente composición comprende

- 15 0.003-0.008 % p/p de monohidrato de calcipotriol
- 2-8 % p/p de estearil éter de polioxietileno
- 2-10 % p/p de agua
- 0.001-0.005 % p/p de poloxámero 188
- 70-90 % p/p de portador de parafina

20 La presente composición puede comprender además otros componentes usados comúnmente en formulaciones dérmicas, por ejemplo antioxidantes (por ejemplo alfa-tocoferol), conservantes, edetato sódico, pigmentos, agentes sedantes cutáneos, agentes curativos de la piel y agentes acondicionadores de la piel tales como urea, alantoína o bisabolol, ver CTFA Cosmetic Ingredients Handbook, 2o. Ed., 1992.

25 La composición de la invención se puede usar en el tratamiento de la soriasis, sebosoriasis, pustulosis palmoplantar, dermatitis, ictiosis, rosácea y el acné y enfermedades de la piel relacionadas al administrar tópicamente una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con la invención a un paciente que necesita tal tratamiento. Dicho método preferentemente comprende la administración tópica una o dos veces al día de una dosificación terapéuticamente suficiente de dicha composición. Con tal fin, la composición de acuerdo con la invención preferentemente contiene aproximadamente 0.001-0.5 mg/g, preferentemente aproximadamente 0.002-0.25 mg/g, particularmente 0.005-0.05 mg/g, de nanocristales de monohidrato de calcipotriol. Se prevé que la presente composición se puede usar favorablemente ventajosamente para el tratamiento de mantenimiento de estas enfermedades dérmicas, es decir tratamiento continuo después de la desaparición de los síntomas visibles con el fin de retrasar la recurrencia de los síntomas.

35 Para proporcionar un tratamiento más eficaz de la soriasis y otras condiciones dérmicas en la fase aguda, puede ser deseable incluir uno o más ingrediente terapéuticamente activos adicionales en la composición. Los ejemplos de tales ingredientes activos adicionales incluyen, pero sin limitarse a, fármacos antiinflamatorios tales como corticosteroides, tal como betametasona y ésteres de estos, por ejemplo el éster de valerato o dipropionato, clobetasol o ésteres de este, tal como el propionato, hidrocortisona o ésteres de este, tal como el acetato; fármacos antiinflamatorios no esteroideos tales como naproxeno, indometacina, diclofenaco, ibuprofeno, dexibuprofeno, cetoprofeno, flurbiprofén, piroxicam, lornoxicam o nabumeton, inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (por ejemplo los compuestos descritos en el documento WO 2008/077404, el documento WO 2008/104175, el documento WO 2008/128538 o el documento WO 2010/069322) o inhibidores de la MAP cinasa p38 (por ejemplo los compuestos descritos en el documento WO 2005/009940 o el documento WO 2006/063585).

45 La invención se ilustra más aun por los siguientes ejemplos que de ninguna forma pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica.

Ejemplos

50 Ejemplo 1

Preparación de nanocristales de monohidrato de calcipotriol

4 g de poloxámero 188 se disolvieron en 196 ml de agua de laboratorio con agitación, y el pH se ajustó a 8.5 por la adición de una cantidad apropiada de NaOH.

3.5 g de bolas de cristal de 2 mm se pesaron en dos viales provistos con una tapa de rosca. 0.035 g de monohidrato de

calcipotriol se añadieron a cada vial, después de lo que 1.05 g de la solución 2 % poloxámero 188 se añadieron a cada vial. El monohidrato de calcipotriol se molió por agitación en un agitador orbital (VXR Basic IKA Vibrax) a 2000 rpm.

5 Después de la molienda, los viales y las bolas de cristal usadas para la molienda se enjuagaron con 24.0 g de agua de laboratorio, pH 8.5, y la solución de monohidrato de calcipotriol se vertió en una Botella de Tapa Azul. La suspensión se transfirió a un homogeneizador a alta presión Emulsiflex C3 (Avestin), y la Botella de Tapa Azul se enjuagó con 4.9 g de agua de laboratorio, pH 8.5. La homogeneización a alta presión se llevó a cabo a 500 bar por 10 minutos, a 1000 bar por 10 minutos y a 1400 bar por 10 minutos. Después de la homogeneización a alta presión, el cilindro del aparato Emulsiflex se enjuagó con 4.9 g de agua de laboratorio, pH 8.5, después de lo que se determinó por dispersión dinámica de luz por medio del uso de un Zetasizer Nano ZS90 que la distribución de tamaño de partícula estaba en el intervalo de 200-600 nm y el tamaño medio de partícula estaba en el intervalo de 350-400 nm.

15 Se determinó que los nanocristales resultantes eran monohidrato de calcipotriol por espectroscopía Raman, al comparar el espectro Raman de los nanocristales con el del monohidrato de calcipotriol que no se sometió a nanodimensionado.

La cantidad de calcipotriol amorfo generada en este método se determinó en dos lotes de nanocristales de calcipotriol preparados por el método por medio del uso del análisis DSC a una velocidad de calentamiento de 100 °C, 300 °C y 500 °C/min. bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>. El instrumento usado para el análisis fue un Perkin Elmer DSC 8500.

20 Los resultados se muestran en las Figuras 2b y 2c que muestran un evento exotérmico con un inicio a aproximadamente 8 °C. Es altamente probable que el evento exotérmico se deba a la cristalización del calcipotriol amorfo. Parece que la cantidad de calor emitida durante el proceso de cristalización es muy pequeña, de hecho muy cercana al límite de detección. A partir de que la cantidad de calor emitida durante el proceso de cristalización es proporcional a la cantidad de compuesto amorfo presente en la muestra, concluimos que solamente cantidades insignificantes de calcipotriol amorfo estaban presentes en los dos lotes.

#### Ejemplo 2

30 Ungüentos que contienen nanocristales de monohidrato de calcipotriol

Los ungüentos de la composición mostrados en la Tabla 1 más abajo se prepararon al mezclar los ingredientes de la fase lipídica (hidrocarburos + polioxietilen-2-estearil éter + a-tocoferol) con calentamiento a 80-85 °C y agitación lenta. La fase acuosa se preparó al disolver edetato disódico y fosfato disódico dihidrato en la cantidad adecuada de la nanosuspensión de monohidrato de calcipotriol acuosa (preparada como se describió en el Ejemplo 1) ajustada para contener 50 µg/g de monohidrato de calcipotriol. El glicerol se añadió a la suspensión con mezcla y calentamiento a 35-40 °C y el pH de la mezcla se ajustó a 8.5 con HCl 1N o NaOH, como es adecuado.

40 La fase acuosa se añadió a la fase lipídica y se batió por 30 min. después de lo que el ungüento resultante se enfrió lentamente por debajo de 32 °C y se rellenó en tubos de aluminio y se almacenó a temperatura ambiente.

Tabla 1

	Ingrediente (mg/g)	Comp.A	Comp.B	Comp.C	Comp.D	Comp.E	Comp.F
5	Nanocristales de monohidrato de calcipotriol	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	Fosfato disódico deshidratado	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26
10	Parafina, líquida	50	50	50	50	50	50
	Estearil éter de Polioxietileno 2	50	50	50	50	50	50
	Edetato disódico	0.065	0.065	0.065	0.065	0.065	0.065
15	todo-rac-a-tocoferol	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
	Glicerol	100	-	100	100	100	100
	Agua, purificada	50	150	50	50	50	50
20	Poloxámero 188	0.03	0.03	0.03	0.03	-	-
	Poloxámero 407	-	-	-	-	0.03	-
	Polisorbato 80	-	-	-	-	-	0.03
25	Parafina, blanda blanca	749.6	-	-	699.6	749.6	749.6
	Ciclometicona	-	-	-	50	-	-
	Jalea de vaselina blanca (Sonnecone DM1)	-	649.6	649.6	-	-	-
30	Cera microcristalina (Multiwax 180 MH)	-	100	100	-	-	-

35 La composición se probó para estabilidad química por 3 meses a 40 °C/75 % RH. Los resultados muestran una estabilidad satisfactoria de calcipotriol bajo las condiciones de prueba.

#### Ejemplo 3

40 Crema que contiene nanocristales de monohidrato de calcipotriol

Una crema de la composición indicada más abajo en la Tabla 2 se preparó al fundir cetomacrogol 1000, cetostearylalcohol, parafina líquido y parafina blanda blanca a 80 °C. La fase acuosa se preparó al disolver fosfato disódico dihidrato y cloruro de cloroalilhexaminio en agua purificada a 80 °C. El glicerol se añadió a la solución con mezclado, y el pH de la mezcla se ajustó a 8.5 con HCl 1N o NaOH, como es adecuado.

La fase acuosa se mezcló con la fase lipídica con homogeneización y se enfrió a 55 °C. El agua remanente se añadió con agitación vigorosa, y la crema resultante se enfrió a 25 °C mientras se agitaba a baja velocidad.

50 Una cantidad adecuada de la nanosuspensión del monohidrato de calcipotriol (preparado como se describió en el Ejemplo 1) ajustada para contener 50 µg/g de monohidrato de calcipotriol se añadió a la crema con mezcla por 30 minutos a <30 °C. La crema resultante se rellenó en tubos y se almacenó hasta su uso posterior.

Tabla 2

Ingrediente (mq/q)	Comp. G	Comp. H	Comp. I
Nanocristales de monohidrato de calcipotriol	0.05	0.05	0.05
Cetomacrogol 1000	30	30	30
Cetostearilalcohol	60	60	60
Cloruro de cloroalilhexaminio	0.5	0.5	0.5
Glicerol	30	30	30
Fosfato disódico dihidrato	2	2	2
Poloxámero 188	0.03	-	-
Poloxámero 407	-	0.03	-
Polisorbato 80	-	-	0.03
Parafina, líquida	50	50	50
Parafina, blanda blanca	170	170	170
Agua, purificada	ad 1 g	ad 1 g	ad 1 g

Las composiciones de crema se probó por estabilidad química por 3 meses a 40°C/75 % RH. Los resultados muestran una estabilidad satisfactoria del calcipotriol bajo las condiciones de prueba.

#### Ejemplo 4

Ungüento no-acuoso que contiene nanocristales de monohidrato de calcipotriol

La nanosuspensión de monohidrato de calcipotriol preparada como se describió en el Ejemplo 1 se sometió a liofilización durante la noche. El liofilizado, sustancialmente nanocristales anhidros se usaron para preparar un ungüento al dispersar los nanocristales en parafina líquida y añadir parafina blanda blanca a la dispersión.

La composición del ungüento no-acuoso aparece en la Tabla 3 más abajo.

Tabla 3

Ingrediente	Contenido
Nanocristales de monohidrato de calcipotriol	50 µg
Parafina, líquida	50 mg
Parafina, blanda blanca	750 mg
Poloxámero 188	0.05 mg

El ungüento no-acuoso se probó por estabilidad por 3 meses a 40 °C/75 % RH. Los resultados muestran una estabilidad satisfactoria del calcipotriol bajo las condiciones de prueba.

## Ejemplo 6

Liberación a partir de las composiciones de nanosuspensión en comparación al ungüento Daivonex<sup>®</sup>

- 5 La liberación *in vitro* del calcipotriol a partir de las composiciones descritas en los Ejemplos 1 y 2 se determinó en celdas de difusión de Plexiglass por medio del uso de una membrana Spectra/Porv 6 para separar las cámaras receptora y donadora (n=6 células por lote). Se determinó la liberación de calcipotriol dentro de la fase recipiente que consiste de 0.04 M amortiguador fosfato isotónico, pH 7.4, e isopropanol (70:30 v/v). Las muestras se analizaron por HPLC/UV.
- 10 Los resultados que aparecen en la Figura 3 más abajo, muestran que la velocidad de liberación del calcipotriol a partir de los presentes ungüentos y crema de nanosuspensión es significativamente más alta que la velocidad de liberación a partir del ungüento Daivonex<sup>®</sup>.
- 15 Los resultados que se muestran en la Figura 3 muestran que la velocidad de liberación es significativamente más alta a partir de las formulaciones de nanosuspensión que a partir del ungüento Daivonex<sup>®</sup>.

## Ejemplo 7

*Estudio in vitro* de penetración en la piel.

- 20 Para investigar la penetración y permeación en la piel del calcipotriol de composiciones de la invención, se llevó a cabo un experimento de difusión en la piel. Se usó en el estudio piel de grosor completo de orejas de cerdo. Las orejas se mantuvieron congeladas a -18 °C antes del uso. En el día anterior al experimento las orejas se colocaron en un refrigerador (5±3 °C) para una descongelación lenta. En el día del experimento, los pelos se eliminaron por medio del uso de un cortador de pelo veterinario. La piel se limpió de grasa subcutánea por medio del uso de un bisturí y dos trozos de piel se cortaron de cada oreja y se montaron en celdas de difusión de Franz en un orden equilibrado.
- 25

- 30 Celdas de difusión tipo de Franz estáticas con un área de difusión disponible de 14 cm<sup>2</sup> y volúmenes de receptor en el intervalo desde 8.6 a 11.1 ml se usaron sustancialmente de la manera descrita por T.J. Franz, "The finite dose technique as a valid *in vitro* model for the study of percutaneous absorption in man", en *Current Problems in Dermatology*, 1978, J.W.H. Mall (Ed.), Karger, Basel, págs. 58-68. El volumen específico se midió y registró para cada celda. Se colocó una barra magnética en el compartimento receptor de cada celda. Después de montar la piel, se llenó cada cámara receptora con solución salina fisiológica (35 °C) para la hidratación de la piel. Las celdas se colocaron en un baño de agua controlado termalmente que se colocó en un agitador magnético a 400 rpm. El agua circulante en el baño de agua se mantuvo a 35±1 C lo que dio como resultado una temperatura de aproximadamente 32 °C en la superficie de la piel. Después de una hora la solución salina se reemplazó por el medio receptor, 0.04 M amortiguador fosfato isotónico, pH 7.4 (35 °C), que contenía 4 % albúmina de suero bovino. Las condiciones de inmersión se mantuvieron en todos los momentos durante el período del estudio, es decir la concentración de los compuestos activos en el medio receptor estaba por debajo del 10 % de la solubilidad de los compuestos en el medio.
- 35
- 40

- La permeación *in vitro* de la piel para cada composición de prueba se probó en 6 réplicas (es decir n = 6). Cada composición de prueba se aplicó a la membrana de la piel a las 0 horas en una dosis prevista de 4 mg/cm<sup>2</sup>. Una espátula de cristal se usó para la aplicación, y la cantidad residual de la composición se determinó a fin de dar la cantidad de la composición realmente aplicada sobre la piel.
- 45

- Se permitió que el experimento de penetración en la piel procediera por 21 horas. Las muestras se recogieron a partir de los siguientes compartimentos:

- 50 El estrato córneo se recogió por decapado por cinta 10 veces por medio del uso de cinta D-Squame<sup>®</sup> (diámetro 22 mm, CuDerm Corp., Dallas, Texas, USA). Cada tira de cinta se aplica al área de prueba por medio del uso de una presión estándar por 5 segundos y se retiran del área de prueba en un movimiento suave, continuo. Para cada tira repetida, la dirección de arrancado varió. La epidermis y la dermis viables se muestrearon a partir de la piel de forma similar.

- Las muestras (1 ml) del fluido receptor restante en la celda de difusión se recogieron y se analizaron.
- 55

La concentración de calcipotriol en las muestras se determinó por espectrometría de masa LC.

Los resultados aparecen en la Figura 4a que muestra la penetración dentro de la piel viable a partir de la Composición A y C

por medio del uso de portadores de parafina diferentes, y la Figura 4b que muestra que la penetración dentro de la piel viable a partir de los ungüentos de nanosuspensión es comparable a la del ungüento Daivonex<sup>®</sup>, mientras el flujo es significativamente más bajo, lo que resulta en menos exposición sistémica al calcipotriol.

5 Resultados adicionales aparecen en la Figura 5 que es un gráfico que muestra que la penetración de calcipotriol de la Composición G dentro de la piel viable es significativamente más alta de la crema de nanosuspensión que de la crema Daivonex<sup>®</sup>.

10 Ejemplo 8

Actividad biológica de las composiciones

15 Como se muestra en la Figura 6 más abajo, la catelicidina es un péptido antimicrobiano expresado en los queratinocitos humanos. La expresión de catelicidina se induce fuertemente en infecciones de la piel o rotura de la barrera de la piel. En la soriasis, el nivel de catelicidina aumenta en la piel lesionada de los pacientes de soriasis. Se encontró que la expresión del gen que codifica la catelicidina se puede inducir por la vitamina D<sub>3</sub> o análogos de la vitamina D tales como el calcipotriol (ver TT Wang y otros, J. Immunol. 173(5), 2004, págs. 2909-2912; J Schaubert y otros, Immunology 118(4), 2006, págs. 509-519; Schaubert y Gallo, J. Allergy Clin Immunol 122, 2008, págs. 261-266; M. Peric y otros, PloS One 4(7), 22 Julio 2009, e6340) a través de la unión al receptor de vitamina D. Estos descubrimientos se usaron para desarrollar un ensayo en el que la captación y la actividad biológica del calcipotriol en los queratinocitos humanos a partir de las composiciones probadas se determinó por la medición del nivel de inducción del gen que codifica la catelicidina.

20 En el ensayo, una crema de nanocrisales de monohidrato de calcipotriol preparada como se describió en el Ejemplo 3 anteriormente (Composición G) se aplicó tópicamente por triplicado sobre la epidermis humana reconstruida que consistía de queratinocitos humanos normales cultivados por 12 días en filtros de policarbonato de 0.5 cm<sup>2</sup> (disponibles de SkinEthic<sup>®</sup> Laboratories, Niza, Francia) en una cantidad de 10 µl. El tejido se trató por uno o dos días en presencia de las citocinas IL-17A (20 ng/ml), IL-22 (20 ng/ml) y TNF-α (5 ng/ml) seguido por la separación de la epidermis del filtro de policarbonato y la congelación rápida en nitrógeno líquido. El ARN se extrajo de las células y el ADNc se sintetizó por procedimientos convencionales. Se realizó después el PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) por medio del uso de los siguientes ensayos de Applied Biosystems: CAMP Hs0018038\_m1 y GAPDH Hs99999905\_m1. Los niveles de expresión de catelicidina se normalizaron a GAPDH y se hizo una cuantificación relativa por comparación con el ungüento Daivonex<sup>®</sup> y la crema.

Los resultados aparecen en la Tabla 4 más abajo.

Tabla 4

Composición	Activación <sup>1</sup> Día 1	Activación <sup>1</sup> Día 2
ungüento Daivonex <sup>®</sup>	2.3	4.1
Crema Daivonex <sup>®</sup>	1.0	2.2
Composición G	2.5	4.7

<sup>1</sup> veces de activación en relación a la crema Daivonex<sup>®</sup> día 1

45 Los resultados presentados en la Tabla 4 muestran que la aplicación de la Composición G resultó en una activación del gen objetivo similar a aquella obtenida con el ungüento Daivonex<sup>®</sup> mientras la activación del gen objetivo fue aproximadamente dos veces aquella de la crema Daivonex<sup>®</sup>. Así, los resultados indican una eficacia que es tan buena como la obtenida para el ungüento Daivonex<sup>®</sup> obtenida con una formulación que no contiene propilenglicol y que tiene propiedades cosméticas más favorables.

50 Composiciones A, C y D preparadas como se describe en el Ejemplo 2 anteriormente se aplicó tópicamente por triplicado sobre la epidermis humana reconstruida que consistía de queratinocitos humanos normales cultivados por 12 días en filtros de policarbonato de 0.5 cm<sup>2</sup> (disponibles de SkinEthic<sup>®</sup> Laboratories, Niza, Francia) en una cantidad de 10 µl. El tejido se trató por dos días seguido por la separación de la epidermis del filtro de policarbonato y se congeló en nitrógeno líquido. El ARN se extrajo de las células y el ADNc se sintetizó por procedimientos convencionales. La qPCR después se realizó por medio del uso de los siguientes ensayos de Applied Biosystems: CAMP Hs0018038\_m1 y GAPDH Hs99999905\_m1. Los niveles de expresión de catelicidina se normalizaron a GAPDH y se hizo una cuantificación relativa por comparación con el ungüento Daivonex<sup>®</sup>.

Los resultados aparecen en la Tabla 5 más abajo.

Tabla 5

Composición	Veces de activación <sup>1</sup>
ungüento Daivonex <sup>®</sup>	1.0
composición A	2.6/2.1
composición C	1.3/4.1
composición D	4.1/6.8
<sup>1</sup> relativo al ungüento Daivonex <sup>®</sup>	

Los resultados presentados en la Tabla 5 muestran que las composiciones de la invención resultan en una mayor activación del gen objetivo, es decir tienen una actividad biológica más alta que la del ungüento comercial.

Ejemplo 5

Estudios de tolerancia local en puercos enanos.

La tolerabilidad local de las composiciones A, C y D del Ejemplo 2 se ensayó cuando se administró diariamente por aplicación dérmica a puercos enanos por 4 semanas. El ungüento Daivonex<sup>®</sup> se usó para comparación. Cada día los animales se expusieron a los artículos de prueba por 8 horas.

El estudio se condujo en 10 puercos enanos hembras Göttingen SPF. Cada animal tuvo 6 sitios de aplicación y recibió un volumen de 250 mg de la formulación de prueba por sitio de aplicación. Los signos clínicos se registraron diariamente y las reacciones de la piel en los sitios de aplicación se marcaron una vez al día antes de empezar la dosificación y, además, en el día de la necropsia en relación al eritema y al edema. El consumo de alimentos se registró diariamente y el peso corporal semanalmente. Al final del período de tratamiento se realizó una necropsia general en todos los animales y se recogieron muestras de piel para examen histopatológico.

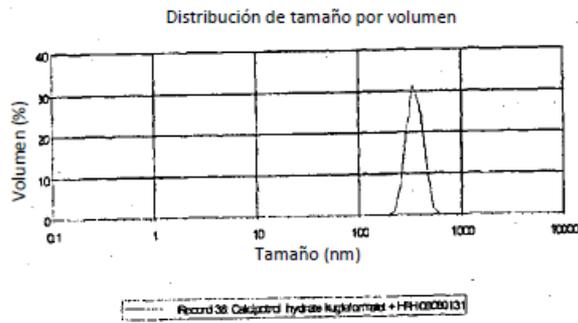
Los resultados muestran que no se observaron signos clínicos adversos relacionados con el tratamiento durante el estudio aunque se observaron reacciones en la piel de grado 1-2 (eritema). Excepto para la Composición A, los eritemas fueron menos pronunciados que los observados para el ungüento Daivonex<sup>®</sup>. Los resultados implican que las composiciones de la invención pueden tolerarse mejor en pacientes humanos que el ungüento Daivonex<sup>®</sup>.

## Reivindicaciones

- 5
1. Una suspensión de monohidrato de calcipotriol en forma de nanocristales de una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm determinado por dispersión dinámica de luz, la suspensión comprende además una fase acuosa que incluye un surfactante no iónico, polimérico en una cantidad suficiente para prevenir la formación de agregados y/o el crecimiento de cristales de los nanocristales de monohidrato de calcipotriol.
- 10
2. La suspensión de conformidad con la reivindicación 1, en donde el surfactante es seleccionado del grupo que consiste en surfactantes de poloxámero o polisorbato, y alquil éter de polioxietileno de C<sub>6-24</sub>.
3. La suspensión de conformidad con la reivindicación 2, en donde el poloxámero es seleccionado del grupo que consiste en poloxámero 124, poloxámero 188, poloxámero 237, poloxámero 338 y poloxámero 407.
- 15
4. La suspensión de conformidad con la reivindicación 3, en donde el surfactante es poloxámero 188.
5. La suspensión de conformidad con la reivindicación 2, en donde el polisorbato es seleccionado del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 61, polisorbato 80 y polisorbato 81.
- 20
6. La suspensión de conformidad con la reivindicación 2, en donde el alquil éter de polioxietileno de C<sub>6-24</sub> es cetomacrogol 1000.
7. La suspensión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde la cantidad de surfactante en dicha fase acuosa está en el intervalo de aproximadamente 0.6 % a aproximadamente 1.2 % en peso de la suspensión.
- 25
8. La suspensión de conformidad con la reivindicación 1, en donde los nanocristales de monohidrato de calcipotriol tienen un tamaño medio de partícula de 200-350 nm, 350-400 nm o 400-500 nm determinado por dispersión dinámica de luz.
- 30
9. Un proceso para preparar nanocristales de monohidrato de calcipotriol de una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm determinado por dispersión dinámica de luz, el proceso comprende las etapas de
- 35
- (a) disminuir el monohidrato de calcipotriol cristalino en una fase acuosa que comprende surfactante no iónico, polimérico en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % en peso de dicha fase acuosa, lo que resulta en la formación de micropartículas con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 5-20  $\mu\text{m}$  y un tamaño medio de partícula de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ;
- 40
- (b) someter la suspensión de la etapa (a) a un primer ciclo de homogeneización a alta presión a una presión de aproximadamente 300-800 bar por un período de tiempo suficiente para obtener aproximadamente 15-40 % de cristales de monohidrato de calcipotriol con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm;
- 45
- (c) someter la suspensión de la etapa (b) a un segundo ciclo de homogeneización a alta presión a una presión de aproximadamente 800-1200 bar un período de tiempo suficiente para obtener aproximadamente 40-80 % de cristales de monohidrato de calcipotriol con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm;
- 50
- (d) someter la suspensión de la etapa (c) a un tercer ciclo de homogeneización a alta presión a una presión de aproximadamente 1200-1700 bar un período de tiempo suficiente para obtener aproximadamente 90 % o más de cristales de monohidrato de calcipotriol con una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 200-600 nm; y
- (e) opcionalmente aislar los nanocristales de monohidrato de calcipotriol resultantes de la fase acuosa.
- 55
10. El proceso de la reivindicación 9, en donde la disminución de la etapa (a) se lleva a cabo mediante molienda de bolas en húmedo por medio del uso de bolas o perlas de un diámetro en el intervalo de 1-4 mm, tal como 1.5-2.5 mm o 2-3 mm.
11. El proceso de la reivindicación 9, en donde el surfactante usado en la etapa (a) es seleccionado del grupo que consiste en surfactantes de poloxámero o polisorbato, y alquil éter de polioxietileno de C<sub>6-24</sub>.

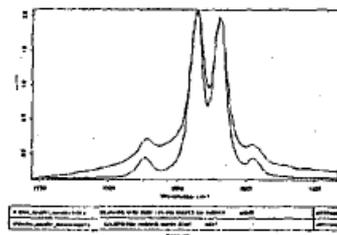
- 5
12. El proceso de la reivindicación 11, en donde el poloxámero es seleccionado del grupo que consiste en poloxámero 124, poloxámero 188, poloxámero 237, poloxámero 338 y poloxámero 407.
13. El proceso de la reivindicación 12, en donde el surfactante es poloxámero 188.
- 10
14. El proceso de la reivindicación 11, en donde el polisorbato es seleccionado del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 61, polisorbato 80 y polisorbato 81.
15. El proceso de la reivindicación 11, en donde el alquil éter de polioxietileno de C<sub>6-24</sub> es cetomacrogol 1000.
16. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 9-15, en donde el surfactante se añade en la etapa (a) en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3 % en peso de la suspensión, en particular aproximadamente 2 % en peso de la suspensión.
- 15
17. El proceso de la reivindicación 9, en donde el primer ciclo de homogeneización a alta presión de la etapa (b) se lleva a cabo a una presión de aproximadamente 500-650 bar.
18. El proceso de la reivindicación 9, en donde el segundo ciclo de homogeneización a alta presión de la etapa (c) se lleva a cabo a una presión de aproximadamente 1000-1100 bar.
- 20
19. El proceso de la reivindicación 9, en donde el tercer ciclo de homogeneización a alta presión de la etapa (d) se lleva a cabo a una presión de aproximadamente 1400-1500 bar.
- 25
20. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 9-19, en donde las etapas de homogeneización a alta presión (b)-(d) se llevan a cabo por medio del uso de un homogeneizador de pistón hueco.
21. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 9-20 que comprende además liofilización o secado por aspersion de los nanocristales de monohidrato de calcipotriol.
- 30
22. Una composición farmacéutica que comprende la suspensión de nanocristales de monohidrato de calcipotriol de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35
23. La composición de conformidad con la reivindicación 22, en donde la cantidad del surfactante no iónico, polimérico está en el intervalo de aproximadamente 0.03-0.06 % en peso de la composición.
- 40
24. Una composición de conformidad con la reivindicación 22, en donde el portador comprende al menos una parafina seleccionada de parafinas que consiste en hidrocarburos con longitudes de cadena de C<sub>5-60</sub>, las longitudes de cadena alcanzan un máximo de C<sub>14-16</sub>, C<sub>18-22</sub>, C<sub>20-22</sub>, C<sub>20-26</sub>, C<sub>28-40</sub> y C<sub>40-44</sub>, o mezclas de estas.
- 45
25. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-24, que además comprende un emulsionante agua en aceite seleccionado de alquil éteres de polioxietileno de C<sub>8-22</sub>, por ejemplo estearil éter de polioxietileno, cetil éter de polioxietileno o lauril éter de polioxietileno.
26. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-25, que además comprende un ingrediente que aumenta la viscosidad lipofílico.
- 50
27. Una composición de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el ingrediente que aumenta la viscosidad es una cera.
28. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-27, que además comprende una cera de silicona o un aceite de silicona volátil.
- 55
29. Una composición de acuerdo con la reivindicación 28, en, donde el aceite de silicona volátil es ciclometicona o dimeticona.
30. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-29, que además comprende un compuesto anti-irritante.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 31. Una composición de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el compuesto anti-irritante es glicerina, sorbitol, sacarosa, sacarina, nicotinamida, mentol o eucaliptol.
  - 32. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-31, que además comprende un compuesto capaz de neutralizar las impurezas ácidas perjudiciales para la estabilidad química del monohidrato de calcipotriol en la composición.
  - 33. Una composición de acuerdo con la reivindicación 32, en donde dicho compuesto es una amina tal como trietanol amina, trometamol, monoetanolamina o dimetanolamina.
  - 34. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-33 que es un ungüento.
  - 35. Una composición de acuerdo con la reivindicación 34 que es un ungüento sustancialmente anhidro.
  - 36. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-33 que es una crema.
  - 37. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-36 que comprende aproximadamente 0.001-0.5 mg/g, preferentemente aproximadamente 0.002-0.25 mg/g, en particular 0.005-0.05 mg/g, de nanocristales de monohidrato de calcipotriol.
  - 38. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-37, que además comprende uno o más ingredientes adicionales terapéuticamente activos.
  - 39. Una composición de acuerdo con la reivindicación 38, en donde tales ingredientes activos adicionales son seleccionados del grupo que consiste de fármacos antiinflamatorios tales como corticosteroides, tal como betametasona y ésteres de este, por ejemplo el éster de valerato o dipropionato, clobetasol o ésteres de este, tal como el propionato, hidrocortisona o ésteres de estos, tal como el acetato; fármacos antiinflamatorios no esteroides tales como naproxeno, indometacina, diclofenaco, ibuprofeno, dexibuprofeno, cetoprofeno, flurbiprofeno, piroxicam, lornoxicam o nabumeton, inhibidores de la fosfodiesterasa 4 o inhibidores de la MAP cinasa p38.
  - 40. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-39 para usar en el tratamiento de una enfermedad o afección dérmica.
  - 41. La composición para usar de conformidad con la reivindicación 40, en donde la enfermedad o afección dérmica es soriasis, sebosoriasis, pustulosis palmoplantar, dermatitis, ictiosis, rosácea o acné.



Distribución de tamaño para la nanosuspensión de calcipotriol preparada

Figura 1



Hidrato de calcipotriol es el tipo de cristal dominante

Figura 2a

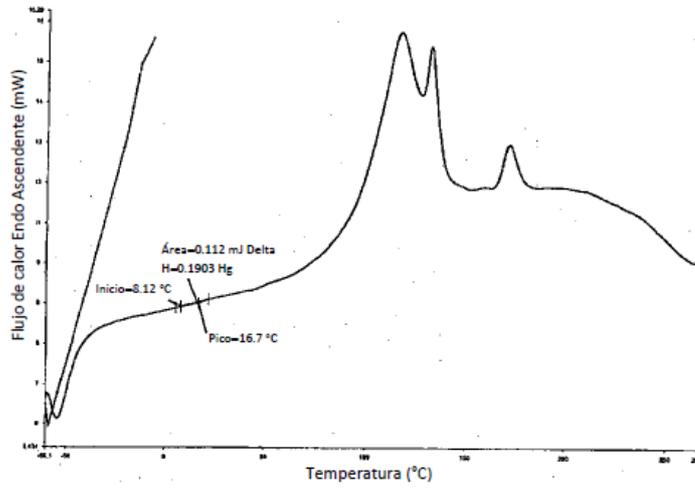


Figura 2b Curva DSC para los nanocristales de monohidrato de calcipotriol

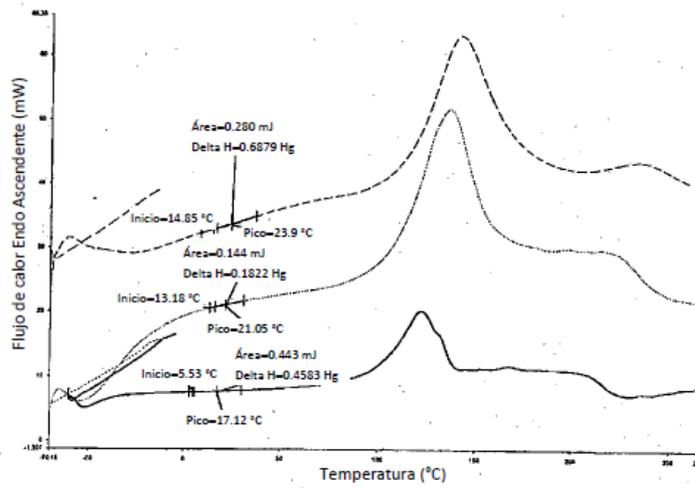


Figura 2c Curva DSC para los nanocristales de monohidrato de calcipotriol

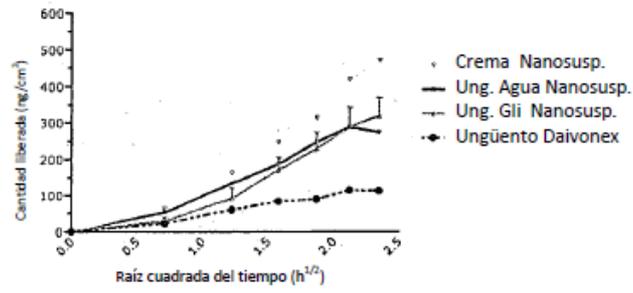


Figura 3

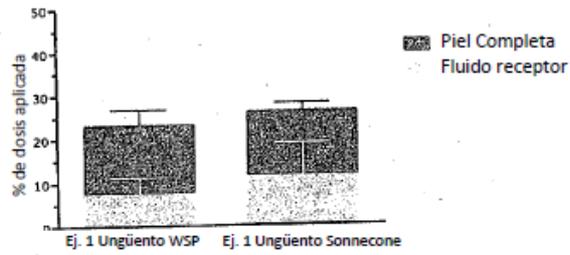


Figura 4a

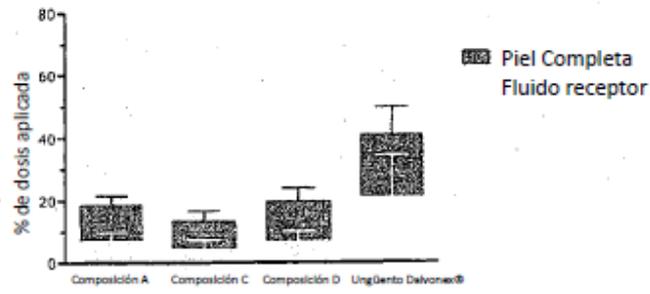


Figura 4b

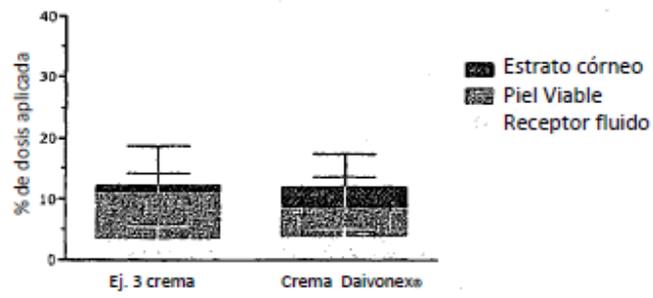


Figura 5

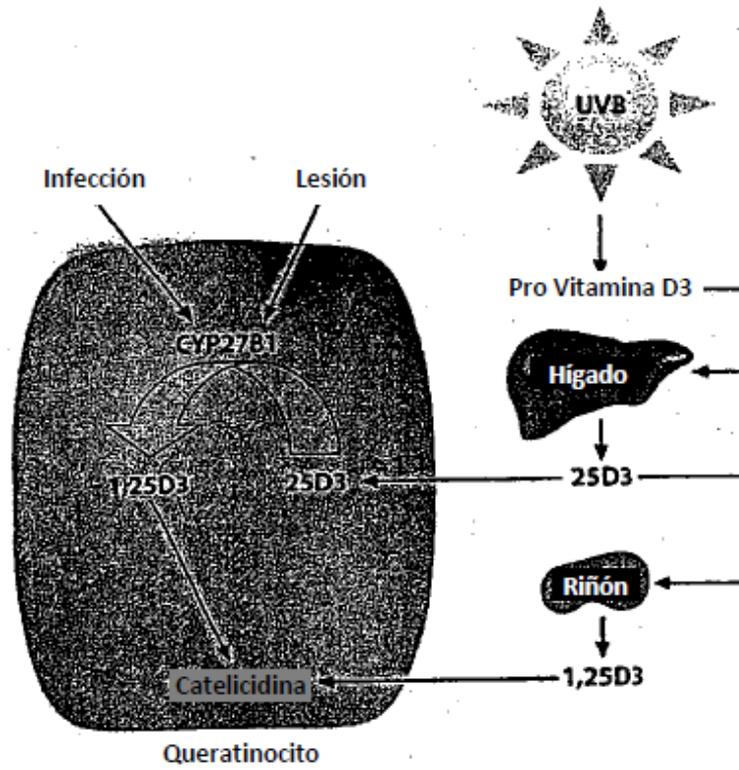


Figura 6