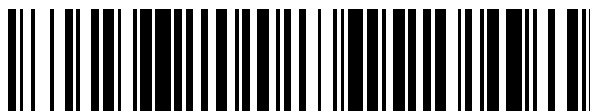


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 410**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/593** (2006.01)

**A61K 31/455** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 9/06** (2006.01)

**A61K 47/34** (2006.01)

**A61P 17/06** (2006.01)

**A61P 17/12** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 47/10** (2006.01)

**A61K 31/59** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2006 E 06728342 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 1879595**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas dérmicas**

30 Prioridad:

**10.05.2005 US 679556 P**

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

**22.12.2014**

73 Titular/es:

**DERMIPSOR LTD (100.0%)**

**P.O. BOX 12**

**12 900 KATZRIN, IL**

72 Inventor/es:

**HAREL, AVIKAM y**

**EVEN-CHEN, ZEEV**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 525 410 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

**Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas dérmicas****5 CAMPO DE LA INVENCION**

10 **[0001]** La presente invención se refiere a composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas dérmicas. Específicamente, la presente invención proporciona una composición tópica que consta de metabolitos de vitamina D, calcipotriol, y nicotinamida, que es particularmente eficaz en el tratamiento de la psoriasis y otras enfermedades y trastornos dérmicos relacionados.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION****15 Trastornos y enfermedades hiperproliferativas de la piel**

**[0002]** Los trastornos hiperproliferativos de la piel se refieren a un conjunto de enfermedades y trastornos caracterizados por ser superiores al nivel normal de proliferación de las células epidérmicas conocidas como queratinocitos, y, por lo general, también a la diferenciación anormal.

20 **[0003]** La patología hiperproliferativa epidérmica puede ser maligna o benigna. Las patologías epidérmicas hiperproliferativas malignas incluyen: carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma de células basales (CCB) y otros tipos de cáncer de piel de tipo no melanoma (CPNM). Ejemplos representativos de patologías hiperproliferativas epidérmicas benignas incluyen psoriasis, verrugas comunes, queratoacantoma, queratosis seborreica, seborrea e ictiosis.

25 **[0004]** La psoriasis es un trastorno de la piel no contagioso que afecta al 2 % de la población mundial. Se estima que 10 millones de estadounidenses y europeos sufren psoriasis y cada año se diagnostican hasta 260.000 nuevos casos. Solo en los EE.UU. al año se producen más de 1.500.000 visitas debido a la psoriasis y los costos anuales del paciente ambulatorio se estiman actualmente alrededor de 2 mil millones de dólares. La psoriasis es causada por factores desconocidos que estimulan la activación de linfocitos T, la proliferación, y la liberación de citocinas que da lugar a la hiperproliferación de queratinocitos. Aunque se desconoce la etiología de la psoriasis, los queratinocitos afectados son responsables de las características típicas de la enfermedad: lesiones bien delimitadas en la piel inflamada cubiertas con escamas plateadas que cubren un 10 % - 15 % de la superficie corporal. La psoriasis afecta principalmente a adultos y puede manifestarse en diferentes variaciones y grados de severidad.

35 **[0005]** La estrategia principal para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas de la piel, incluyendo la psoriasis, es evitar la excesiva división de queratinocitos y estimular la diferenciación celular.

40 **[0006]** En la actualidad existen tres modalidades de tratamiento para la psoriasis:

- 45
- 1) Administración tópica de crema o ungüento terapéutico para el tratamiento de los casos leves y moderados;
  - 2) Fototerapia (UVA o UVB) utilizada solo o en combinación con la medicación o el tratamiento tópico, requiere repetidas visitas a la clínica y expone al paciente a peligros concomitantes de radiación;
  - 3) Tratamiento sistémico, dependiendo de la terapia inmunosupresora, se limita a los casos más graves debido a los efectos secundarios graves.

**Vitamina D y enfermedad hiperproliferativa de la piel**

50 **[0007]** La vitamina D es una prohormona con varios metabolitos activos que actúan como hormonas. En la piel, la previtamina D<sub>3</sub> se sintetiza fotoquímicamente a partir de 7 – dehidrocolesterol y se isomeriza lentamente en la vitamina D<sub>3</sub> que se elimina por la proteína de unión a la vitamina D. En el hígado, la vitamina D<sub>3</sub> se convierte a 25 (OH) D<sub>3</sub>, la forma circulante principal que pasa a través de la circulación enterohepática y se reabsorbe en el intestino. En los riñones, se hidroxila además a la forma metabólicamente más activa, 1α, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1α,25 - dihidroxicolecalciferol, calcitriol, hormona de la vitamina D).

55 **[0008]** La evidencia experimental ha demostrado que la vitamina D funciona como un agente antiproliferativo y estimula la diferenciación terminal de los queratinocitos. En las lesiones psoriásicas, los queratinocitos epidérmicos exhiben hiperproliferación y diferenciación deteriorada provocada por la inflamación. Por tanto, la vitamina D y ciertos análogos son eficaces en el tratamiento de la psoriasis vulgaris (revisado en DeLuca 1988; Lehmann et al., 2004). La administración sistémica de estos compuestos está limitada por su toxicidad y efectos adversos en el metabolismo del calcio, por tanto se prefieren preparaciones tópicas.

60 **[0009]** El calcipotriol (calcipotriene), un derivado de la vitamina D<sub>3</sub> se comercializa en los Estados Unidos como un antipsoriásico tópico con el nombre comercial Dovonex® (EE.UU.) o Daivonex® (Europa). El calcipotriol es tan potente como el calcitriol de origen natural en la regulación de la proliferación celular pero tiene la ventaja de ser

mucho menos activo en su efecto sobre el metabolismo del calcio. A pesar de ello, el calcipotriol es solo parcialmente eficaz en el tratamiento de lesiones psoriásicas.

5 **[0010]** La técnica proporciona algunos ejemplos de análogos de vitamina D, derivados y composiciones que comprenden los mismos.

10 **[0011]** Los análogos de vitamina D se describen en la Patente de EE.UU. con N° 4.851.401 (análogos de ciclopentano - vitamina D), Patente de EE.UU. con N° 5.120.722 (derivados de trihidroxicalciferol), Patente de EE.UU. con N° 5.446.035 (vitamina D sustituida con 20 - metil), Patente de EE.UU. con N° 5.411.949 (derivados de 23 - oxa), Patente de EE.UU. con N° 5.237.110 (compuestos de 19 - nor - vitamina D), Patente de EE.UU. con N° 4.857.518 (derivados hidroxilados de 24 - homo - vitamina D). Los análogos de vitamina D adicionales se enseñan en las Patentes de EE.UU. con N° 4.804.502; 4.866.048; 5.145.846; 5.374.629; 5.403.940; 5.446.034; y 5.447.924.

15 **[0012]** La Patente de EE.UU. con N° 5.037.816 se dirige a un método de tratamiento de la psoriasis que comprende administrar por vía tópica una cantidad eficaz de un compuesto de vitamina D capaz de estimular la diferenciación de células tumorales cultivadas o fibroblastos o queratinocitos de humanos o roedores normales *in vitro*.

20 **[0013]** La Patente de EE.UU. con N° 6.552.009 describe una composición que comprende un análogo de vitamina D y un derivado de retinoides útil en el tratamiento de trastornos caracterizado por la proliferación celular y / o diferenciación celular anormal. En ciertas realizaciones preferentes, el análogo de vitamina D se selecciona a partir de calcitriol y calcipotriol.

25 **[0014]** La Patente de EE.UU. con N° 6.753.013 describe una composición farmacéutica para uso dérmico que comprende una combinación de análogo de vitamina D y un corticosteroide, la composición alivia los inconvenientes de un régimen de dos componentes para el tratamiento de la psoriasis y otras enfermedades inflamatorias de la piel.

#### Nicotinamida

30 **[0015]** La nicotinamida (NA, niacinamida), un derivado de la vitamina B<sub>3</sub> y un precursor de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótida (NAD), muestra múltiples funciones en el metabolismo celular. Se ha demostrado que la NA induce la diferenciación de las células productoras de insulina (Otonkoski et al, 1993) y la protección de las células beta pancreáticas de los agentes genotóxicos (Pipeleers and Van de Winkel, 1986). La Patente de EE.UU. con N° 6.248.763 se refiere a composiciones tópicas específicas para el tratamiento de las afecciones de la piel, por ejemplo, acné y psoriasis, que comprenden un 0,01 % - 1% de nicotinato metilo como ingrediente activo.

35 **[0016]** Algunos inventores de la invención han informado recientemente sobre los efectos sinérgicos de la NA y los metabolitos de vitamina D en la diferenciación y proliferación de las células epidérmicas humanas.

40 **[0017]** Las publicaciones de Solicitud de Patentes Internacionales WO 01 / 51051 y WO 2004 / 006887 de algunos de los presentes inventores se dirigen a composiciones y métodos de tratamiento de una patología hiperproliferativa epidérmica benigna o maligna que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente seleccionado entre nicotinamida y / o adenosina difosfato ribosa cíclica (ADPRc), y análogos de las mismas. Las solicitudes también describen la combinación del metabolito de vitamina D<sub>3</sub> (1 $\alpha$  25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) y NA y su efecto sinérgico en la diferenciación y proliferación de las células epidérmicas humanas. La vitamina D<sub>3</sub> y los análogos de la vitamina D<sub>3</sub> son conocidos por poseer propiedades antiproliferativas y prodiferenciativas y, por tanto, son eficaces en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos de la piel, por ejemplo, psoriasis vulgaris. Algunos de los inventores de la presente invención han demostrado el efecto sinérgico de la vitamina D<sub>3</sub> con la nicotinamida que inhibe además la proliferación de queratinocitos. A pesar de que se ha demostrado un efecto inhibitorio sinérgico de la vitamina D<sub>3</sub> y la nicotinamida en queratinocitos *in vitro*, nunca se ha demostrado la optimización de los dos componentes en una composición farmacéutica.

50 **[0018]** La Patente de EE.UU. 2004 / 0138184 describe un método de cristalización para reducir el nivel de impurezas en el derivado de vitamina D de calcipotriene (= calcipotriol). Entre otras, las bases solubles en agua tales como PEG <M> ~ 400 a 5000 se mencionan como base para cremas, ungüentos y lociones.

55 **[0019]** El documento WO 00 / 64450 se refiere a una composición farmacéutica para uso dérmico, por ejemplo para el tratamiento de la psoriasis, que comprende un análogo de vitamina D y al menos un corticosteroide.

60 **[0020]** El documento WO 2004 / 006887 resalta composiciones y métodos de tratamiento de trastornos de la piel, entre otros, psoriasis. D3 enseña una combinación de nicotinamida y adenosina difosfato ribosa cíclica (ADPRc) que se muestra para inhibir la proliferación de células epidérmicas.

65 **[0021]** El documento WO 01 / 51051 describe composiciones farmacéuticas de tratamiento de enfermedades hiperproliferativas de la epidermis, tales como psoriasis, que comprenden nicotinamida o adenosina difosfato ribosa cíclica (ADPRc) o combinaciones de las mismas, y además, el derivado de la vitamina D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

**[0022]** La técnica no ha enseñado ni sugerido formulaciones específicas que constan esencialmente de un análogo de vitamina D<sub>3</sub> y un análogo de nicotinamida para la prevención, tratamiento o atenuación de trastornos asociados con enfermedades hiperproliferativas de la piel.

5 **[0023]** Sigue existiendo una necesidad médica aún no cubierta de composiciones y métodos útiles en la prevención y tratamiento de síntomas asociados con la enfermedad hiperproliferativa, y en particular, psoriasis.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

10 **[0024]** La presente invención proporciona composiciones de aplicación tópica que constan esencialmente de calcipotriol; nicotinamida; y un portador dermatológicamente aceptable basado en polietilenglicol, que comprende PEG – 4000, PEG – 400 y alcohol estearílico polioxietilado (Steareth – 20). En particular, los inventores de la presente invención han descubierto inesperadamente que el calcipotriol, cuando se proporciona en combinación con la nicotinamida, produce un efecto sinérgico en la reducción de los síntomas de la enfermedad hiperproliferativa en un intervalo específico de concentración. En consecuencia, la presente invención proporciona composiciones terapéuticas altamente eficaces que constan esencialmente de calcipotriol y nicotinamida en intervalos de concentración definidos.

20 **[0025]** Además, la invención describe que, en contraste con las formulaciones conocidas que comprenden calcipotriol, el calcipotriol en la presente composición no penetra significativamente la piel, impidiendo de ese modo la exposición sistémica al fármaco y a los efectos secundarios concomitantes. La composición de la presente invención es, por tanto, inesperadamente útil en el tratamiento inmediato de la enfermedad hiperproliferativa, así como en la terapia de mantenimiento a largo plazo.

25 **[0026]** Las composiciones de la presente invención han sido formuladas para ser altamente eficaces y seguras en la inhibición de la proliferación celular, en particular de las células de la piel, y más particularmente de los queratinocitos y son, por tanto, útiles en el tratamiento de la psoriasis y otras enfermedades hiperproliferativas de la piel.

30 **[0027]** En algunas realizaciones, la composición se proporciona en una forma seleccionada entre una solución acuosa, una solución no acuosa, una loción, una crema, un gel, un ungüento, espuma, mousse, un aerosol, una emulsión, y una microemulsión.

35 **[0028]** En algunas realizaciones, la composición se proporciona en forma de pomada dérmica, crema, loción o gel.

**[0029]** El excipiente dermatológico comprende polietilenglicol (PEG) seleccionado entre PEG – 400, PEG – 4000 y una mezcla de los dos. Preferentemente, la composición comprende una mezcla de PEG – 400 y PEG – 4000.

40 **[0030]** En algunas realizaciones, el portador comprende además el surfactante de alcohol estearílico polioxietilado (Steareth 20). En realizaciones preferentes, el portador dermatológico comprende PEG – 400, PEG – 4000 y Steareth 20. En algunas realizaciones, la composición de la presente invención consta esencialmente de calcipotriol, nicotinamida, PEG – 4000, PEG – 400 y Steareth – 20.

45 **[0031]** En realizaciones específicas, la composición dérmica tiene la siguiente formulación:

10 µg / g a 100 µg / g de calcipotriol;  
0,5 a 25 mg / g de nicotinamida;  
70 % al 80 % (p / p) de PEG – 400;  
15 % al 25 % (p / p) de PEG – 4000;  
50 1 % al 5 % (p / p) de Steareth – 20;  
0,1 al 1% (p / p) de vitamina E.

55 **[0032]** En algunas realizaciones, el calcipotriol se proporciona en una concentración entre 20 µg / g y 70 µg / g. En realizaciones específicas, el calcipotriol se proporciona en una concentración de 50 µg / g.

**[0033]** En otras realizaciones, el calcipotriol se proporciona en una concentración entre 10 µg / g y 50 µg / g, preferentemente en una concentración entre 15 µg / g y 35 µg / g. En algunas realizaciones, el calcipotriol se proporciona en una concentración de aproximadamente 30 µg / g.

60 **[0034]** En algunas realizaciones, la nicotinamida se proporciona en una concentración entre 0,5 mg / g y 25 mg / g. En ciertas realizaciones, la nicotinamida se proporciona en una concentración entre 1 mg / g y 20 mg / g. En otras realizaciones, la nicotinamida se proporciona en una concentración entre 2 mg / g y 10 mg / g. En realizaciones específicas, la nicotinamida se proporciona en una concentración final de 2,1 mg / g.

65 **[0035]** En algunas realizaciones, la enfermedad hiperproliferativa de la piel es una enfermedad hiperproliferativa benigna seleccionada entre psoriasis, queratosis solar (actínica), ictiosis, enfermedad de Grover (dermatosis

acantolítica transitoria), verrugas comunes, queratoacantoma, queratosis seborreica, esclerodermia, y seborrea.

- 5 **[0036]** En otras realizaciones, la enfermedad hiperproliferativa de la piel es una enfermedad hiperproliferativa maligna. Ejemplos representativos de patologías hiperproliferativas epidérmicas malignas incluyen, sin limitación, carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma de células basales (CCB) y otros tipos de cáncer de piel de tipo no melanoma (CPNM).
- 10 **[0037]** En realizaciones específicas, la enfermedad hiperproliferativa es psoriasis.
- 10 **[0038]** La presente composición puede utilizarse para preparar un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel que comprende la etapa de: administrar por vía tópica a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición según la presente invención.
- 15 **[0039]** El método de prevención o tratamiento comprende preferentemente la administración tópica hasta aproximadamente cuatro veces al día de una dosificación terapéutica suficiente de dicha composición. En realizaciones específicas, la composición se administra una o dos veces al día. En algunas realizaciones, la composición se aplica dos veces al día en intervalos de 12 horas. En otras realizaciones, la composición se administra una vez al día.
- 20 **[0040]** En algunas realizaciones, el método de tratamiento incluye dos periodos de tratamiento: un tratamiento inicial, y un tratamiento de mantenimiento. En primer lugar, en el tratamiento inicial, un paciente se administra una dosis inicial de la composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración entre 10 µg / g y 100 µg / g; nicotinamida en una concentración de 0,1 mg / g a 50 mg / g; y un excipiente o portador dermatológicamente aceptable para un periodo inicial y posteriormente, el paciente se administra una dosis menor de mantenimiento de una composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración entre 10 µg / g y 50 µg / g; nicotinamida en una concentración entre 0,1 mg / g y 50 mg / g; y un excipiente o portador dermatológicamente aceptable.
- 25 **[0041]** Para la dosis de mantenimiento, el calcipotriol se proporciona en una concentración entre 10 µg / g y 50 µg / g. En otras realizaciones, el calcipotriol se proporciona en una concentración entre 15 µg / g y 35 µg / g. En realizaciones específicas, el calcipotriol se proporciona en una concentración de 30 µg / g.
- 30 **[0042]** En algunas realizaciones, la nicotinamida se proporciona en una concentración entre 0,5 mg / g y 25 mg / g. En ciertas realizaciones, la nicotinamida se proporciona en una concentración entre 1 mg / g y 20 mg / g. En otras realizaciones, la nicotinamida se proporciona en una concentración entre 2 mg / g y 10 mg / gm, preferentemente en una concentración de 2,1 mg / g.
- 35 **[0043]** Según ciertas realizaciones preferentes, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para preparar un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel que comprende las etapas de:
- 40 administrar por vía tópica a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración de 10 µg / g y 100 µg / g; nicotinamida en una concentración entre 0,5 mg / g y 25 mg / g; y el excipiente o portador dermatológicamente aceptable para un periodo inicial de tiempo para reducir los síntomas de la enfermedad hiperproliferativa; y
- 45 administrar por vía tópica a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración de 10 µg / g y 50 µg / g; nicotinamida en una concentración entre 0,5 mg / g y 25 mg / g; y el excipiente o portador dermatológicamente aceptable para un segundo periodo de tiempo.
- 50 **[0044]** En una realización, el periodo inicial de tiempo es de 4 semanas a 24 semanas, preferentemente de 4 semanas a 16 semanas. En ciertas realizaciones preferentes, el periodo de tratamiento inicial es de 6 semanas a 12 semanas, preferentemente de 8 semanas. El segundo periodo de tiempo es de 8 semanas a 52 semanas, preferentemente de 12 semanas a 26 semanas.
- 55 **[0045]** En ciertas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En realizaciones específicas, el sujeto es un sujeto humano.
- 60 **[0046]** En otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición que comprende calcipotriol, en la que el calcipotriol no penetra de manera significativa en la piel. En ciertas realizaciones, menos del 10 % de calcipotriol penetra en la piel, preferentemente menos del 5 %. En algunas realizaciones, menos del 3 % y preferentemente menos del 1 % de calcipotriol penetra en la piel. En algunas realizaciones, la composición consta esencialmente de calcipotriol, al menos un PEG y un surfactante. En realizaciones específicas, la composición consta esencialmente de calcipotriol, PEG – 400, PEG – 4000 y Steareth – 20.
- 65

**[0047]** La presente invención proporciona además el uso de una composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración de 10 µg / g (microgramos por gramo) a 100 µg / g; y nicotinamida en una concentración entre 0,1 mg / g y 50 mg / g; para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento tópico de la enfermedad hiperproliferativa.

5 **[0048]** Las composiciones de la presente invención pueden envasarse en un recipiente adecuado de dosificación de dicha composición y está provisto con instrucciones de uso.

10 **[0049]** Por tanto, según aspectos adicionales, se proporcionan kits farmacéuticos que comprenden una composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración de 10 µg / g a 100 µg / g; nicotinamida en una concentración entre 0,1 mg / g y 50 mg / g; el recipiente o portador dermatológicamente aceptable como se ha especificado anteriormente; e instrucciones de uso.

15 **[0050]** El kit puede comprender una composición tópica que consiste esencialmente de calcipotriol en una concentración de 50 µg / g; nicotinamida en una concentración de 2,1 mg / g; el excipiente o portador dermatológicamente aceptable; e instrucciones de uso.

20 **[0051]** El kit puede comprender además una composición tópica que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración entre 10 µg / g y 50 µg / g; nicotinamida en una concentración de 2,1 mg / g; y el excipiente o portador dermatológicamente aceptable; e instrucciones de uso. Las concentraciones preferentes de calcipotriol oscilan entre 15 µg / g y 35 µg / g, preferentemente 30 µg / g.

25 **[0052]** Estas y otras realizaciones de la presente invención resultarán evidentes junto con las siguientes figuras, descripción y reivindicaciones.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**[0053]**

30 Figuras 1A – 1B: la Figura 1A es un gráfico que muestra el nivel de ortoqueratosis inducido por las diferentes formulaciones estables de ungüento. La Figura 1B es un gráfico que muestra la actividad del fármaco de las formulaciones estables de ungüento. Las formulaciones comprenden 50 µg / g de calcipotriol y 0,61 mg / g de NA.

35 Figuras 2A – 2B: la Figura 2A es un gráfico que muestra la optimización de la concentración de NA en la formulación del ungüento como se determinó por un incremento de ortoqueratosis. La Figura 2B es un gráfico que muestra la actividad del fármaco de las formulaciones con 50 µg / g de calcipotriol y concentraciones diferentes de NA derivadas de la Figura 2A.

**La Figura 3 muestra el efecto sinérgico de CP y NA como un aumento de ortoqueratosis.**

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 **[0054]** La presente invención se dirige a composiciones farmacéuticas, kits y métodos que pueden utilizarse en el tratamiento de trastornos de la piel relacionados con la hiperproliferación de las células epidérmicas. Tal y como se ha descrito anteriormente, la vitamina D<sub>3</sub> y sus análogos son conocidos como agentes útiles en el tratamiento de la psoriasis y otras enfermedades inflamatorias de la piel (Morimoto et al., 1986). La nicotinamida y sus análogos han mostrado ser efectivos en la inhibición de la hiperproliferación de queratinocitos e inducción de la diferenciación celular. La presente invención proporciona composiciones dérmicas que consisten esencialmente en un derivado de la vitamina D, calcipotriol, y nicotinamida que es altamente eficaz en el tratamiento de enfermedades y trastornos hiperproliferativos de la piel.

50 **[0055]** Una composición que combina calcipotriol y NA proporciona sinergia en forma de beneficio adicional al paciente aparte del valor terapéutico directo de las sustancias activas individuales.

55 **[0056]** El tratamiento médico satisfactorio de los trastornos de la piel, tal como psoriasis, puede alcanzarse en un corto periodo de tiempo utilizando la composición según la invención. Además, la composición de la presente invención no contiene esteroides, se evita así los efectos secundarios asociados a esta clase de fármacos.

60 **[0057]** Las composiciones de la presente invención proporcionan una formulación tópica eficaz y segura para tratar las enfermedades hiperproliferativas y ofrecen las siguientes ventajas sobre las composiciones de calcipotriol disponibles comercialmente:

- 65
- a) Doble efecto antiproliferativo y efecto que promueve la diferenciación en células epidérmicas;
  - b) Efecto terapéutico sinérgico del calcipotriol y nicotinamida que intensifica el potencial del efecto terapéutico de la composición de trastornos hiperproliferativos malignos y benignos;
  - c) Efecto antioxidante;
  - d) Formulación no tóxica aprobada para indicaciones tópicos;

- 5 e) El calcipotriol de la presente formulación no penetra en la piel, impidiendo de ese modo la exposición sistémica al fármaco y efectos secundarios concomitantes;
- f) La formulación de ácido calcipotriol – nicotínico de la invención se clasificó como un irritante insignificante, mientras que los productos disponibles comercialmente están etiquetados como irritantes;
- g) Evitar los compuestos de esteroides y corticosteroides y los efectos secundarios concomitantes.

### Definiciones

10 **[0058]** Se describen en la presente por conveniencia y claridad, ciertos términos empleados en la descripción, ejemplos y reivindicaciones.

15 **[0059]** Tal y como se utiliza en la presente, la frase “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” describe una cantidad de agente suficiente para derogar, aliviar, inhibir, reducir o prevenir básicamente los síntomas de enfermedad hiperproliferativa. Los síntomas de la psoriasis incluyen inflamación dermatológica; piel escamosa enrojecida, sarpullido, picazón, placas, ampollas. Según la presente invención, las concentraciones finales de calcipotriol oscilan normalmente entre una composición de 10 µg / g y 100 µg / g, preferentemente entre 20 µg / g y 70 µg / g. En concentraciones específicas, el calcipotriol se proporciona en una concentración de 50 µg / g.

20 **[0060]** En algunas realizaciones, una composición comprende una concentración final entre 10 µg / g y 50 µg / g. El calcipotriol es adecuado para mantener la terapia de la enfermedad hiperproliferativa dérmica. En algunas realizaciones, se proporciona una concentración final de calcipotriol de 15 µg / g a 35 µg / g, preferentemente de 30 µg / g.

25 **[0061]** El término “no penetra de forma significativa en la piel” se refiere a una composición que comprende calcipotriol, en la que menos del 10 % de calcipotriol de la composición penetra en las células de la piel, como se determinó por ejemplo, en un ensayo de células de la piel de oreja de cerdo. En algunas realizaciones menos del 5 %, preferentemente menos del 3 % y más preferentemente menos del 1 % de calcipotriol penetra en la piel. Los efectos sistémicos adversos de la vitamina D<sub>3</sub> son bien conocidos en la técnica y una composición, que impide la penetración de calcipotriol en las células de la piel, es altamente deseada.

30 **[0062]** “Terapia de mantenimiento” se refiere al tratamiento para prevenir la recurrencia o recaída o para prevenir la progresión de los síntomas asociados con la enfermedad hiperproliferativa. La nicotinamida (niacinamida) es una de las dos formas principales del complejo B de la vitamina B<sub>3</sub> niacina. Algunos de los inventores de la presente invención han identificado NA como un inhibidor de la proliferación celular, en particular de los queratinocitos. Según la presente invención, las concentraciones finales de NA oscilan normalmente entre una composición de 0,1 mg / g y 25 mg / g, preferentemente entre 1 mg / g y 20 mg / g. En composiciones específicas, la NA se proporciona en una concentración entre 3 mg / g y 10 mg / g, y más preferentemente en una concentración entre 2 mg / g y 6,5 mg / g. Una concentración preferente es de 2,1 mg / g.

35 **[0063]** En el presente documento, el término “tratar” incluye derogar, inhibir sustancialmente, retrasar o revertir la progresión, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos, o prevenir sustancialmente la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad hiperproliferativa. El término “tratar” se entiende que incluye además, la hidratación, la curación o el suavizado de la piel. Los síntomas incluyen, de manera no limitante, tumores, piel escamosa, piel seca, piel áspera, pústulas y piel irritada. Este tratamiento incluye además la prevención de estos síntomas, y en particular de piel irritada y escamosa, antes de que se produzcan.

40 **[0064]** Tal y como se utiliza en la presente, la frase “portador dermatológicamente aceptable” se refiere a un portador o un diluyente que no causa irritación significativa en la piel y no deroga las propiedades y actividad biológicas del agente activo aplicado.

45 **[0065]** Ejemplos de portadores dermatológicamente aceptables útiles en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, emulsiones, cremas, soluciones acuosas, aceites, ungüentos, pastas, geles, lociones, leches, espumas, suspensiones y polvos. Los portadores preferentes son miembros de la familia de los polímeros de polietilenglicol (PEG).

50 **[0066]** El portador dermatológicamente aceptable de la presente invención puede incluir, por ejemplo, un espesante, un emoliente, un emulsionante, un humectante, un surfactante, un agente de suspensión, un agente formador de película, un agente formador de espuma, un conservante, un agente antiespumante, una fragancia, un poliol monoalcohólico inferior, un disolvente de punto de ebullición superior, un propelente, un colorante, un pigmento o mezclas de los mismos. Un surfactante preferente es Steareth – 20.

55 **[0067]** Por tanto, la composición de la presente invención puede ser, por ejemplo, una forma de aceite, un gel, una barra sólida, una loción, una crema, una leche, un aerosol, un pulverizador, una espuma, una mousse, una pomada o un ungüento graso o un polvo.

**[0068]** Las composiciones de la presente invención pueden fabricarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante medios de procesos de mezcla, disolución, granulado, grageado, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales.

5 **[0069]** Pueden utilizarse farmacéuticamente las composiciones para su uso de acuerdo con la presente invención, de este modo pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el proceso de los compuestos activos en las preparaciones.

## 10 **Formulaciones**

15 **[0070]** Las composiciones de la invención comprenden el portador dermatológico o cosméticamente aceptable tal y como se especificó anteriormente que actúa como diluyente, dispersante o vehículo del calcipotriol y la nicotinamida, para facilitar su administración cuando la composición se aplica en la piel. Los vehículos diferentes de o además de agua incluyen emolientes sólidos o líquidos, disolventes, humectantes, espesantes y polvos. La presente invención puede formularse para la administración tópica en forma de soluciones acuosas o no acuosas, lociones, cremas, geles, ungüentos, espuma, mousse, pulverizadores, emulsiones, microemulsiones, parches adhesivos, polvos y similares.

20 **[0071]** En una realización preferente, la composición de la invención es una composición monofásica, es decir, una composición que comprende un sistema de disolvente único, tal como un ungüento. Los ejemplos no limitantes de las formulaciones son de la siguiente forma:

### Ungüentos

25 **[0072]** Los ungüentos proporcionan un método eficaz en la aplicación de agentes activos en la piel. En una realización, el portador dermatológico comprende polietilenglicol. En algunas realizaciones, se prefiere una mezcla de PEGs. En ciertas realizaciones, la composición dérmica de la presente invención tiene la siguiente formulación:

30 10 µg / g a 100 µg / g de calcipotriol;  
0,5 a 25 mg / g de nicotinamida;  
70 % al 80 % (p / p) de PEG – 400;  
15 % al 25 % (p / p) de PEG – 4000;  
1 % al 5 % (p / p) de Steareth – 20;  
35 0,1 al 1% (p / p) de vitamina E.

**[0073]** En realizaciones específicas, la presente invención proporciona una composición dérmica con la siguiente fórmula:

40 50 µg / g de calcipotriol;  
2,1 mg / g de nicotinamida;  
77,7 % (p / p) de PEG – 400;  
20 % (p / p) de PEG – 4000;  
2 % (p / p) de Steareth – 20;  
45 0,3 % (p / p) de vitamina E.

**[0074]** En otras realizaciones específicas, la presente invención proporciona un ungüento dérmico con la siguiente composición:

50 10 - 50 µg / g de calcipotriol;  
2,1 mg / g de nicotinamida;  
77,7 % (p / p) de PEG – 400;  
20 % (p / p) de PEG – 4000;  
2 % (p / p) de Steareth – 20;  
55 0,3 % (p / p) de vitamina E.

**[0075]** En otras composiciones de ungüento dérmico pueden basarse en vaselina y tienen la siguiente composición:

60 10 µg / g a 100 µg / g de calcipotriol; 0,5 a 25 mg / g de nicotinamida;  
35 % al 60 % (p / p) de vaselina; 35 % al 55 % (p / p) de aceite mineral;  
1 % al 10 % (p / p) de Steareth – 2; 0,1 al 1% (p / p) de vitamina E.

65 **[0076]** En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende calcipotriol, en la que el calcipotriol no penetra de manera significativa en la piel. Los ensayos de permeación en la piel son conocidos en la técnica. Se proporciona a continuación un ejemplo en el Ejemplo 7. En ciertas realizaciones, menos de un 10 %, preferentemente menos de un 5 % de calcipotriol penetra en la piel. En algunas realizaciones, menos del 3 % y



preferentemente menos de un 1 % de calcipotriol penetra en la piel. La composición comprende un ungüento basado en PEG que comprende:

- 5           10 µg / g a 100 µg / g de calcipotriol;  
70 % al 80 % (p / p) de PEG – 400;  
15 % al 25 % (p / p) de PEG – 4000;  
1 % al 5 % (p / p) de Steareth – 20;  
0,1 al 1% (p / p) de vitamina E.

- 10   **[0077]** En algunas realizaciones preferentes, la composición es de la siguiente manera:

20 µg / g a 50 µg / g de calcipotriol; 77,7 % (p / p) de PEG – 400; 20 % (p / p) de PEG – 4000; 2 % (p / p) de Steareth – 20; 0,1 al 1% (p / p) de vitamina E.

### 15   **Lociones y cremas**

- [0078]** La composición de la presente invención se puede proporcionar como una loción o como una crema y puede incluir al menos uno o más emolientes que pueden funcionar como lubricante, agente espesante o los dos. Los emolientes pueden comprender en total entre el 0,1 % y el 50 %, preferentemente entre 1 % y 10 % en peso de la composición. Puede utilizarse cualquier emoliente conocido por los expertos en la técnica como adecuado para la aplicación en la piel humana. Estos incluyen, pero no se limitan a, aceites y ceras de hidrocarburo, incluyendo aceite mineral, vaselina, parafina, ceresina, ozoquerita, cera microcristalina, polietileno, y perhidroescualeno; aceites de silicona; grasas y aceites de triglicéridos, incluyendo los derivados de origen vegetal, animal y marino; incluyendo aceite de jojoba y manteca de karité; ésteres acetoglicéridos, tales como monoglicéridos acetilados; glicéridos etoxilados, tales como monoesterato de glicérido etoxilado; ácidos grasos, alcoholes grasos y derivados de los mismos. Otros emolientes adecuados incluyen lanolina y derivados de lanolina; derivados de alcoholes polihídrico y poliéter; ésteres de alcohol polihídrico; ésteres de cera; ceras vegetales; fosfolípidos, tales como lecitina y derivados; esteroides, incluyendo, aunque no de forma limitativa, colesterol y ésteres de ácido graso de colesterol; amidas, tales como amidas de ácidos grasos, amidas de ácido graso etoxiladas, y alcanolamidas de ácidos grasos sólidas. Las lociones pueden contener además entre un 1 % y 10 %, más preferentemente entre 2 % y 5 % de un emulsionante. Los emulsionantes pueden ser no iónicos, aniónicos o catiónicos. Los expertos en la técnica pueden elegir emulsificantes adecuados para las composiciones dérmicas.

- [0079]** Se pueden incluir otros componentes convencionales de tales lociones y cremas. Uno de estos aditivos es un agente espesante con un nivel entre 1 % y 10 % de la composición. Ejemplos de agentes espesantes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa: polímeros de carboxipolimetileno reticulados, etilcelulosa, polietilenglicoles, goma tragacanto, goma caraya, gomas de zantano y bentonita, y otras arcillas, hidroxietilcelulosa e hidropropilcelulosa.

- [0080]** Las lociones y cremas se formulan simplemente mezclando todos los componentes juntos. Preferentemente, el calcipotriol se disuelve, se suspende o de otro modo se dispersa en la mezcla.

### **Soluciones y suspensiones**

- [0081]** Las soluciones, que pueden ser acuosas o no acuosas, se formulan para contener una concentración eficaz de cada uno de los agentes activos, calcipotriol y NA.

- [0082]** Los materiales orgánicos adecuados útiles como el disolvente o una parte del sistema disolvente son los siguientes: propilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerina, ésteres de sorbitol, 1,2, 6 – hexanotriol, etanol, isopropanol, tartrato dietilo, butanodiol, y mezclas de los mismos. Tales sistemas disolventes pueden además contener agua.

- [0083]** Cuando las composiciones de la invención se formulan como una emulsión, la proporción de la fase grasa puede oscilar entre el 5 % y el 80 % en peso, y preferentemente entre el 5 % y el 50 % en peso, con relación al peso total de la composición. Aceites, emulsionantes y coemulsionantes incorporados a la composición en forma de emulsión se seleccionan entre aquellos conocidos por los expertos en el campo cosmético o dermatológico.

### **Geles y sólidos**

- [0084]** Las composiciones de gel pueden ser formuladas mezclando simplemente un agente espesante adecuado a las composiciones de suspensión o solución descritas anteriormente. Se han descrito previamente ejemplos de agentes espesantes adecuados con respecto a las lociones.

- [0085]** Las composiciones gelificadas contienen una concentración eficaz de agentes activos; entre el 5 % y el 75 % de un disolvente orgánico según se ha descrito anteriormente; entre el 0,5 % y el 20 % de un agente espesante, y con el equilibrio en estado agua, otro portador acuoso o una combinación de portadores.

**[0086]** Las composiciones de formas sólidas pueden formularse como composiciones de barra destinadas para aplicarse en la piel. Los sólidos contienen también entre el 50 % y el 98 % de los emulsionantes anteriormente descritos. Esta composición puede además contener entre el 1 % y el 20 % de un agente espesante adecuado, y si se desea o es necesario, emulsionantes y agua o tampones. Los agentes espesantes anteriormente descritos con respecto a las lociones se emplean de forma adecuada en las composiciones en forma sólida.

**[0087]** Otros ingredientes, tales como conservantes, incluyen metilparabeno, etilparabeno, perfumes, colorantes o similares, conocidos en la técnica por proporcionar estabilidad deseable, fragancia o color, u otras propiedades deseables, en las composiciones que se aplican en la piel.

**[0088]** Las composiciones formuladas como soluciones o suspensiones pueden aplicarse directamente en la piel, o pueden formularse como un pulverizador y aplicarse a la piel como un pulverizador, espuma o mousse. Las composiciones de aerosol contienen además entre el 20 % y el 80 %, preferentemente entre el 30 % al 50 % de un propelente adecuado. Ejemplos de tales propelentes son los hidrocarburos de bajo peso molecular clorados, fluorados y clorofluorados. El óxido nitroso, dióxido de carbono, butano, y propano son también utilizados como gases propelentes. Estos propelentes se utilizan como se conocen en la técnica en una cantidad y en una presión adecuada para expulsar el contenido del recipiente. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser determinada proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada.

**[0089]** En otras realizaciones, las composiciones formuladas como soluciones, suspensiones, lociones y geles de la presente invención se formulan como una espuma o mousse para la aplicación dérmica. Se enseñan los portadores relevantes de la formulación como una espuma o mousse, por ejemplo, en la publicación de la Solicitud de la Patente Internacional con N° WO 2004 / 037225 y la Patente de EE.UU. con N° 6.730.288.

## Dosis

**[0090]** Las composiciones de la presente invención se formulan para la administración tópica de ingredientes activos hasta cuatro veces al día. Preferentemente, la formulación es terapéuticamente eficaz para una única administración diaria.

## Aditivos

**[0091]** La composición tópica puede incluir adicionalmente un tercer o cuarto componente farmacéuticamente aceptable. La invención se refiere además a una preparación farmacéutica preferente según la invención, que es especialmente útil en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas de la piel que se complican por las infecciones fúngicas adicionales, y que contienen además un agente antifúngico. Los ejemplos no limitantes de antifúngicos incluyen miconazol, clotrimazol, terbinafina, ciclopirox, bifonazol, nistatina, ketoconazol, econazol y amorolfina.

**[0092]** Otros ejemplos de aditivos incluyen protectores solares. Los protectores solares incluyen aquellos materiales empleados habitualmente para bloquear la luz ultravioleta. Los compuestos ilustrativos son los derivados de PABA, cinamato y salicilato. Por ejemplo, octil metoxicinamato (parsol MCX) y 2 - hidroxí - 4 - metoxi benzofenona (también conocida como oxibenzona y 3 - benzofenona). La cantidad de protector solar empleada en las composiciones puede variar dependiendo del grado de protección deseado contra la radiación de UV. El protector solar debe ser compatible con el compuesto activo pero en general, la composición puede comprender entre el 1 % y el 20 % del protector solar. Las cantidades exactas variarán dependiendo del protector solar escogido y el factor de protección solar deseado (FPS).

**[0093]** La composición de la presente invención puede comprender además un antioxidante. La inclusión del neutralizador antioxidante / radical puede proporcionar a la composición estabilidad. El neutralizador antioxidante / radical puede añadirse a las composiciones de la presente invención en una concentración que oscila entre 0,1 % y 10 % del peso total de la composición. Los neutralizantes antioxidantes / radicales incluyen ácido ascórbico (vitamina C) y sus sales, y tocoferol (vitamina E). Un aditivo preferente es la vitamina E. Un cierto intervalo de concentración preferente es del 0,1 % al 1 %.

**[0094]** Otros aditivos incluyen glicosaminoglicanos, tales como ácido hialurónico y similares.

## Métodos de tratamiento

**[0095]** La presente invención proporciona además el uso de las composiciones para preparar un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel que comprende la etapa de:

administrar por vía tópica a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración entre 10 µg / g y 100 µg / g; nicotinamida en una concentración de 0,1 mg / g a 50 mg / g; y un excipiente o portador dermatológicamente aceptable.

- 5 **[0096]** El método de prevención o tratamiento comprende la administración tópica de la composición hasta cuatro veces al día. En realizaciones preferentes, la composición se administra una o dos veces al día. En algunas realizaciones, la composición se aplica dos veces al día en intervalos de 12 horas. En otras realizaciones, la composición se administra una vez al día.
- [0097]** En algunas realizaciones, el método de tratamiento incluye dos periodos de tratamiento: un tratamiento inicial, y un tratamiento de mantenimiento.
- 10 **[0098]** Sin desear quedar ligado por la teoría, el tratamiento inicial sirve para reducir, al menos, algunos de los signos y síntomas de la enfermedad, mientras que el segundo tratamiento de mantenimiento sirve para prevenir la recaída o progresión de la enfermedad.
- 15 **[0099]** Por consiguiente, en el tratamiento inicial, un paciente se administra una dosis inicial de la composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración entre 10 µg / g y 100 µg / g; nicotinamida en una concentración de 0,1 mg / g a 50 mg / g; y un excipiente o portador dermatológicamente aceptable para un periodo inicial y posteriormente, el paciente se administra una dosis menor de mantenimiento de una composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración entre 10 µg / g y 50 µg / g; nicotinamida en una concentración entre 0,1 mg / g y 50 mg / g; y un excipiente o portador dermatológicamente aceptable.
- 20 **[0100]** La dosis inicial de calcipotriol oscila preferentemente entre 20 µg / g y 70 µg / g, más preferentemente entre 50 µg / g; la dosis inicial de NA oscila entre 0,5 mg / g y 25 mg / g, preferentemente entre 1 mg / g y 20 mg / g, y más preferentemente entre 2,1 mg / g.
- 25 **[0101]** Para la dosis de mantenimiento, el calcipotriol se proporciona en una concentración entre 10 µg / g y 50 µg / g. En algunas realizaciones, el calcipotriol se proporciona en una concentración entre 15 µg / g y 35 µg / g. En realizaciones específicas, el calcipotriol se proporciona en una concentración de 30 µg / g. Una dosis de mantenimiento de NA oscila entre 0,5 mg / g y 25 mg / g. En ciertas realizaciones, la nicotinamida se proporciona en una concentración entre 1 mg / g y 20 mg / g. En otras realizaciones, la nicotinamida se proporciona en una concentración entre 2 mg / g y 10 mg / gm, preferentemente en una concentración de 2,1 mg / g.
- 30 **[0102]** Según ciertas realizaciones preferentes, la presente invención proporciona el uso de las composiciones presentes para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel que comprende las etapas de:
- 35 administrar por vía tópica a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración 50 µg / g; nicotinamida en una concentración de 2,1 mg / g; y el excipiente o portador dermatológicamente aceptable de un periodo inicial de tiempo para reducir los síntomas de la enfermedad hiperproliferativa; y
- 40 administrar por vía tópica a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración de 15 µg / g y 35 µg / g; nicotinamida en una concentración de 2,1 mg / g; y el excipiente o portador dermatológicamente aceptable de un segundo periodo de tiempo.
- 45 **[0103]** En una realización, el periodo inicial de tiempo es de 4 semanas a 24 semanas, preferentemente de 4 semanas a 16 semanas. En ciertas realizaciones preferentes, el periodo de tratamiento inicial es de 6 semanas a 12 semanas, preferentemente de 8 semanas. El segundo periodo de tiempo es de 8 semanas a 52 semanas, preferentemente de 12 semanas a 26 semanas.
- 50 **Invasado del productos y kits**
- [0104]** En uso, una pequeña cantidad de la composición, por ejemplo entre 0,1 ml y 100 ml, se aplica a áreas expuestas de la piel, a partir de un recipiente o aplicador adecuado y, si es necesario, se extiende sobre y / o se masajea en la piel utilizando la mano, dedos u otro dispositivo adecuado. El producto puede formularse específicamente para su uso como un tratamiento manual o facial.
- 55 **[0105]** Cuando se formula, la composición puede envasarse en un recipiente adecuado para adaptar su viscosidad y el uso pretendido por el consumidor. Por ejemplo, un ungüento puede envasarse en un tubo, una loción o crema puede envasarse en una botella, o un dispositivo aerosolizado impulsado por un propelente o un recipiente equipado con una bomba adecuada para accionarse con el dedo. Cuando la composición es una crema, se puede almacenar simplemente en una botella o recipiente comprimible no deformable, tal como un tubo o un bote con tapa. Por consiguiente, la invención proporciona asimismo un recipiente cerrado que contiene la composición dermatológica o cosméticamente aceptable tal como se ha definido en el presente documento. La forma del recipiente no se limita a esta invención, y puede ser un tubo, un dosificador de bomba, un dosificador comprimido, una botella, un pulverizador, una bolsita o similares.
- 60
- 65

**[0106]** Muchos de los agentes de las composiciones reivindicadas de la presente invención pueden proporcionarse como sales fisiológicamente aceptables en las que el agente puede formar las especies cargadas de forma negativa o positiva. Ejemplos de sales en los que el agente forma el resto cargado de forma positiva incluye, sin limitación, sales de amonio cuaternario, tales como el clorhidrato, sulfato, carbonato, lactato, tartrato, maleato, succinato, y similares, en el que el nitrógeno del grupo amonio cuaternario es un nitrógeno de un compuesto de la presente invención que reacciona con un ácido apropiado. Las sales en las que el agente forma las especies cargadas de forma negativa incluyen, sin limitación, las sales de sodio, potasio, calcio y magnesio formadas por la reacción de un grupo ácido carboxílico en la molécula con la base adecuada (por ejemplo, hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de calcio (Ca(OH)<sub>2</sub>), etc.).

**[0107]** Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dosificador, tal como un kit aprobado por la agencia reguladora, que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase, por ejemplo, comprende papel metálico o plástico, tal como un envase de blíster. El envase o dispositivo dosificador se acompaña de instrucciones para la administración. El envase o dosificador puede también acompañarse de un aviso asociado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de las composiciones, siendo dicho aviso reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones de la administración humana o veterinaria. En otras realizaciones, las composiciones se preparan para el uso y venta de medicamentos disponibles sin receta médica (OTC).

**[0108]** Las composiciones que comprenden los agentes de la invención formulados en un portador compatible pueden además prepararse, colocarse en un recipiente apropiado, y marcarse para prevenir o tratar los trastornos de la piel asociados con el envejecimiento.

**[0109]** Resultarán evidentes para un experto en la técnica objetos adicionales, ventajas, y características nuevas de la presente invención tras la examinación de los siguientes ejemplos, que no se pretenden que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se ha indicado anteriormente y como se reivindican en la sección de reivindicaciones posteriormente, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1: experimentos *in vitro*

**[0110]** Se realizaron determinados ensayos *in vitro* basados en el cultivo celular de queratinocitos para probar NA y la combinación de NA y calcipotriol. Se ha descrito el diseño experimental de algunos de los inventores de la presente solicitud en la publicación de la Patente PCT WO 01 / 51051.

**[0111]** Los resultados de los estudios *in vitro* indican que:

La proliferación de todas las líneas celulares (queratinocitos HaCat, queratinocitos primarios humanos A431, KM12) se inhibieron de forma significativa por la NA en concentraciones farmacológicas de una manera dependiente de la dosis;

Una combinación de NA con calcipotriol proporciona un efecto antiproliferativo sinérgico;

La NA favorece los procesos de diferenciación en células epidérmicas benignas y malignas como se muestra por el aumento de la expresión de los marcadores tempranos de diferenciación (K10), tardíos (involucrina) y terminal (formación de la cubierta cornificada celular);

La NA no induce muerte apoptótica en células HaCat y A431; y

El tratamiento a largo plazo de los queratinocitos HaCat con NA demostró un elevado nivel de protección al estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno) y elevados niveles de enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasa y catalasa).

Los experimentos y sus resultados se resumen en este documento a continuación:

#### Cultivo celular

**[0112]** La actividad antiproliferativa de calcipotriol y nicotinamida se probó en dos sistemas de modelo: el primero, un queratinocito humano inmortalizado de forma espontánea que se denomina en la presente "células HaCat" o "queratinocitos HaCat", y sirve como modelo para la epidermis altamente proliferativa, tal como, pero no se limita a, epidermis psoriásica (Okenfels et al, 1998), y como un modelo de los efectos de moduladores externos de la diferenciación epidérmica (Paramio, et al., 1997). El segundo sistema incluye la proliferación rápida de los queratinocitos humanos, denominados en la presente "queratinocitos epidérmicos humanos cultivados", y sirve como modelo para detectar los agentes antiproliferativos en el tratamiento de la psoriasis (Nikoloff, et al., 1988).

5 **[0113]** Se han utilizado estos modelos, según la presente invención, para probar la eficacia antiproliferativa de los agentes descritos en la presente. Las células de queratinocito humano inmortalizadas HaCat se cultivaron de forma rutinaria en matraces de 75 cm<sup>2</sup> utilizando medio mínimo esencial de Eagle (MED – EAGLE) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5 % y un 1 % de antibióticos (20 unidades / ml de penicilina; 20 µg / ml de estreptomina y 2,5 unidades / ml de nistatina) a 37 °C en 95 % de aire / 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 3 – 4 días.

**[0114]** Los cultivos a largo plazo de células HaCat cultivadas en calcipotriol se obtuvieron cultivando células HaCat durante 6 meses en un medio utilizado de forma rutinaria.

10 **[0115]** Se obtuvieron otros cultivos a largo plazo de células con otros agentes de manera similar cultivando células HaCat durante un periodo prolongado de tiempo en medio suplementado con combinaciones de NA, vitamina D y derivados de las mismas y vitamina A.

15 **[0116]** Los queratinocitos epidérmicos humanos (pases 3 – 6) obtenidos de cirugía de lifting facial normal se cultivaron en medio libre de suero KGM® - 2 BulleKit® (Clonetics, USA) con calcio bajo para acelerar la proliferación de los queratinocitos.

Reactivos:

20 **[0117]** Nicotinamida (NA); calcipotriol (1α, 25 – dihidroxi – vitamina D3); bromuro de 3 – (4, 5 – dimetiltiazol – 2 – il) – 2, 5 – difeniltetrazolio (MTT); yoduro de propidio; dimetilsulfóxido (DMSO); albúmina de suero bovino (ASB); sacarosa; citrato trisódico; igepal CA – 630 (NP – 40); Tris – (hidroximetil) – aminometano; tripsina; inhibidor de tripsina; ribonucleasa A; tetrahidrocloruro espermina; dodecilsulfato sódico (DSS); β – mercaptoetanol y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se obtuvieron de Sigma (EE.UU.).

25 **[0118]** El medio mínimo esencial de Eagle (MED – EAGLE); DMEM; antibióticos; suero fetal bovino (SFB); L – glutamina; solución salina tamponada con fosfato (STF); y solución de tripsina 0,05 % – EDTA se obtuvieron de Biological Industries (Israel).

30 **[0119]** Keratinocyte Growth Medium® - 2 Bullet Kit® CC – 3107 (para acelerar la proliferación) se recibió de BioWhittaker, Inc. (Clonetics, EE.UU.).

35 **[0120]** Anticuerpos monoclonales de ratón anti - citoqueratina 10 humana (NCL – CK10) e involucrina (NCL – INV) se obtuvieron de Novacastra Laboratories Ltd. (RU) y las IgG de cabra anti - ratón conjugadas con Cy<sup>TM</sup> 2 se obtuvieron de Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. (EE.UU.).

40 **[0121]** Las células HaCat se propagaron en matraces de cultivo tisular de 25 cm<sup>2</sup> o 75 cm<sup>2</sup> (Corning, EE.UU.) y se utilizaron placas de cultivo tisular de 24 pocillos y 96 pocillos (Corning, EE.UU.) para incubar las células con diferentes dosis de NA (1 – 50 mM / l) y calcipotriol (1 – 1000 nM).

Ensayos de proliferación (método MTT)

45 **[0122]** Se determinó la viabilidad y / o proliferación de las células HaCat y los queratinocitos epidérmicos humanos cultivados tras el tratamiento con diversas concentraciones de calcipotriol, nicotinamida (NA) o una combinación de los mismos, mediante el ensayo de MTT según el fabricante en placas de microtitulación de 96 pocillos.

Apoptosis y ensayos de actividad mitótica

50 **[0123]** Se analizó la estimación de apoptosis y necrosis utilizando microscopía de fluorescencia como se describió previamente (Harel et al, 2002). Brevemente, las células HaCat se cultivaron en láminas de vidrio y se expusieron a diversas concentraciones de NA (5, 10, 20 y 50 mM). Después de 72 horas, las células se tiñeron con los colorantes de unión al ADN Hoeschst 33342 y yoduro de propidio. Se identificaron las células viables por los núcleos intactos y su fluorescencia azul, las células necróticas por núcleos intactos y fluorescencia roja, y las células en fase temprana o tardía de apoptosis, por los núcleos fragmentados y fluorescencia roja o azul. Se contaron al menos 1000 células por cada tratamiento.

60 **[0124]** La determinación de los parámetros de apoptosis y ciclo celular se realizaron por citometría de flujo. Las células se sembraron en matraces de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante 48 horas, y después se expusieron a 5, 10 y 20 nM de NA durante 72 horas. La citometría de flujo se realizó en núcleos preparados con un método de detergente tripsina con yoduro de propidio (Vidlov et al, 1983).

65 **[0125]** Análisis por inmunotransferencia de la expresión de PARP: se detectaron complejos inmunes por incubación con anticuerpo secundario AP124A anti - ratón conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1:5000) seguido por el desarrollo con el sustrato de color BCIP / NBT.

**[0126]** Curva de crecimiento y actividad mitótica: se sembraron 2x10<sup>4</sup> células por ml en placas de cultivo tisular de

24 pocillos y se incubaron con o sin 10 mM de NA. Las células fueron separadas por tripsinización en diferentes momentos (48 h – 168 h) seguidos por pases y se contaron utilizando un hemocitómetro en alícuotas por tetraplicado. Para estimar la actividad mitótica, las células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio en placas de Petri. Tras 72 horas de incubación con o sin 10 mM de NA, las células se fijaron con metanol, se tiñeron con tinción de Giemsa y se analizaron por microscopía de luz. Se calculó la frecuencia de las células mitóticas en diferentes etapas del ciclo mitótico (pro -, meta -, ana - y telofases). Se contaron al menos 1000 células en cada experimento.

#### Ensayos de diferenciación

10 **[0127]** Formación de la cubierta cornificada: los procesos de diferenciación tardíos en las células HaCat tratadas con NA y o calcipotriol se midieron determinando la formación de la cubierta cornificada celular según los procedimientos descritos en Sun and Green (1976) y en la publicación PCT WO 01 / 51051.

#### Inmunofluorescencia indirecta:

15 **[0128]** Los efectos de la NA y o calcipotriol sobre los procesos tempranos (expresión de queratina k10) y tardíos (expresión de involucrina) de diferenciación sobre las células HaCat se estimaron mediante inmunofluorescencia indirecta.

20 **[0129]** Brevemente, se sembraron  $2 \times 10^4$  células / ml sobre cubreobjetos de vidrio en placas de Petri con 0, 5, 10 y 20 mM de NA o calcipotriol. Tras 72 h de incubación, se lavaron las células del cubreobjetos de vidrio con TFS, se fijaron mediante metanol enfriado con hielo: acetona (1:1) y se incubaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Las células fijadas se lavaron en TFS y se incubaron con tampón de bloqueo (SFB al 1% en TFS) durante 10 minutos para minimizar la absorción no específica de los anticuerpos primarios sobre los cubreobjetos. Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora con anticuerpos monoclonales primarios (se detectó la expresión de queratina 10 por un anticuerpo monoclonal de ratón antihumano en una dilución final de 1 / 50; la expresión de involucrina se detectó mediante un anticuerpo monoclonal de ratón anti - involucrina humana en una dilución final de 1 / 100) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 h en una cámara húmeda. Las células lavadas exhaustivamente con TFS se incubaron con la IgG de cabra conjugada con Cy<sup>TM</sup> 2 anti - ratón en una dilución final de 1 / 50 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se visualizaron en un microscopio Zeiss (Axioskop - 2) equipado con lentes de epifluorescencia y filtros apropiados para evitar la contaminación cruzada. El nivel de expresión de queratina 10 y de involucrina se estimó contando las células positivas en relación al número total de células. En cada portaobjetos se contaron al menos 500 - 1000 células.

#### Análisis estadístico

35 **[0130]** Los resultados están presentados como la media  $\pm$  desviación estándar de la media (media  $\pm$  DE). La significación estadística ( $P < 0,05$ ) derivó de la prueba t de Student.

#### Resultados

40 **[0131]** NA inhibió la proliferación de células HaCat de una manera dependiente de la dosis. La incubación durante 72 horas con bajas dosis de NA (0,5 – 5 mM) no cambió la velocidad de proliferación de células HaCat. Sin embargo, las concentraciones más elevadas de NA redujeron notablemente la respuesta proliferativa de manera dependiente de la dosis. Una concentración farmacológica de 10 mM, que da como resultado la inhibición duplicada de proliferación celular, se eligió para estudiar el efecto de NA en la actividad mitótica de las células HaCat, curva de crecimiento y progresión del ciclo celular. El análisis microscópico de la actividad mitótica indicó que el porcentaje de células mitóticas fue 2,5 veces menor en la población de las células tratadas con NA en comparación con las no tratadas. Se obtuvieron resultados similares de retraso en el crecimiento después de incubar las células HaCat con 10 mM de NA durante 48 – 168 horas.

50 **[0132]** Para esclarecer la alteración en el ciclo celular que puede dar lugar a un retraso en el crecimiento inducido por el tratamiento de NA, se estudió la frecuencia de células en las fases G0 – G1, S y G2 – M mediante el análisis por citometría de flujo. Se mostró una correlación inversa entre la progresión de las células a través de la fase G0 – G1 del ciclo celular y la reducción del número de células en las fases S y G2 – M después de la incubación con NA durante 72 horas de forma dependiente de la dosis.

55 **[0133]** NA induce apoptosis, pero no necrosis en las células HaCat. Utilizando microscopía de fluorescencia, se podría realizarse en una sola muestra una estimación de apoptosis y necrosis. Los niveles de necrosis y apoptosis espontáneos en las células HaCat intactas fueron  $0,8 \pm 0,22\%$  y  $0,3 \pm 0,1\%$ , respectivamente. Las concentraciones de nicotinamida de 20 mM y 50 mM mostraron un efecto apoptogénico significativo en los queratinocitos HaCat. En 50 mM de NA el 91 % de las células efectuadas mostró signos de apoptosis tardía (núcleos fragmentados y condensados en rojo) y solo el 9 % de las células estaban en fase temprana de apoptosis (núcleos fragmentados y condensados en azul). Sin embargo, no se probó la concentración de NA inducida por la muerte celular necrótica. Por tanto, NA es un buen candidato para el tratamiento de trastornos dérmicos.

60

65

5 [0134] Los datos del análisis de transferencia de Western demostraron que las células HaCat intactas tratadas con 10 mM o 20 mM de NA expresan un nivel basal de una proteína completa PARP de 116 kDa no degradada. Sin embargo, una dosis de NA de 50 mM indujo la degradación de PARP y la aparición de un fragmento de clivaje de PARP de 85 kDa. Se estimó la diferenciación terminal de queratinocitos mediante el nivel de formación de la cubierta cornificada celular que refleja la reacción de reticulación de proteína – proteína catalizada por la transglutaminasa en el lado citoplásmico de la membrana plasmática (Steinert and Marekov, 1997). La mayoría de las células HaCat no tratadas consistían en células basales sin madurar ( $58,6 \pm 10,24$  %), mientras que las células de la cubierta cornificada diferenciada constituyeron solo el  $4,4 \pm 2,78$  % del número total de células. La incubación de las células con 5 mM de NA o 10 mM de NA no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la frecuencia de las células basales y las células de la cubierta cornificada. Cuando las concentraciones de NA se incrementaron a 15 mM, el nivel de las células basales se redujo en gran medida a  $25,6 \pm 5,76$  %. En esta concentración de NA aumentó la formación de la cubierta cornificada celular. Además, se encontró la reducción del número de células basales y la elevación de la formación de la cubierta cornificada celular en 20 mM de NA. En esta concentración de NA, la frecuencia de células basales y las células de la cubierta cornificada fue idéntica e igual al 15 % de la población total celular.

20 [0135] Para estimar los procesos de promoción de la diferenciación anteriores de la formación de la cubierta cornificada celular, se determinó el nivel de expresión de queratina 10 (K10) e involucrina. Una concentración de 20 mM de NA causó un aumento en la expresión de queratina 10 e involucrina en los queratinocitos HaCat. El análisis cuantitativo indica que la NA en concentraciones de 5 mM a 10 mM no tuvo efecto en la expresión K10 en comparación con las células de control. Sin embargo, en una concentración mayor de NA (20 mM) se indujo la estimulación tres veces de la expresión K10 en las células HaCat. A diferencia de K10, la expresión de involucrina fue significativamente más sensible al tratamiento de NA. El nivel de expresión de involucrina en las células HaCat tratadas con 5 mM de NA aumentó 2 veces ( $11,2 \pm 1,68$  % contra  $6,0 \pm 1,22$  % en el control). La frecuencia mejorada de las células positivas de involucrina se encontró a 10 mM y 20 mM ( $11,0 \pm 1,13$  % y  $15,1 \pm 3,93$  %, respectivamente). Estos resultados indican que el tratamiento de NA estimula la expresión de varios marcadores de diferenciación de células HaCat de manera dependiente de la dosis.

30 [0136] En conclusión, el hecho de que las dosis farmacológicas de NA son una terapia segura y los datos anteriormente mencionados en el efecto promotor de la diferenciación y antiproliferativo de esta vitamina en los queratinocitos epidérmicos humanos HaCat sugiere un fuerte potencial terapéutico de NA para el tratamiento de diferentes trastornos hiperproliferativos de la piel.

### 35 Ejemplo 2: Estrategia del desarrollo de la formulación

[0137] La estrategia de desarrollo de la formulación se basó en los siguientes principios:

- a) Formulaciones con gran diversidad en la composición;
- 40 b) Uso del grado farmacéutico, ingredientes aprobados;
- c) Determinar la actividad acelerada a 40 °C y medir la potencia en un modelo en cola de ratón, en comparación con las composiciones disponibles comercialmente;
- 45 d) Optimizar la concentración de los ingredientes activos basada en la actividad medida por el modelo en cola de ratón.

### Preparación de formulaciones de ungüento

50 [0138] Se prepararon ocho formulaciones de base diferente. Las formulaciones 1 - 4 y 8 eran una base de gel de vaselina / aceite mineral; la formulación 5 era una base de PEG; la formulación 6 era una base de agua - triglicérido; la formulación 7 era una base de triglicérido - glicerina. Se añadieron a estas formulaciones de base (numeradas del 1 al 8) 50 µg / g de calcipotriol y 0,61 mg / g de nicotinamida. Se prepararon 300 g en cada formulación. Estas preparaciones se utilizaron para el desarrollo del método analítico (extracción), estabilidad acelerada a 40 °C y evaluación de la actividad biológica (potencia).

### Determinación de calcipotriol (método por HPLC)

60 [0139] Este método se utilizó para determinar el contenido de calcipotriol en las formulaciones de ungüentos de calcipotriol – nicotinamida utilizando HPLC con detección de UV.

Materiales: Conjunto de materiales: grado analítico; disolventes: grado de HPLC

65 Calcipotriol estándar (5,0 µg / ml de calcipotriol)  
Metanol  
Acetonitrilo

Condiciones de HPLC:  
Hypersil® ODS – 2, 5 µm, columna de 250 x 4,6 mm.

- 5 Precolumna: Opti – Guard®, C18, 1 mm.  
Fase móvil: 60 % de acetonitrilo en agua.
- 10 Preparación de la fase móvil: por cada litro de fase móvil mezclar bien 600 ml de acetonitrilo y 400 ml de agua.  
Diluyente: 90 % de metanol en agua.
- 15 Velocidad de flujo: 1 ml / min; volumen de muestra: 50 µl; detector: UV 264 nm; temperatura de columna: 25 °C, temperatura de cargador de muestras: 25 °C – temperatura controlada; duración: 12 minutos.  
Cálculos: se calculó el contenido de calcipotriol en las formulaciones a partir de la relación entre el área del pico de la muestra en el área del pico medio de todas las inyecciones de solución de trabajo estándar.

Determinación de nicotinamida (método HPLC)

- 20 **[0140]** Este método se utiliza para determinar el contenido de nicotinamida (niacinamida) en formulaciones de crema de calcipotriol – nicotinamida utilizando HPLC con detección de UV.

Materiales:

- 25 **[0141]**  
Nicotinamida estándar (24 µg / ml)  
Dihidrógeno fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
30 Hidróxido de potasio (KOH)  
Acetonitrilo  
Agua

Condiciones de HPLC:

- 35 **[0142]**  
Columna & envasado: Grom – Sil 120 ODS – 5ST, 5 µm, 150 x 4 mm, o equivalente.
- 40 Precolumna: Opti – Guard®, C18, 1 mm.  
Fase móvil: Eluyente A: acetonitrilo al 3 % en tampón fosfato (pH 6,6), eluyente B: acetonitrilo al 50 % en tampón fosfato (pH 6,6).
- 45 Velocidad de flujo: 0,8 ml / min; volumen de inyección: 50 µl; detector: UV 261 nm; temperatura de columna: 30 °C, temperatura de cargador de muestras: 20 °C; duración: 9 minutos para soluciones estándar, 23 minutos para soluciones de muestra.  
Cálculos: se calculó el contenido de nicotinamida en las formulaciones a partir de la relación entre el área del pico de la muestra en el área del pico medio de todas las inyecciones de solución de trabajo estándar.

Método de extracción de calcipotriol & nicotinamida formulado

Extracción de calcipotriol de las formulaciones

- 55 **[0143]** Las formulaciones 1, 2, 4, 5, 6, 7 se trataron de la siguiente manera:
- 60 1. Se pesó un gramo de muestra en un vial de vidrio de 20 ml, se añadieron 10 ml de diluyente (metanol: agua 9:1 v / v), se mezcló durante 1 min y se dejó reposar durante 5 min.  
2. Se transfirió 1 ml de la mezcla resultante al tubo de centrifugación con un filtro de 0,22 mm y se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm.  
3. El filtrado recogido se inyectó en HPLC.
- 65 **[0144]** Las formulaciones 3, 8 se trataron de la siguiente manera:



- 5
1. Se pesó un gramo de muestra en un vial de vidrio de 20 ml, se añadieron 10 ml de diluyente (metanol: agua 9:1 v / v), se mezcló durante 1 min.
  2. Se realizó sonicación durante 10 min con agitación vigorosa periódica.
  3. Se realizó una mezcla durante 1 min.
  - 10 4. Se transfirió 1 ml de la mezcla resultante al tubo de centrifugación con un filtro de 0,22 mm y se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm.
  5. El filtrado recogido se inyectó en HPLC.

15 Extracción de nicotinamida de las formulaciones

[0145] Las formulaciones 2, 4, 5, 6, 7 se trataron de la siguiente manera:

- 20
1. Se pesó un gramo de muestra en un matraz volumétrico de 25 ml, se disolvió mezclándolo y se completó el volumen con agua.
  2. Se realizó sonicación durante 10 min con agitación vigorosa periódica.
  - 25 3. Se transfirió 1 ml de la mezcla resultante al tubo de centrifugación con un filtro de 0,22 mm y se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm.
  4. El filtrado recogido se inyectó en HPLC.

[0146] Las formulaciones 1, 3, 8 se trataron de la siguiente manera:

- 30
1. Se pesó un gramo de muestra en una botella de vidrio de 50 ml, se añadieron 25 ml de agua y se mezclaron durante 30 seg después de la sonicación a 40 °C durante 30 min con agitación vigorosa periódica.
  - 35 2. A continuación, la mezcla resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró a través de un filtro de 0,45 mm.

[0147] El filtrado recogido se inyectó en HPLC.

40 [0148] Resultados: Se descubrió que las formulaciones 1, 2 y 5 eran las más estables tras la exposición a 40 °C durante 60 días (por ser mayor al 85 % de recuperación de calcipotriol y NA). La formulación 5 sigue siendo la más estable incluso después de 180 días de exposición.

45 Ejemplo 3: evaluación de la potencia

[0149] El ensayo de evaluación de la potencia se realizó con las formulaciones 1, 2 y 5. La evaluación de la potencia se realizó según el procedimiento publicado en Bosman B., et al. (1992) con las siguientes modificaciones:

50 [0150] Se colocaron collares en los ratones en lugar de campanas para evitar que se laman en el área tratada; y se utilizaron ratones albinos macho (ICR) en lugar de ratones albino macho (NMRI) con el mismo peso y edad.

55 [0151] Se realizaron dos experimentos: el primer ensayo se realizó para probar la potencia relativa de las diferentes composiciones de base que comprenden 50 µg / g de calcipotriol y 0,61 mg / g. Ya que las fórmulas 1, 2 y 5 resultaron ser las más estables, es decir, los ingredientes activos permanecían estables después de 60 días a 40 °C. Los resultados de este experimento están presentes en la Figura 1A (% de ortoqueratosis) y la Figura 1B (% de actividad de los ingredientes activos). La letra "V" se refiere solo al vehículo, y V – 1; V – 2 y V – 5 se refieren a los vehículos de las composiciones 1, 2 y 5, respectivamente. Los números 1, 2 y 5 se refieren a las formulaciones 1, 2 y 5, respectivamente.

60 [0152] El segundo ensayo está relacionado con la optimización de las concentraciones de nicotinamida en las composiciones. En consecuencia, se cribaron 6 composiciones diferentes por su potencia utilizando una concentración de 50 µg de calcipotriol y concentraciones de nicotinamida incrementadas 3 veces a partir de 0,70 mg / g de formulación. Estas formulaciones se compararon con composiciones disponibles comercialmente que comprenden 50 µg / g de calcipotriol.

65 [0153] El esquema experimental se presenta a continuación en el presente documento en la Tabla 1. Los

resultados de ortoqueratosis se presentan a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 1**

5	<b>Descripción</b>	<b>Duración</b>
10	Número de formulaciones probadas: 5 + 1 control activo I: 50 µg / g de calcipotriol y 0,70 mg / g de nicotinamida II: I: 50 µg / g de calcipotriol y 2,1 mg / g de nicotinamida III: I: 50 µg / g de calcipotriol y 6,3 mg / g de nicotinamida IV: I: 50 µg / g de calcipotriol y 18,9 mg / g de nicotinamida Veh: vehículo C: (control) composición de calcipotriol disponible comercialmente (Daivonex®)	7 días
15	Ratones – 6 ratones albino machos (ICR) que pesan 25 – 27 g por formulación. Control: 6 ratones. Total 36 ratones (5 x 6 + 6 = 36)	
20	Tratamientos: 6 tratamientos por semana durante 7 días	7 días
25	Tratamiento: aplicación tópica una vez al día en la base de la cola: en una sección 2,5 cm a partir de 1 cm desde el extremo próximo de la cola, durante 3,5 horas. El área de tratamiento se aclara con solución salina. Durante el tratamiento, la cola se protegió de los lametones poniendo collares en el torso de los ratones.	
	Al final del experimento, se sacrificaron los ratones. La sección tratada de la cola ~ 2,5 cm se eliminó y se fijó en formalina al 4 %.	En el día 7
	Las secciones histológicas longitudinales de la cola tratada se prepararon en el departamento de patología. 10 secciones / cola. La evaluación del % de ortoqueratosis fue realizada por el laboratorio de dermatología.	

**Tabla 2**

Formulación	% de ortoqueratosis / escala
Vehículo (ungüento basado en PEG)	24,1 ± 7,3
Control activo (disponible comercialmente)	35,4 ± 14,2
50 µg / g de calcipotriol y 0,7 mg / g de nicotinamida	47,4 ± 12,5
50 µg / g de calcipotriol y 2,1 mg / g de nicotinamida	94,3 ± 14,1
50 µg / g de calcipotriol y 6,3 mg / g de nicotinamida	77,4 ± 22,3
50 µg / g de calcipotriol y 18,9 mg / g de nicotinamida	65,4 ± 27,0

[0154] La Figura 2A es un gráfico que muestra los niveles de ortoqueratosis inducidos en las colas de los ratones por varias composiciones de la invención. Específicamente, se muestra la optimización de la concentración de NA en una composición que comprende 50 µg / g de calcipotriol. La Figura 2B muestra el nivel de la actividad del fármaco en las diferentes formulaciones según la presente invención.

[0155] Los dos gráficos muestran que las composiciones que incluyen 50 µg / g de calcipotriol y todas las concentraciones probadas de NA dieron mejores resultados que la composición comercialmente disponible (Daivonex) de 50 µg / g de calcipotriol. Los mejores resultados se obtuvieron por una composición de 50 µg / g de calcipotriol y 2,1 mg / g de NA (II). Los números romanos I, II, III y IV se refieren a las composiciones de 50 µg / g de calcipotriol y 0,7 mg / g (I); 2,1 mg / g (II); 6,3 mg / g (III) o 18,9 mg / g (IV) de nicotinamida.

Ejemplo 4: formulaciones

Método de preparación de la formulación del fármaco

[0156] Se disolvió calcipotriol en propilenglicol (PG). El 5 % p / p de la solución de calcipotriol se mezcló con 95 % p / p de la formulación de base basada en PEG. Se añadió nicotinamida a la solución de calcipotriol directamente o junto con vitamina E a la mezcla fundida de PEG – 4000 y Steareth – 20 en PEG – 400 a 45 °C para conseguir una concentración final de formulación de 2,1 mg / g de NA / g.

[0157] La Tabla 3 muestra una formulación de base basada en PEG de la invención.

**Tabla 3: formulación de base**

Ingredientes	% p / p
Vitamina E	0,30
Steareth 20 (Lipocol S20)	2,00
PEG – 400	77,70
PEG - 4000	20,00
Total	100,00

Métodos detallados de preparación

5 [0158] Se añadió un (1) mg de calcipotriol a un ml de PG en un baño de agua a 40 °C mezclándolo ligeramente hasta que se disolvió todo el calcipotriol y no se observaron cristales. Esta solución es adecuada para una preparación de 20 g (conc. final de 50 µg / gr).

[0159] Se fundieron junto PEG – 4000 y Steareth – 20 en PEG – 400 en una baño de agua (~ 60 °C) y se mezclaron bien hasta homogeneidad. La mezcla se enfrió por debajo de 50 °C.

10 [0160] Se añadieron vitamina E y calcipotriol / PG a PEG – 4000 y Steareth – 20 en una mezcla de PEG – 400 en una relación de 5 % p / p de solución CP en PG con mezcla al 95 % p / p.

15 [0161] Alternativamente, se puede añadir nicotinamida con la vitamina E: 42, 0 mg de NA para una preparación de 20 g (conc. final de NA de 2,1 mg / gr), o se puede disolver en la solución de calcipotriol.

[0162] La mezcla se mezcló bien y se llenaron los tubos.

Ejemplo 5: efecto sinérgico de calcipotriol y NA *in vivo*.

20 [0163] Los estudios *in vivo* dirigidos para medir la actividad antipsoriásica (potencia) de las composiciones que comprenden NA y calcipotriol utilizan la prueba de la cola de ratón estándar (véase el Ejemplo 3). La inducción de una capa granular (ortoqueratosis o maduración normal) en las áreas de escala de la piel de la cola de ratón y / o maduración anormal (paraqueratosis) es un parámetro relevante de la actividad antipsoriásica.

25 [0164] La prueba se realizó a gran escala, con 100 mediciones de cada una de placebo (PL), 5 µg / g de calcipotriol (CP) y una mezcla de calcipotriol y nicotinamida (CPNA). Se obtuvieron 90 mediciones por 2,1 mg / gr de nicotinamida (NA).

30 [0165] Todos los ratones que participaron fueron asignados al azar antes de la evaluación y los tratamientos se reasignaron a puntos de datos solo después de completarse el análisis microscópico en un procedimiento completamente ciego.

35 [0166] Los tratamientos se analizaron utilizando un procedimiento de ANOVA para todos los tratamientos. El tratamiento con CP o NA solo proporcionó buenos resultados pero el tratamiento con CPNA fue significativamente mejor, lo que indica un efecto sinérgico de CP y NA.

[0167] Las medias y sus desviaciones estándar obtenidas se proporcionan a continuación en la Tabla 4:

**Tabla 4**

Tratamiento	Media	Desviación estándar
PL (placebo)	0,3030	0,0085
CP	0,4449	0,0085
NA	0,4651	0,0090
CPNA	0,9596	0,0085

40 [0168] Para los puntos de dosis única por tratamiento era posible evaluar una estimación de S del efecto sinérgico mediante el cálculo de una relación de los resultados del tratamiento combinado en una suma de los tratamientos distintos, en el que todos los tratamientos se ajustaron restando el resultado placebo de cada uno de los resultados separados, como en la siguiente ecuación:  $S = (CPNA - PL) / \{(CP - PL) + (NA - PL)\}$

50 [0169] Se estimó el valor de S en 2,6 con una estimación de su error típico: 0,0211. Por tanto, es evidente que existe sinergismo entre CP y NA en las condiciones de la prueba realizada.

55 [0170] La Tabla 5 muestra a continuación los resultados de esta evaluación.

**Tabla 5**

Formulación	% de ortoqueratosis / escala
Placebo (PL) (vehículo)	30,3 ± 4,4
Calcipotriol /CP) 50 µg / g	44,5 ± 6,1
Nicotinamida (NA) 2,1 mg / g	46,5 ± 9,2
(CP + NA) combinado	96,0 ± 10,6

60 [0171] La Figura 3 es un gráfico que representa los resultados del análisis anterior. El efecto sinérgico de calcipotriol y nicotinamida en las concentraciones anteriormente mencionadas es evidente (CP + NA) combinado)).

Ejemplo 6: Irritación / corrosión dérmica aguda en conejos

- 5 **[0172]** Este estudio realizado cumple con: Los principios de buenas prácticas de laboratorio de la OECD (revisado en 1997); Serie de publicaciones sobre la seguridad, salud y el medio en los principios de buenas prácticas de laboratorio y vigilancia del cumplimiento de la OECD - Número 1. ENV / MC / CHEM (98) 17; Directrices de la OECD para los ensayos de productos químicos, Sección 4, Nº. 404, "Irritación / Corrosión dérmica aguda", aprobada el 24 de abril de 2002; e ISO 10993 - 10: 2002 (E) Segunda edición 01 de septiembre de 2002, Evaluación biológica de dispositivos médicos - Parte 10: Tests de Irritación e hipersensibilidad de tipo retardado. Sección 6.3 test de irritación de piel en animales.
- 10
- [0173]** Objetivo: evaluación del potencial de los elementos de la prueba para producir irritación / corrosión dérmica mediante la aplicación de una dosis única al conejo, proporcionando así información sobre los posibles riesgos para la salud que puedan derivarse de la exposición de la piel a la sustancia de prueba en condiciones de su uso proyectado como un agente terapéutico para la psoriasis.
- 15
- [0174]** Material de prueba: calcipotriol + nicotinamida (NA) en las concentraciones siguientes: 50 microgramos / gramo de calcipotriol, 2,1 miligramos / gramo de NA en una base de PEG.
- 20
- [0175]** Sistema de prueba: Conejo hembra de Nueva Zelanda blanco (NZW) de 3 – 4 meses de 2 kg al comienzo del estudio. Los animales se aclimataron durante al menos 5 días. Un veterinario examinó el estado de salud de los animales a su llegada utilizados en este estudio. Solo los animales con buen estado de salud se aclimataron a las condiciones del laboratorio y se utilizaron en el estudio.
- 25
- [0176]** Alojamiento: Los conejos se alojaron de forma individual en jaulas de acero inoxidable montadas en baterías. Las jaulas medían 60 (L) x 50 (A) x 45 (A) cm más una plataforma de tamaño 50 (L) x 20 (A) cm colocado a 20 cm sobre el suelo de la jaula. A los conejos se les equipó con suelos de plástico perforados en bandejas.
- 30
- [0177]** Alimentación y agua: A los animales se les proporcionó una dieta comercial de 100 g / conejo / día y se les permitió tener libre acceso al agua potable suministrada a cada jaula a través de botellas con tubos con pitorro de acero inoxidable. El agua se filtró (filtro de 0,1 µ), se trató con cloro, se acidificó y se controló de los contaminantes dos veces al año.
- 35
- [0178]** Ambiente: Las condiciones ambientales controladas automáticamente se ajustaron para mantener una temperatura de 17 – 23 °C con humedad relativa (HR) del 30 – 70 %, un ciclo de luz de 12 horas / oscuridad 12 horas y cambios de aire de 15 – 30 h en la sala de estudio. Se controlaron la temperatura y la HR diariamente. El ciclo de luz se controló por ordenador.
- 40
- [0179]** Identificación: El criador identificó a los animales mediante un tatuaje o un número marcado en la oreja. Este número aparece también en una tarjeta en la jaula visible en la parte frontal de cada jaula. La tarjeta de la jaula contenía adicionalmente el número de estudio y los detalles relevantes como el grupo de tratamiento y el nivel de dosis.
- 45
- [0180]** Final: Se sacrificaron los conejos mediante una sobredosis IV de NA – pentobarbital (75 mg / kg), en el momento en el que el animal presente signos de dolor intenso o sufrimiento o en caso de que se requiera un examen histopatológico para esclarecer las respuestas equívocas.
- 50
- [0181]** Justificación: Se seleccionó al conejo albino para este estudio ya que es la especie de elección especificada por las directrices de la OECD y EPA para su uso en pruebas de irritación / corrosión dérmica.
- 55
- [0182]** Dosis: 0,5 g / animal.
- Procedimientos de la prueba:
- 60
- [0183]** Principios de la prueba: el método secuencial aplicado en este estudio representa un procedimiento paso a paso destinado a evitar el uso innecesario de animales. La prueba se realizó inicialmente con un solo animal. Dependiendo de los resultados, se realizó una prueba de confirmación utilizando animales adicionales. El artículo para prueba se aplicó en una dosis única a la piel del animal de prueba. Las áreas adyacentes de la piel sin tratar de cada animal sirvieron como control. Se evaluó el grado de irritación / corrosión y se anotó en intervalos específicos.
- 65
- [0184]** Preparaciones antes de la prueba de animales: 24 horas antes de la prueba, se eliminó el pelo cortando cerca del área dorsal del tórax de los animales utilizando una maquinilla eléctrica. Se tuvo cuidado en evitar la corrosión de la piel y solo se utilizaron los animales con la piel intacta y sana. Las áreas del caso donde se observó un crecimiento denso de pelo no se utilizaron como sitios de prueba.
- [0185]** Aplicación del artículo para prueba: El artículo para prueba se aplicó directamente a la piel, o en una gasa

(6 cm<sup>2</sup>), que se aplica inmediatamente después y directamente a la piel. El parche se mantiene en contacto con la piel con un esparadrápno irritante y un apósito semioclusivo adecuado (vendaje TUBIGRIP) para mantener el la gasa y el artículo para prueba durante el periodo de exposición de 4 horas y para asegurar que el animal no pueda ingerir el artículo para prueba. El área de piel sin tratar de cada animal sirve como control. El artículo para prueba se aplicó secuencialmente de la siguiente manera:

**[0186] Prueba inicial:** Se aplicó un solo parche a un animal durante 4 horas. (si se hubiese observado corrosión dérmica, el estudio hubiese finalizado inmediatamente).

**[0187] Prueba de confirmación:** No fue necesaria. Si se hubiese observado un efecto irritante en la prueba inicial, la prueba de confirmación se habría llevado a cabo de manera secuencial o mediante la exposición simultánea de dos animales adicionales.

**[0188] Periodos de exposición y retirada de los parches:** Al final del periodo de exposición de 4 horas, el artículo para prueba residual se retiró utilizando agua del grifo o un disolvente adecuado sin alterar la respuesta existente o la integridad de la epidermis. Los márgenes del sitio de prueba se marcaron con tinta no irritante e indeleble para facilitar las sesiones de observación posteriores.

**[0189] Analgesia:** Se puede utilizar un analgésico opioide en una base caso por caso en vista de las consideraciones del bienestar animal para el uso de animales de laboratorio en investigación.

Observaciones:

**[0190] Periodo de observación:** La duración del periodo de observación debe ser suficiente para evaluar por completo la magnitud y reversibilidad de los efectos observados. Sin embargo, el experimento habría finalizado en el momento en el que los animales muestren signos continuos de dolor o sufrimiento intenso. Los animales que no desarrollan lesiones de la piel se observan durante un periodo de 72 horas después de la retirada de los parches. Pueden ser necesarias más observaciones para establecer la reversibilidad hasta 14 días después de la aplicación. En caso de periodo de observación prolongado de más de 72 horas, se observa cada animal hasta que se vea reversibilidad, o hasta un máximo de 14 días.

**[0191] Observaciones clínicas y graduación de las reacciones de la piel:** Todos los animales fueron examinados para detectar signos de eritema y edema, y las respuestas se anotaron 1, 24, 48 y 72 horas después de retirar el parche. Para la prueba inicial en un animal, el sitio de prueba se examinó también inmediatamente después de haber retirado el parche. Si se observaron los animales durante un máximo de 14 días, se realizarán otros exámenes una vez al día después de retirar el parche para determinar el estado de las lesiones y su reversibilidad. Se registraron los grados de las reacciones de la piel en cada examen.

**[0192]** Las reacciones dérmicas diferentes a las mencionadas (por ejemplo, alopecia en un área limitada, hiperqueratosis, hiperplasia y descamación) se registraron por separado y se anotaron (aunque no se calculó en el índice de irritación primaria) según una escala de calificación de 4 puntos en orden ascendente de gravedad (0 = ninguno; 1 = leve; 2 = moderado, 3 = grave).

**[0193]** Además, el examen de los efectos sistémicos adversos se realizó al menos una vez al día o con mayor frecuencia cuando se indicó la respuesta de los animales al tratamiento.

**[0194] Puntos finales humanitarios:** Los animales que se encuentran en condiciones moribundas y los animales que muestran dolor intenso y signos continuos de sufrimiento intenso son sacrificados en condiciones decentes.

**[0195] Peso corporal:** Se realizó la determinación del peso corporal individual antes de la aplicación del artículo para prueba y después de finalizar del estudio. Para los animales observados hasta 14 días, se realizaron determinaciones del peso corporal adicionales a los 7 y 14 días después de retirar el parche.

**[0196] Patología:** Con la discreción del director del estudio y en espera de las reacciones observadas, se realizaron exámenes histopatológicos para esclarecer las reacciones dudosas.

**[0197] Evaluación de los datos: índice de irritación primaria (IIP):** La evaluación final de los efectos de irritación potenciales del artículo para prueba se basó en determinar el índice de irritación primaria (IIP)<sup>(c)</sup> según los pasos de cálculo que se muestran a continuación. Solo se utilizaron las calificaciones de observación a las 24, 48, 72 horas para calcular el IIP. Cualquier observación realizada antes de la aplicación o después de las 72 horas estimadas para la recuperación del control, no se utilizó en la determinación.

**[0198]** Para cada animal, las calificaciones de irritación del eritema y edema se calcularon para obtener el índice de irritación primaria (IIP).

5

Respuesta de irritación	Categorías en el conejo
Categoría de respuesta	Calificación media
Insignificante	0 a 0,4
Leve	0,5 a 1,9
Moderado	2 a 4,9
Grave	5 a 8

10 **[0199]** Cuando las respuestas como alopecia (área limitada), hiperqueratosis, hiperplasia y descamación persisten al final del periodo de observación, el artículo para prueba se consideraría un irritante.

Definiciones (según las directrices de EPA y OEDC):

15 **[0200]** Irritación dérmica es la producción de los cambios inflamatorios reversibles o cualquier daño en la piel después de aplicar una sustancia de prueba en un máximo de 4 horas.

20 **[0201]** Corrosión dérmica es la producción del daño tisular irreversible en la piel después de la aplicación de una sustancia de prueba (concretamente, necrosis visible a través de la epidermis y en la epidermis después de la aplicación de una sustancia de prueba en un máximo de cuatro horas. Las reacciones corrosivas son normalmente úlceras, sangrado, costras sangrantes, y al final de la observación de 14 días, decoloración debido al blanqueo de la piel, áreas completas de alopecia, y cicatrices).

25 **[0202]** Resultados: La reacción dérmica consistía únicamente de eritema con una incidencia en 2 de los 3 animales probados. El inicio del eritema era o bien de inmediato o 1 hora después de retirar el parche. Un eritema de un animal se clasificó con grado 2 (bien definido) en el momento inmediato después de retirar el parche pero a partir de ese momento disminuyó a 1 (muy leve); en otro eritema de animal se clasificó con grado 1. La recuperación se anotó con el primero a las 72 horas después de retirar el parche, y en el segundo a las 24 horas del momento de observación.

30 **[0203]** No son evidentes los signos clínicos sistémicos perceptibles en la reacción al tratamiento en cualquiera de los animales durante todo el periodo de estudio.

**[0204]** No se anotaron cambios inusuales en el peso corporal.

35 **[0205]** Conclusión: En consideración al índice de irritación primaria (IIP), se considera que el nivel irritante de la composición de la presente invención es un irritante dérmico "insignificante". Este resultado indica que la combinación de CP y NA proporciona una formulación con menor irritación dérmica que la formulación que consta solo de CP.

40 **[0206]** Por el contrario, la crema de Daivonex® (Leo) se acompaña de una ficha de datos que muestra un nivel del 31,8 % de eventos adversos en los pacientes. Estos eventos adversos incluyen *inter alia* irritación lesional y perilesional (13,9 %) e irritación en cara y / o cuero cabelludo (10,6 %).

45 Ejemplo 7: penetración en la piel de calcipotriol y nicotinamida a partir de tres formulaciones tópicas: combinación de NA, CP y CP – NA

50 **[0207]** El objetivo del presente estudio fue medir el comportamiento de penetración en la piel de calcipotriol y nicotinamida a partir de tres formulaciones tópicas: una composición con solo NA, una composición con solo calcipotriol y una composición con NA y calcipotriol.

Estudio farmacocinético

55 **[0208]** Calcipotriol: El calcipotriol se comercializa normalmente en una concentración de 0,005 % en forma de loción, crema, gel, ungüento o solución para el cuero cabelludo. La dosis semanal se limita a 100 g por semana de crema o ungüento o 60 ml por semana de solución para el cuero cabelludo para prevenir la irritación de la piel y la hipercalcemia transitoria.

60 **[0209]** Nicotinamida: La nicotinamida (NA) es una amida soluble en agua de ácido nicotínico y es una de las dos formas principales de la vitamina del complejo B, B<sub>3</sub>. La farmacocinética de la NA depende de la dosis, especie, género, y vía de administración. Se descubrió que el gel tópico de nicotinamida al 4 % tiene una eficacia comparable al 1 % de gel de clindamicina en el tratamiento de acné vulgaris (Shalita, et al 1995).

Formulaciones y métodos

65 **[0210]** Se prepararon tres formulaciones. La primera comprendía nicotinamida (NA, 2,1 mg / g), la segunda calcipotriol (CP, 50 µg / g) y la tercera una combinación de calcipotriol (50 µg / g) y nicotinamida (2,1 mg / g) (CPNA).

Medidas de penetración en la piel

5 [0211] El conjunto de celdas de Franz y la piel de la oreja de cerdo se utilizaron para medir la penetración de los fármacos a través de la piel *in vitro* a partir de diversos sistemas y formas de dosificación (Dick et al. 1992; Simon, et al. 2000; Touitou et al. 1998; Chien 1992). Los experimentos se realizaron *in vitro* utilizando el conjunto de celdas de difusión de Franz y el grosor total de la piel de la oreja de cerdo. Las celdas de difusión están hechas a partir de un material inerte y el conjunto permite una buena mezcla de fluido en el receptor y el control de temperatura.

10 [0212] La piel de la oreja de cerdo se escindió desde la parte externa de la oreja y se separó desde el cartílago subyacente. La piel se almacenó congelada a - 20 °C hasta su uso, siempre menos de una semana. Justo antes del experimento, la piel se descongeló a temperatura ambiente durante 1 hora y se cortó el pelo. Se comprobó la integridad de la piel, a continuación se cortó y se montó en las celdas de difusión con la capa córnea hacia el compartimento donante. Se colocó una cantidad de 100 mg de formulación de prueba en 1,77 cm<sup>2</sup> de piel en el compartimento donante. El compartimento receptor se llenó con etanol:agua (3:7) para mantener las condiciones de pseudo – absorción en el sistema. Los receptores se mantuvieron a 37 °C y se agitaron para asegurar el medio homogéneo durante el experimento.

20 [0213] Se llevaron a cabo experimentos sin ocluir durante 12 horas. Las muestras se retiraron del receptor a las 1, 2, 4, 6, 9, 11 y 12 horas. Las muestras se analizaron para las concentraciones de nicotinamida y calcipotriol por HPLC como se ha descrito. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se utilizaron un total de 24 células, 8 células para cada formulación probada (NA, CP, CPNA).

25 [0214] En cuanto a los productos tópicos, se utilizaron procedimientos de dosis finita. El donante se dejó expuesto a condiciones atmosféricas; esto imita la situación de uso clínico.

Métodos

[0215] Se probó cada formulación en ocho trozos de piel. Se utilizaron un total de 24 trozos.

30 [0216] Ensayos por HPLC: Los ensayos por HPLC de nicotinamida y calcipotriol se realizaron de la siguiente manera: la nicotinamida se analizó en un LC Waters Alliance 2795 y sistema LC – MS con cromatógrafo de HPL Quattro micro™ y con Hypersil BDS C18, 3 µm, columna de 150 x 2,1 mm (CN 28103 - 152130, lote # 4796). El ensayo se realizó con una fase móvil compuesta de TFA al 0,1 % en agua: acetonitrilo (9:1) en un flujo de 0,23 mL / min.

35 [0217] El calcipotriol se analizó en un cromatógrafo de HPL TSP con detector UV con de con un sistema por HPLC de flujo celular a 266 nm. La separación se realizó utilizando Hypersil ODS 2, 5 µm, columna de 250 x 4,6 mm (CN 31605 - 020, lote # 5 / 120 / 5745) con una fase móvil que contiene agua: acetonitrilo (4:6) en un flujo de 1,8 mL / min.

40 [0218] Las soluciones hidroetanólicas de nicotinamida y calcipotriol se utilizaron para curvas de calibración y como estándares externos.

Resultados

45 [0219] Los resultados de penetración en la piel son dados como:

- 50 1. **Q<sub>r</sub>** – cantidad de la molécula permeante en el receptor en cada intervalo de tiempo del experimento (media ± DE).
2. **Q<sub>r12</sub>** – Cantidad de la molécula permeante que penetra en la piel durante 12 horas y se acumula en el receptor (media ± DE).
- 55 3. **Perfiles de penetración en la piel** – cantidad de fármaco acumulado que penetra en la piel contra el tiempo.

Penetración de calcipotriol de las formulaciones de CP y CPNA.

60 [0220] No se detectó calcipotriol en el ensayo por HPLC en el compartimento receptor de cualquier célula durante el experimento de penetración de 12 horas. Se descubrió que el nivel de cuantización inferior (QL) de calcipotriol en la solución de etanol – agua era de 1,3 ng / mL. Por tanto, el calcipotriol de la presente formulación no penetra en la piel.

65 [0221] Sin desear quedar ligado a la teoría, la falta de penetración de calcipotriol en la piel propone numerosas ventajas de la presente formulación incluyendo

a) un mayor nivel de seguridad debido a la eliminación de los efectos secundarios sistémicos, tales como hipercalcemia a menudo observada en pacientes que utilizan calcipotriol disponible comercialmente; y

5 b) un nivel elevado de eficacia ya que el calcipotriol permanece en la superficie de la piel en contacto con sus células diana, los queratinocitos.

Penetración de nicotinamida de las formulaciones – NA y CPNA

10 [0222] Se resumen en la Tabla 6 la cantidad (Qr) de nicotinamida que penetra en la piel de las formulaciones de NA y CPNA.

**Tabla 6: nicotinamida que penetra en la piel de las formulaciones de NA y CPNA**

Tiempo, horas	Formulación			
	NA		CPNA	
	Qr media, ng	DE	Qr media, ng	DE
0	0	0	0	0
1	848	102	842	88
2	1012	185	1006	145
4	1354	178	1352	192
6	1635	200	1746	277
9	1832	235	2418*	597
11	2010*	352	2665**	927
12	2149	393	2977	921
* n = 7 ** n = 6				

Ejemplo 8: Ensayo clínico de fase I / IIa: tratamiento innovador no esteroideo para la psoriasis moderada

30 [0223] Sustancia activa: “formulación de CNPA”: 0,05 % de calcipotriol y 0,21 % de nicotinamida en una base de vitamina E al 0,3 %; Steareth 20 al 2 %; PEG – 400 al 77, 7 % y PEG – 4000 al 20 %.

35 [0224] Metodología: estudio comparativo activo controlado multicéntrico, doble ciego, y aleatorizado con placebo.

[0225] Objetivos principales: Los objetivos principales de este estudio fueron a) evaluar la seguridad y eficacia de la aplicación tópica de la formulación de CNPA administrada dos veces al día durante 8 semanas en pacientes con psoriasis moderada; y b) determinar que la formulación de CPNA no sea inferior al competidor Daivonex® (Leo).

40 [0226] Objetivos secundarios: Los objetivos secundarios de este estudio son: a) PGA (evaluación global efectuada por el médico) puntuación del seguimiento; b) PSA (autoevaluación del paciente) puntuación del seguimiento; c) efecto duradero tras el tratamiento; d) el tratamiento de la formulación de CPNA no tiene efecto rebote como es común en determinados tratamientos de psoriasis, en especial las composiciones basadas en esteroides. Puntuación PGA (Gottlieb et al, 2003): en la visita de evaluación, primera visita (V1) y en las siguientes visitas, la evaluación de la psoriasis se realizará utilizando la puntuación PGA. La evaluación global efectuada por el médico (PGA) proporciona al investigador una estimación única de la gravedad general de la enfermedad del paciente. Se utilizó una escala de siete puntos de blanqueada a grave que se representa en la Tabla 7.

**Tabla 7: Puntuación PGA**

Puntuación 7	Grave: elevación de la placa muy marcada, escamas y / o eritema.
Puntuación 6	Moderada a grave: elevación de la placa marcada, escamas y / o eritema.
Puntuación 5	Moderada: elevación de la placa moderada, escamas y / o eritema.
Puntuación 4	Leve a moderada: intermedio entre moderado y leve.
Puntuación 3	Leve: elevación de la placa leve, escamas y / o eritema.
Puntuación 2	Casi blanqueada: intermedio entre leve y claro
Puntuación 1	Blanqueada: sin signos de psoriasis.

60 [0227] La puntuación PASI (Feldman and Krueger, 2005): en la visita de evaluación, primera visita (V1) y en las siguientes visitas, la evaluación de la psoriasis se realizará utilizando el índice de severidad y área de la psoriasis (PASI).

65 [0228] Puntuación de los síntomas: eritema (E), induración (I) y escala (E) se marcarán utilizando la escala que se



muestra a continuación en la tabla 8.

**Tabla 8: Puntuación de síntomas**

Puntuación	Definición
0	Ninguna
1	Leve
2	Moderada
3	Grave
4	Muy grave
% de puntuación del área: se atribuirá a cada área corporal una puntuación del área como se muestra en la tabla 9:	

**Tabla 9: Puntuación de síntomas**

Puntuación	Área involucrada
0	0
1	1 % - 9 %
2	10 % - 29 %
3	30 % - 49 %
4	50 % - 69 %
5	70 % - 89 %
6	90 % - 100 %

**[0229]** La puntuación PASI se calculó de la siguiente manera:

**PUNTUACIÓN PASI = 0,1 [(E + I + E) X puntuación del área] cabeza + 0,2 [(E + I + E) x puntuación del área] extremidades superiores + 0,3 [(E + I + E) x puntuación del área] tórax + 0,4 [(E + I + E) x puntuación del área] extremidades inferiores**

**[0230]** Autoevaluación del paciente. la tolerancia El paciente tenía la obligación de evaluar en general del efecto del tratamiento y a las dos semanas de visitas (V2) y en las siguientes visitas mediante la puntuación general (de la eficacia y tolerancia). Además, en la primera visita (V1), el paciente utilizó la misma puntuación de eficacia para describir el estado de la enfermedad al comienzo del ensayo. La autoevaluación del paciente tiene definiciones de 5 grados (utilizadas para (i) la eficacia (Tabla 10A) y (ii) tolerancia (Tabla 10B)):

**Tabla 10A**

Puntuación de eficacia	Definición
1	Muy pobre
2	Pobre
3	No sabe
4	Buena
5	Muy buena

**Tabla 10B**

Puntuación de tolerancia	Definición
1	Muy pobre
2	Pobre
3	No sabe
4	Buena
5	Muy buena

**[0231]** *Número de pacientes asignados al azar:* 120 pacientes se inscribieron y asignaron al azar en tres grupos: Placebo, formulación CP - NA y Daivonex (40 pacientes por grupo).

**[0232]** *Tratamiento del estudio:* formulación de CP – NA, placebo y el producto de la competencia. Todos los tratamientos se aplicaron dos veces al día por la mañana y antes de acostarse durante 8 semanas utilizando aplicación tópica.

**[0233]** *Duración del tratamiento:* 8 semanas, después de 4 – 8 semanas de periodo de lavado previo, se es necesario, para el primer tratamiento.

**[0234]** *Periodo de seguimiento:* 4 semanas (después del último tratamiento).

5 **[0235]** *Criterios de inclusión:* hombre o mujer con edad superior a los 18 años; paciente con antecedentes médico de psoriasis leve; paciente con una puntuación PASI menor a 14; paciente con una prueba de embarazo en orina negativa en la inclusión de mujeres en potencial edad fértil y uso de un anticonceptivo eficaz (anticonceptivos orales, DIU, o ligadura de trompas), paciente que acepta participar en el estudio y que firma un consentimiento informado por escrito.

**[0236]** *Criterios de exclusión:* paciente tratado con tratamiento tópico para la psoriasis leve en un mes antes de la inclusión en el estudio (corticoides, retinoides, derivados de la vitamina D).

10 **[0237]** Paciente tratado con tratamiento sistémico de psoriasis (biológicos, metotrexato, ciclosporina, retinoides) dos meses antes de la inclusión en el estudio; paciente que empezó o modificó un tratamiento con beta bloqueadores dos meses antes de la inclusión en el estudio; paciente que tiene una o más formas de: psoriasis en el cuero cabelludo, psoriasis en uñas, psoriasis flexural, psoriasis palmoplantar, psoriasis pustulosa, mujer embarazada o que está amamantando que no utiliza anticonceptivos, paciente con antecedentes médicos de hipersensibilidad a Daivonex, paciente que ha participado en un ensayo clínico tres meses antes de la inclusión, paciente que tiene  
15 historial de enfermedad médica / psiquiátrica o cirugía que, a juicio del investigador, puede interferir con el metabolismo de la medicación del estudio y / o implementación del estudio y / o evaluación de parámetros del estudio, paciente que es incapaz de comprender la información (por razones lingüísticas o mentales) y dar su consentimiento informado para participar en el estudio, paciente dispuesto a dar su consentimiento informado para  
20 participar en el estudio, paciente que se encuentra en custodia.

25 **[0238]** *Criterios de evaluación:* los criterios principales para evaluar la eficacia de los tratamientos serán la puntuación PASI y la puntuación PGA (Gottlieb, et al, 2003; Feldman and Krueger, 2005). Las medidas se tomarán a las 0, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas, evaluadas por los investigadores del ensayo. Los criterios secundarios serán: la autoevaluación del paciente en la eficacia y seguridad. Los datos se registrarán a las 0, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas.

30 **[0239]** *Análisis estadístico:* Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS® versión 9.1 de Windows® 2000 Terminal. Todas las estadísticas descriptivas han sido proporcionadas por grupo y en total. Las variables numéricas se tabularon utilizando la media, desviación estándar, mínimo, mediana, máximo y número de observaciones. Las variables categóricas se tabularon utilizando el número de observaciones y el porcentaje.

35 **[0240]** *Análisis de seguridad:* La seguridad y la tolerancia fueron evaluadas por el paciente y fueron registradas por el médico. Se han descrito todos los eventos adversos del "tratamiento emergente". Se expresaron el porcentaje, la frecuencia y la imputabilidad con el tratamiento de cada evento adverso.

### RESULTADOS PRELIMINARES

40 **[0241]** El promedio de mejora de la visita 1 a la visita 5 (basado en 115 sujetos ITT) mostró ser del 15,4 % para el grupo placebo y del 46 % (promedio del 52,7 % y 38,5 % en cada respectivo centro médico). Por tanto, la presente formulación muestra ser un tratamiento eficaz para la psoriasis.

45 **[0242]** Aunque se ha descrito particularmente la presente invención, los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse variaciones y modificaciones. Por tanto, la invención no debe interpretarse como limitada a las realizaciones particularmente descritas, en su lugar, el alcance, espíritu y concepto de la invención se entenderán más fácilmente en referencia a las reivindicaciones siguientes.

### REFERENCIAS

- 50 **[0243]**
- Bosman B, Matthiesen T, Hess V, Friderichs E. 1992. A quantitative method for measuring antipsoriatic activity of drugs by the mouse - tail model. *Skin Pharma* 5:41 - 48.
- 55 Chien, Y.W. 1992. *Novel Drug Delivery Systems*, Chapter 7, Marcel Dekker, New York, pág. 337 - 338.
- Dayan N, Touitou E. 2000. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. *Biomaterials*. 21:1879 - 85.
- 60 DeLuca, H. 1988. The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB* 2(3):224 - 236.
- Dick IP, Scott RC. 1992. Pig ear skin as an in vitro model for human skin permeability. *J Pharm Pharmacol*; 44:640 - 645.
- 65 Feldman, SR and Krueger, GG. 2005 Psoriasis assessment tools in clinical trials *Annals of the Rheumatic*

Diseases 64:ii65 - ii68.

- 5  
 Gottlieb AB, Chaudhari U, Baker DG, Perate M, Dooley LT. 2003. The National Psoriasis Foundation Psoriasis Score (NPF-PS) system versus the Psoriasis Area Severity Index (PASI) and Physician's Global Assessment (PGA): a comparison. *J Drugs Dermatol.* 2(3):260 - 6.  
 Harel A, Bloch O, Vardi P, Bloch K. 2002. Sensitivity of HaCat keratinocytes to diabetogenic toxins. *Biochem Pharmacol.* 15;63(2):171 - 8.
- 10  
 Lehmann B, Querings K, Reichrath J. 2004. Vitamin D and skin: new aspects for dermatology. *Exp Dermatol*,;13 Supl 4:11 - 5.
- 15  
 Morimoto S, Yoshikawa K, Kozuka T, Kitano Y, Imanaka S, Fukuo K, Koh E, Kumahara Y. 1986. An open study of vitamin D3 treatment in psoriasis vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 115(4):421 - 429.
- 20  
 Nikoloff, BJ, Fisher, GJ, Mitra, RS, Voorhees, JJ. 1988. Additive and Synergistic Antiproliferative Effect of Cyclosporin A and Gamma Interferon on Cultured Human Keratinocytes. *Amer. J. Pharmacol.*, 131:12 - 18.
- 25  
 Ohyama, Y and Yamasaki, Y. 2004. Eight Cytochrome P450s Catalyze Vitamin D Metabolism. *Frontiers in Bioscience* 9, 3007 - 3018.
- 30  
 Otonkoski T, Beattie GM, Mally MI, Ricordi C, Hayek A. 1993. Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. *J Clin Invest.* 92(3): 1459 - 66.
- 35  
 Paramio, JM, and Jorcano, JL. 1997. Role of protein kinases in the in vitro differentiation of human HaCat cells. *Brit. J. Dermatol.* 137:44 - 50.
- 40  
 Pipeleers D, Van de Winkel M. 1986. Pancreatic B cells possess defense mechanisms against cell-specific toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(14):5267 - 71.
- 45  
 Rindelov, LL. 1983. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for FACS DNA analysis, *Cytometry* 3(5)323 - 327.
- 50  
 Shalita AR, Smith JG, Parish LC, Sofman MS, Chalker DK. 1995. Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris. *Int J Dermatol.* 34:434 - 7.
- 55  
 Simon GA, Maibach HI. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2000; 13:229 - 34.
- 60  
 Steinert PM, Marekov LN. 1997. Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J Biol Chem.* 272(3):2021 - 30.
- 65  
 Sun T-T, Green, H. 1976. Differentiation of the epidermal keratinocytes in cell culture: formation of cornified envelope, *Cell*, 9:511 - 521.
- Touitou E, Meidan VM, Horwitz E. 1998. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *J Control Release* 56:7 - 21.
- Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. 1983. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry.* 3(5):323 - 7.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica de aplicación tópica que consta esencialmente de calcipotriol, nicotinamida, y un portador dermatológicamente aceptable basado en polietilenglicol, en la que el portador comprende PEG – 4000, PEG – 400 y alcohol estearílico polioxietilado (Steareth – 20).
- 10 2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicha composición consta esencialmente de calcipotriol, nicotinamida, una mezcla de PEG – 4000, PEG – 400 y Steareth – 20.
- 15 3. La composición farmacéutica según la reivindicación 2 que tiene la siguiente formulación:  
 10 µg / g a 100 µg / g de calcipotriol;  
 0,5 a 25 mg / g de nicotinamida;  
 70 % al 80 % (p / p) de PEG – 400;  
 15 % al 25 % (p / p) de PEG – 4000;  
 1 % al 5 % (p / p) de Steareth – 20;  
 0,1 al 1% (p / p) de vitamina E.
- 20 4. La composición farmacéutica según la reivindicación 3,  
 en la que el calcipotriol se proporciona en una concentración de 20 µg / g a 70 µg / g; o  
 en la que el calcipotriol se proporciona en una concentración de 50 µg / g; o  
 en la que el calcipotriol se proporciona en una concentración de 30 µg / g; o  
 en la que la nicotinamida se proporciona en una concentración de 0,5 a 25 mg / g; o  
 en la que la nicotinamida se proporciona en una concentración de 1 a 20 mg / g; o  
 en la que la nicotinamida se proporciona en una concentración de 2 mg / g a 10 mg / g; o  
 en la que la nicotinamida se proporciona en una concentración de 2,1 mg / g; o tiene la siguiente composición:  
 50 µg / g de calcipotriol;  
 2,1 mg / g de nicotinamida;  
 77,7 % (p / p) de PEG – 400;  
 20 % (p / p) de PEG – 4000;  
 2 % (p / p) de Steareth – 20; y  
 0,3 % (p / p) de vitamina E;
- 30 que tiene la siguiente formulación:  
 30 µg / g de calcipotriol;  
 2,1 mg / g de nicotinamida;  
 77,7 % (p / p) de PEG – 400;  
 20 % (p / p) de PEG – 4000;  
 2 % (p / p) de Steareth – 20; y  
 0,3 % (p / p) de vitamina E.
- 35 5. Una composición farmacéutica de aplicación tópica que comprende  
 10 µg / g a 100 µg / g de calcipotriol;  
 70 % al 80 % (p / p) de PEG – 400;  
 15 % al 25 % (p / p) de PEG – 4000;  
 1 % al 5 % (p / p) de Steareth – 20;  
 0,1 al 1% (p / p) de vitamina E.
- 40 6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, que tiene la siguiente formulación:  
 50 µg / g de calcipotriol;  
 77,7 % (p / p) de PEG – 400;  
 20 % (p / p) de PEG – 4000;  
 2 % (p / p) de Steareth – 20;  
 0,3 % (p / p) de vitamina E.
- 45 7. La composición farmacéutica según las reivindicaciones 5 – 6, en la que la composición comprende además nicotinamida en una concentración de 0,5 a 25 mg / g.
- 50 8. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 7 para el tratamiento de una enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel.
- 55 9. La composición farmacéutica según la reivindicación 8, en la que la enfermedad o trastorno hiperproliferativo

- de la piel se selecciona entre una enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel benigno y una enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel maligno, preferentemente en la que la enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel se selecciona entre psoriasis, queratosis solar, ictiosis, enfermedad de Grover, verrugas comunes, queratoacantoma, queratosis seborreica, esclerodermia, y seborrea, más preferentemente en la que la enfermedad hiperproliferativa es psoriasis, o preferentemente alternativamente en la que la enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel maligna se selecciona entre carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma de células basales (CCB).
- 5
10. El uso de una composición que consta esencialmente de calcipotriol en una concentración de 10 µg / g (microgramos por gramo) y 100 µg / g; y nicotinamida en una concentración entre 0,1 mg / g y 50 mg / g; y un portador dermatológicamente aceptable basado en polietilenglicol, en la que el portador comprende PEG – 4000, PEG – 400 y alcohol estearílico polioxielilado (Steareth – 20); para preparar una composición terapéutica para el tratamiento tópico de la enfermedad hiperproliferativa.
- 10
11. El uso según la reivindicación 10, en el que la composición terapéutica es un ungüento que tiene la siguiente formulación:
- 15
- 10 µg / g a 100 µg / g de calcipotriol;  
0,5 a 25 mg / g de nicotinamida;  
20 70 % al 80 % (p / p) de PEG – 400;  
15 % al 25 % (p / p) de PEG – 4000;  
1 % al 5 % (p / p) de Steareth – 20;  
0,1 al 1% (p / p) de vitamina E.
- 20
12. El uso según la reivindicación 10,  
en el que el calcipotriol se proporciona en una concentración de 20 µg / g a 70 µg / g; o  
en el que el calcipotriol se proporciona en una concentración de 50 µg / g; o  
en el que el calcipotriol se proporciona en una concentración de 30 µg / g; o  
en el que la nicotinamida se proporciona en una concentración de 0,5 a 25 mg / g; o en el que la nicotinamida  
30 se proporciona en una concentración de 1 a 20 mg / g; o en el que la nicotinamida se proporciona en una  
concentración de 2 mg / g a 10 mg / g; o  
en el que la composición terapéutica consta esencialmente de calcipotriol en una concentración de 50 µg / g;  
en el que la nicotinamida se proporciona en una concentración de 2,1 mg / g; o en el que la composición  
terapéutica tiene la siguiente composición:
- 35
- 50 µg / g de calcipotriol;  
2,1 mg / g de nicotinamida;  
77,7 % (p / p) de PEG – 400;  
20 % (p / p) de PEG – 4000;  
40 2 % (p / p) de Steareth – 20; y  
0,3 % (p / p) de vitamina E; o
- en el que la composición terapéutica tiene la siguiente composición:
- 45
- 30 µg / g de calcipotriol;  
2,1 mg / g de nicotinamida;  
77,7 % (p / p) de PEG – 400;  
20 % (p / p) de PEG – 4000;  
2 % (p / p) de Steareth – 20; y  
50 0,3 % (p / p) de vitamina E.
13. El uso según la reivindicación 10, en el que dicha composición terapéutica se proporciona en la forma  
seleccionada entre el grupo de solución acuosa, solución no acuosa, loción, crema, gel, ungüento, espuma,  
mousse, pulverizador, emulsión, y microemulsión.
- 55
14. El uso según la reivindicación 12, en el que dicha composición terapéutica se proporciona como crema, loción,  
gel o ungüento.
- 60
15. El uso según la reivindicación 10, en el que la enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel se selecciona  
entre una enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel benigno y una enfermedad o trastorno  
hiperproliferativo de la piel maligno.
- 65
16. El uso según la reivindicación 15,  
en el que la enfermedad o trastorno hiperproliferativo benigno se selecciona entre psoriasis, queratosis solar,  
ictiosis, enfermedad de Grover, verrugas comunes, queratoacantoma, queratosis seborreica, esclerodermia, y  
seborrea, preferentemente en el que la enfermedad hiperproliferativa es psoriasis; o

en el que la enfermedad o trastorno hiperproliferativo de la piel maligno se selecciona entre carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma de células basales (CCB).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1A

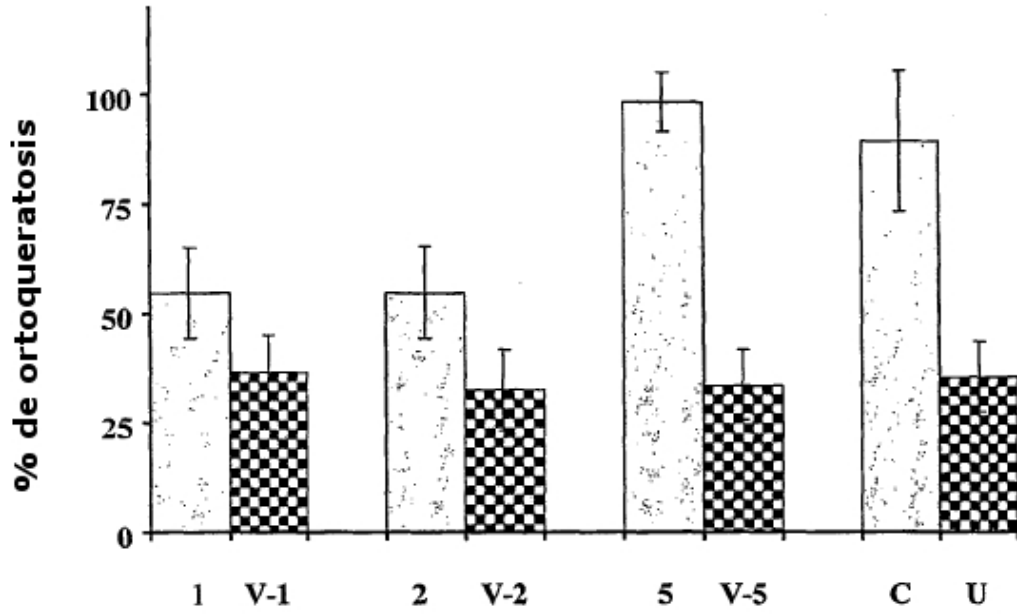
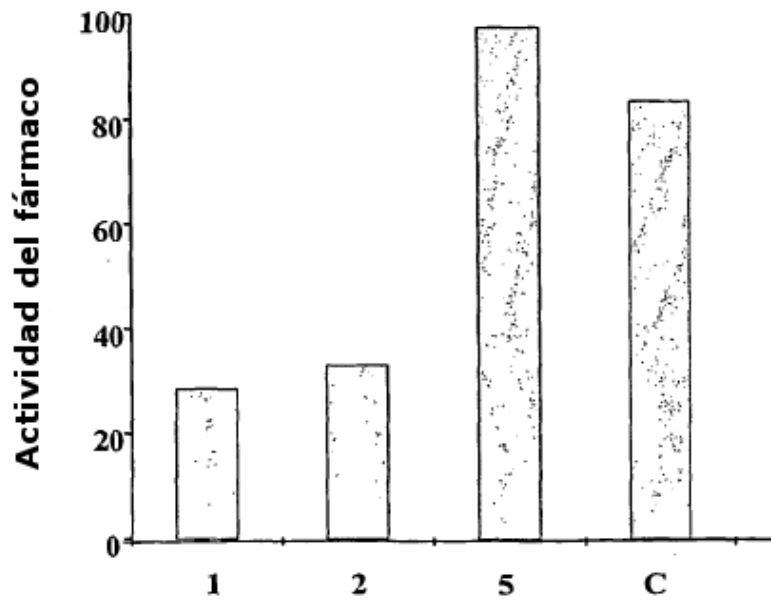
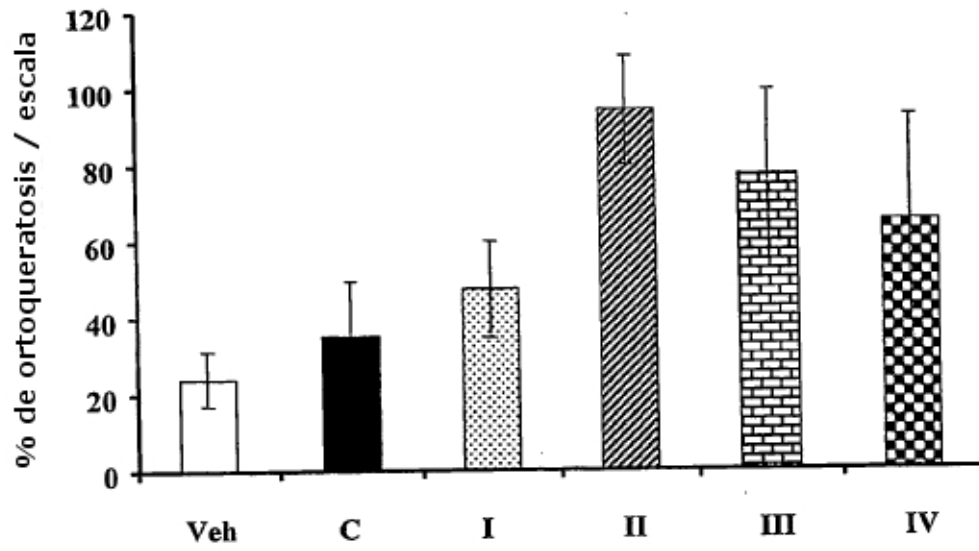


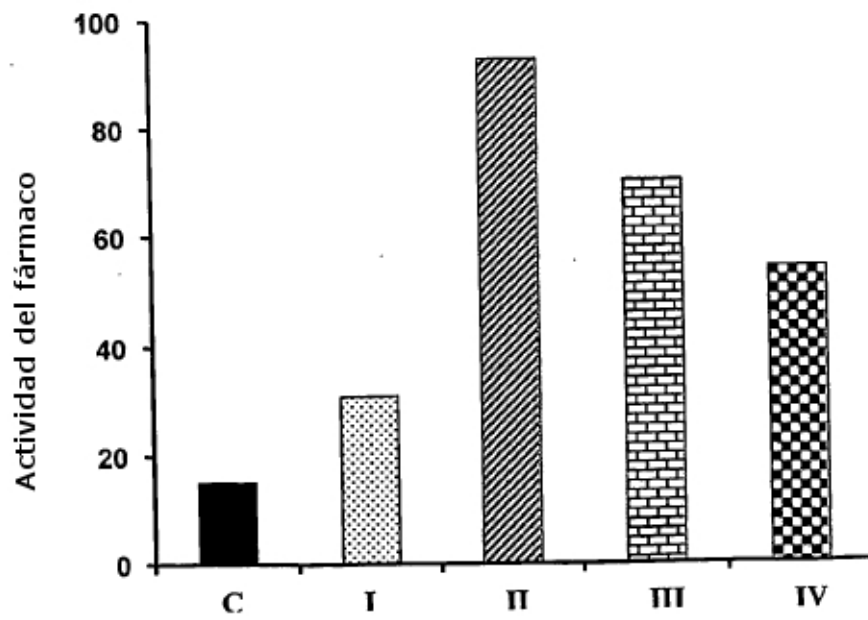
Figura 1B



**Figura 2A**



**Figura 2B**





**Figura 3**

