

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 855**

51 Int. Cl.:

A61K 38/51 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12726442 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2717907**

54 Título: **Uso de fotoliasa para la reducción o mejora del campo de cancerización subclínico asociado a la queratosis actínica**

30 Prioridad:

09.06.2011 ES 201130965 P
29.06.2011 US 201161502653 P
21.10.2011 ES 201131696 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2015

73 Titular/es:

ISDIN, S. A. (33.3%)
C/ Provençals 33
08019 Barcelona, ES;
HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA (33.3%) y
INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES
AUGUST PI I SUNYER (33.3%)

72 Inventor/es:

TRULLAS CABANAS, CARLOS RAMÓN;
PUIG I SARDA, SUSANA y
MALVEHY GUILERA, JOSEP

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 545 855 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

Uso de fotoliasa para la reducción o mejora del campo de cancerización subclínico asociado a la queratosis actínica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de enzimas del tipo fotoliasa para reducir o mejorar el campo de cancerización cutáneo subclínico que se asocia a la queratosis actínica o al cáncer de piel no melanoma (NMSC) y a métodos para el tratamiento terapéutico del campo de cancerización subclínico que se asocia a la queratosis actínica y/o al cáncer de piel no melanoma (NMSC).

Antecedentes de la invención

10 La queratosis actínica se define como una neoplasia maligna de los queratinocitos epidérmicos desencadenada por la exposición a la radiación ultravioleta y representa una etapa inicial en el proceso continuo desde la proliferación de queratinocitos atípicos hasta el desarrollo de un cáncer de piel no melanoma (NMSC).

15 Se conoce desde hace tiempo que el desarrollo de la queratosis actínica viene acompañado y frecuentemente precedido de alteraciones subclínicas en la epidermis que circunda o va a circundar a la lesión de queratosis actínica. Dichas alteraciones subclínicas conforman lo que ha venido en denominarse como campo de cancerización subclínico. Se ha observado que existe una elevada probabilidad de que se desarrollen lesiones de queratosis actínica y/o un cáncer de las células escamosas en el campo de cancerización (Boudewijn, J.M. et al. 2003. A Genetic Explanation of Slaughter's Concept of Field Cancerization: Evidence and Clinical Implications. Cancer Research 63:1727-1730). Se conoce como campo de cancerización cutáneo el área de la piel que comparte un riesgo genético de desarrollar carcinomas cutáneos debido al daño producido por la radiación ultravioleta. En él podemos encontrar áreas en las que ya existe lesión de queratosis actínica o de cáncer de piel no melanoma y que muestran daño a nivel celular (p.e. atipia celular) o histológico (p.e. paraqueratosis) pero también áreas morfológicamente normales en las que podemos identificar a nivel molecular los mismos cambios genéticos inducidos por la luz ultravioleta que caracterizan los carcinomas de células escamosas cutáneos, p.ej. mutaciones o cambios en la expresión del gen TP53 (Padilla, R.S. et al. 2010. Gene Expression Patterns of Normal Human Skin Actinic Keratosis, and Squamous Cell Carcinoma. Arch. Dermatol. 146(3):288-293). En la presente invención definimos campo de cancerización subclínico como aquella zona de la piel con cambios genéticos a nivel molecular (alteración del nivel de expresión de proteínas tales como TP53, p21 o PCNA y niveles de expresión disminuidos de genes tales como PPP1R14A (CPI-17)) inducidos por luz ultravioleta y que no muestran evidencia clínica de lesión de queratosis actínica o de cáncer de piel no melanoma.

20 Por ello, existe desde hace tiempo interés por encontrar terapias que sean capaces de reducir el campo de cancerización subclínico y opcionalmente, también las lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) ya presentes. Uno de los tratamientos más comunes es la aplicación tópica de una crema de Imiquimod al 5 %. La aplicación de dicha crema provoca una respuesta inflamatoria en el campo de cancerización mientras que no provoca dicha reacción en las células normales indicando una reacción específica con las células alteradas.

25 Por otro lado se ha descrito el uso de enzimas de tipo fotoliasa para reparar los daños causados al ADN por la radiación ultravioleta, más concretamente para eliminar los dímeros de bases pirimidínicas (CPDs) que se producen al ser expuesta la piel a la radiación ultravioleta (Stege, H. 2001. Effect of xenogenic repair enzymes on photoimmunology and photocarcinogenesis. Journal of Photochemistry 65:105-108). Según dicho artículo, la aplicación tópica de fotoliasa, además de la eliminación de los dímeros de bases pirimidínicas, permitió reducir la inmunosupresión inducida por radiación UVB.

30 En el mercado también se pueden encontrar cremas protectoras solares (ERYFOTONA® AK-NMSC de ISDIN, S.A.) que contienen fotoliasa en liposomas, recomendadas para prevenir la aparición de queratosis actínica y cáncer de piel no melanoma.

35 No obstante, no existía hasta la fecha ninguna evidencia de que la aplicación tópica de fotoliasa permita reducir o mejorar el campo de cancerización cutáneo subclínico que se asocia con la queratosis actínica y/o el cáncer de piel no melanoma (NMSC).

Sumario de la invención

40 La presente invención se refiere a enzimas del tipo fotoliasa para uso en el tratamiento tópico para reducir el riesgo de desarrollar lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) en pacientes humanos que tienen un campo de cancerización subclínico, en los que el campo de cancerización se caracteriza por niveles de expresión incrementados de TP53, p21 y/o PCNA, y/o niveles de expresión disminuidos de CPI-17 con respecto a los niveles de expresión en piel sana.

45 La presente invención se refiere también a fotoliasa para uso en el tratamiento tópico para reducir o mejorar el campo de cancerización subclínico asociado con queratosis actínica o con cáncer de piel no melanoma en un

paciente humano y a fotoliasa para uso en el tratamiento tópico para reducir el riesgo de desarrollar lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) en pacientes humanos que tienen un campo de cancerización subclínico. Los métodos de tratamiento que reducen el campo de cancerización subclínico son de particular utilidad para la prevención de la queratosis actínica y/o del cáncer de piel no melanoma (NMSC) en pacientes que ya han manifestado dichas patologías, ya que en dichos pacientes la presencia de un campo de cancerización subclínico aumenta las probabilidades de desarrollar nuevas lesiones de queratosis actínica y/o del cáncer de piel no melanoma (NMSC).

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra expresión de PCNA en biopsias cutáneas de un paciente antes (A) y después de 4 semanas (B) de tratamiento con una composición tópica que comprende fotoliasa (amplificación x10).

La figura 2 muestra expresión de p21 en biopsias cutáneas de un paciente antes (A) y después de 4 semanas (B) de tratamiento con una composición tópica que comprende fotoliasa (amplificación x10).

Descripción de la invención

Los autores de la invención han descubierto que la aplicación tópica de fotoliasa en pacientes humanos permite tanto reducir las lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma como reducir o mejorar el campo de cancerización cutáneo subclínico que se asocia a dichas lesiones. Se entiende por mejora del campo de cancerización la disminución del nivel de expresión, por parte de las células epidérmicas que integran el campo de cancerización, de ciertas proteínas, por ejemplo TP53, p21 y/o PCNA, y/o el incremento de los niveles de expresión de CPI-17 (PPP1R14A), lo cual se traduce en una disminución de una o más de las siguientes alteraciones patológicas a nivel celular, sub-celular o molecular: hipertrofia de la epidermis, disminución del espesor de la epidermis, atipia focal y/o difusa, inflamación focal, que pueden evaluarse por microscopía confocal. Se entiende por reducción del campo de cancerización una disminución del área de la piel que presenta niveles de expresión alterados de los biomarcadores mencionados anteriormente, en las células epidérmicas que integran el campo de cancerización, en particular niveles de expresión incrementados de TP53, p21 y/o PCNA, y/o niveles de expresión disminuidos de CPI-17 (PPP1R14A), en relación a los niveles de expresión en la piel sana. La reducción o mejora del campo de cancerización cutáneo subclínico es de particular relevancia ya que se conoce que la probabilidad de desarrollar queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma en dicho campo de cancerización subclínico es más elevada que la probabilidad de que dichas patologías se desarrollen en tejido epidérmico sano.

El campo de cancerización cutáneo subclínico es una zona de la epidermis que sufre alteraciones subclínicas frecuentemente causadas por su exposición a la radiación ultravioleta. El campo de cancerización habitualmente circunda o va a circundar a la lesión de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma una vez que estas se desarrollen pero puede preceder a su desarrollo. El diagnóstico clínico de la queratosis actínica suele realizarse mediante la inspección visual de las lesiones, opcionalmente acompañada de una inspección dermatoscópica de las mismas. En este sentido, en la presente invención se entiende que existen signos clínicos de queratosis actínica cuando la piel presenta alteraciones detectables a simple vista, mientras que las alteraciones subclínicas no son detectables a simple vista. En el campo de cancerización subclínico, las alteraciones a nivel celular y/o tisular no son detectables a simple vista, aunque su detección pueda llevarse a cabo por el uso de técnicas de alta definición tales como dermatoscopia, microscopía confocal y/o técnicas que precisan de la extracción de una muestra del tejido a analizar. Dicho campo de cancerización cutáneo subclínico se caracteriza por que las células epidérmicas que lo componen presentan niveles de expresión alterados de determinados genes y/o proteínas, en relación a los niveles de expresión de dichos genes y/o proteínas en el tejido cutáneo sano (es decir que no presenta alteraciones histopatológicas), en particular niveles de expresión alterados de uno o más de los siguientes: proteínas TP53, p21, PCNA y gen CPI-17 (PPP1R14A). Dichos niveles de expresión pueden medirse, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa reversa en tiempo real (RT-PCR), mediante la técnica de "arrays" de ARN, o mediante inmunohistoquímica.

El gen CPI-17 (PPP1R14A) (UniGene Hs.631569) codifica para la subunidad reguladora (inhibidora) 14A de la proteína fosfatasa 1, (PPP1R14A). El gen TP53 es un gen supresor de tumores que codifica para la proteína tumoral p53 (UniGene Hs.654481). p53 está implicada en la regulación de crecimiento de los queratinocitos, específicamente en el control de muerte celular. Hussein et al. Han mostrado que p53 está implicada con la evolución de lesiones de queratosis actínica ya que esta proteína está regulada al alza en queratosis actínica en comparación con piel normal (Hussein, R. et al. 2004. Analysis of p53 and bcl-2 protein expression in the non-tumorigenic, pretumorigenic, and tumorigenic keratinocytic hyperproliferative lesions. Journal of Cutaneous Pathology 31:643-651). P21 es inhibidor 1 de cinasa dependiente de ciclina es una proteína que en seres humanos está codificada por el gen CDKN1A (UniGene Hs.370771). p21 media la detención del crecimiento indicado por p53 activado por el daño en ADN y se ha mostrado que desconecta la activación de p53 para proliferación celular disminuida (Lu S. et al. 1999. Expression of cell-cycle proteins p53, p21 (WAF-1), PCNA and Ki-67 in benign, premalignant and malignant skin lesions with implicated HPV involvement. Acta Derm. Venereol. 79:268-273). PCNA es proteína antigénica nuclear celular de proliferación que está codificada por el gen PCNA (UniGene Hs. 147433). PCNA ser usado como biomarcador en la medida de proliferación celular relacionada con el desarrollo de queratosis actínica. Además, un incremento en expresión de PCNA y p53 se ha comunicado en piel dañada por el sol con

ninguna evidencia clínica de AK (Eispahr J.G. et al. 2006. Reproducibility and expresion of skin biomarkers in sun-damaged skin and keratoeses actinic. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 15:1841-1848).

5 Los autores de la invención han encontrado sorprendentemente que la aplicación de composiciones tópicas que comprenden fotoliasa modifica el nivel de expresión, por parte de las células epidérmicas que integran el campo de cancerización, de determinados genes, en particular de uno o más de los siguientes genes: CPI-17 (PPP1R14A), y/o de ciertas proteínas, en particular de una o más de las siguientes proteínas: TP53, p21 y PCNA lo cual constituye un signo de la mejora del campo de cancerización. En particular, la aplicación de composiciones tópicas que comprenden fotoliasa disminuye la expresión de una o más de las siguientes proteínas, p21 y PCNA mientras que incrementa el nivel de expresión de CPI-17 (PPP1R14A). Un cambio en los niveles de expresión previamente mencionados es un signo de mejora de uno o más de los siguientes trastornos patológicos a niveles celular, sub-celular o molecular: hipertrofia epidérmica, decrecimiento en el grosor epidérmico, atipia focal o difusa, paraqueratosis, disqueratosis, inflamación focal, que pueden evaluarse mediante microscopía confocal.

15 Las fotoliasas (EC 4.1.99.3) son enzimas reparadores del ADN capaces de escindir los dímeros de pirimidina que se forman cuando el ADN se expone a la radiación ultravioleta. Para realizar dicha escisión las fotoliasas precisan ser expuestas a luz visible.

20 Las fotoliasas están disponibles comercialmente y métodos para su preparación y purificación se encuentran descritos por ejemplo en el libro DNA REPAIR: A LABORATORY MANUAL OF RESEARCH PROCEDURES editado por E. Friedberg y P.C. Hanawalt y publicado por Marcel Dekker, Nueva York, Volumen I, parte A y en la solicitud de patente europea número 0 423 214 A. El producto Photosomes[®] comercializado por AGI Dermatics es un ejemplo de fotoliasas en forma de liposomas que se encuentra disponible comercialmente.

Un aspecto se refiere al uso de fotoliasa para la preparación de una composición tópica para la reducción o mejora del campo de cancerización cutáneo subclínico asociado con queratosis actínica o con cáncer de piel no melanoma en un paciente humano.

25 En otro aspecto la presente invención se dirige al uso de fotoliasa para la preparación de una composición tópica para reducir el riesgo de desarrollar lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) en pacientes humanos que tienen un campo de cancerización subclínico. En el caso de pacientes que ya han manifestado de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) el riesgo de desarrollar nuevas lesiones se reduce. Así, en esta realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los usos previamente mencionados de fotoliasas, en los que los pacientes ya tienen lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) o han experimentado dichas enfermedades en el pasado.

Otro aspecto se refiere a un método para reducir o mejorar el campo de cancerización cutáneo subclínico que comprende la aplicación tópica en el campo de cancerización cutáneo de una composición tópica que comprende fotoliasa.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un uso para reducir el riesgo de desarrollar lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) en pacientes humanos que tienen un campo de cancerización subclínico que comprende aplicación tópica en el campo de cancerización del paciente de una composición tópica que comprende fotoliasa.

40 En otra realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los métodos previamente mencionados, es decir, método de tratamiento para reducir o mejorar el campo de cancerización subclínico asociado con queratosis actínica o cáncer de piel no melanoma en un paciente humano y a método de reducir el riesgo de desarrollar lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) en pacientes humanos que tienen un campo de cancerización subclínico, en los que los pacientes ya tienen lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) o han experimentado dichas enfermedades en el pasado.

45 Otro aspecto de esta invención se refiere a fotoliasa para usar en el tratamiento tópico para reducir el riesgo de desarrollar lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) en pacientes humanos que tienen un campo de cancerización subclínico.

50 En una realización, la invención se refiere a fotoliasa para cualquiera de los usos previamente mencionados, es decir, el tratamiento tópico para reducir o mejorar el campo de cancerización subclínico con queratosis actínica o cáncer de piel no melanoma en un paciente humano y en el tratamiento tópico para reducir el riesgo de desarrollar lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) en pacientes humanos que tienen un campo de cancerización subclínico, en los que los pacientes ya tienen lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) o han experimentado dichas enfermedades en el pasado.

55 Una realización de esta invención usa la fotoliasa para preparar una composición tópica para la reducción o mejora del campo de cancerización cutáneo subclínico y/o para reducir el riesgo de desarrollar lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) en pacientes que padecen Xeroderma Pigmentosum.

Otra realización de la presente invención se refiere a los métodos de acuerdo con la presente invención, en la que el

paciente padece Xeroderma Pigmentosum.

Otra realización de la presente invención se refiere a fotoliasas usadas para cualquiera de lo previamente definido, en la que el paciente padece Xeroderma Pigmentosum.

5 En otras realizaciones de esta invención la composición tópica para los usos y/o los métodos de la presente invención comprende fotoliasa contenida en liposomas, preferentemente en liposomas que comprenden fosfolípidos y más preferentemente en liposomas que comprenden una mezcla de fosfolípidos sensibles a pH, tales como fosfatidiletanolamina y fosfolípidos no sensibles, tales como fosfatidilcolina y opcionalmente otros lípidos no fosforilados, tales como hemisuccinato de colesterilo.

10 En otras realizaciones de esta invención, las fotoliasas para los usos y/o métodos de la presente invención se eligen a partir de fotoliasas, preferentemente doxaflavina fotoliasas obtenidas de cianobacterias, preferentemente del género *Anacystis nidulans*. Las dextroflavina fotoliasas son fotoliasas que, además de usar FADH⁻ como un cofactor, usan 8-hidroxi-7,8-didemetil-5-deazarriboflavina (8-HDF) como un cofactor adicional.

En realizaciones preferidas, la fotoliasa para los usos y/o métodos de la presente invención se usa como liposomas comercializados por AGI Dermatics con el nombre comercial Photosomes[®].

15 En otras realizaciones de esta invención la composición tópica de la fotoliasa para los usos de la presente invención también comprenden filtros UV.

Ejemplo

Sujetos y métodos

Diseño

20 Estudio clínico de intervención, de prueba, prospectivo, controlado para evaluar el efecto de una composición tópica que comprende fotoliasa (Eryfotona[®] AK-NMSC, comercialmente disponible en España) en el tratamiento del campo de cancerización. La evaluación se llevó a cabo subclínicamente durante el tratamiento, por microscopía confocal de reflectancia (RCM) y en el comienzo y al final del tratamiento por valoración de histopatología e inmunoquímica. RCM permite moritorización no invasiva de respuesta de tratamiento in vivo y permite detección temprana de daños
25 celulares.

Sujetos

Se incluyeron once pacientes mayores de 50 años y 2 pacientes de xeroderma pigmentosum, afectados por lesiones de AK en un área expuesta al sol. El estudio se llevó a cabo tratando áreas de la piel desprovista de lesiones de AK y determinadas por signos clínicos. Los pacientes consintieron en participar en el ensayo después de leer y entender
30 la información aprobada por el comité ético y el estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Pincipios de Helsinki.

Métodos y análisis estadísticos

El manejo de este estudio se aprobó por el IRB del centro de investigación y los pacientes dieron su consentimiento informado, por escrito. El área tratada se documentó con RCM (Vivascope 1500, Lucid Corp) (0,8 x 0,8 cm) para
35 cubrir el área a estudiarse. Dos biopsias de perforación de 3 mm se llevaron a cabo en dos de las áreas representativas y documentadas con imágenes. El producto estudiado (composición tópica que comprende fotoliasa (Eryfotona[®] AK-NMSC) o una protección solar con filtros UV pero sin el enzima fotoliasa, ambos productos con un factor de protección solar idéntico) se aplicó en el área de tratamiento durante 4 semanas, en la mañana y 4-6 horas más tarde. Al final del tratamiento (4 semanas), se llevó a cabo una evaluación final y se obtuvieron 2 biopsias de 2
40 perforación obtenidas en 2 áreas representativas anteriormente no dañadas con las biopsias llevadas a cabo en la inclusión del paciente. Se trataron nueve pacientes con el producto de estudio y tres pacientes recibieron la crema protectora solar. Un paciente rehusó aplicar el tratamiento después de la inclusión y se retiró del estudio.

Evaluación de la microscopía confocal

Los siguientes criterios de RCM previamente descritos (Aghassi et al. (2000), *J Am Acad Dermatol* 43: 42-48; Ulrich et al. (2007), *Br J Dermatol* 156: 13-17; Ulrich et al. (2007) *Br J Dermatol* 156: 47-52; Ulrich et al. (2008), *Dermatol Surg* 34: 610-619; y Scope et al. (2007) *J Am Acad Dermatol* 57: 644-658) se evaluaron en este estudio (Tabla 1): 1) Tres características de RCM se evaluaron al nivel del estrato córneo: presencia de formación de escamas, presencia de corneocitos separados y presencia de células nucleadas poligonales. 2) Tres características RCM se evaluaron
50 en la capa espino-granulosa: presencia de un patrón de panal atípico, presencia de patrón epidérmico desarreglado y presencia de células de núcleo redondo, y 3) Dos criterios de RCM se consideraron en la dermis: presencia de vasos sanguíneos redondos atravesando papila dérmica y presencia de células inflamatorias.

Una puntuación de RCM total se calculó con el medio de todas las puntuaciones anteriores.

Evaluación de la inmunohistoquímica

Los estudios inmunohistoquímicos para p21 y PCNA se llevaron a cabo a partir de biopsias de perforación fijadas por formalina y embebidas en parafina con el sistema inmunohistoquímico Bond Max (Menarini). Los anticuerpos primarios usados en el estudio fueron p21 leica (dilución 1/40) y dilución 1/50 de PCNA leica.

5 El análisis estadístico para evaluación cuantitativa se llevó a cabo con un Chi2 corregido por prueba de Fisher en (tablas 2 x 2) cuando se requieren por tamaño de muestra. Para variables cuantitativas, los autores de la invención compararon la puntuación media para cada parámetro al final del estudio. Se realizó prueba t de Student para muestras emparejadas con variables distribuidas de forma normal y la prueba ANOVA se usó para comparaciones múltiples.

10 **Extracción de ARN**

Las biopsias de perforación se embebieron en RNAlater (Quiagen, EE.UU.) y se almacenaron a -80 °C. El aislamiento del ARN total se llevó a cabo usando métodos basados en extracción de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) según se indica en el protocolo del fabricante, seguido por purificación en columnas comerciales (Quiagen, Valencia, CA). Brevemente, la disrupción y la homogeneización de las muestras de piel se llevó a cabo usando Polytron System PT1200E (Kinematica, Suiza) homogeneizado y lisado en Trizol. Después de adición de cloroformo, el ARN se aisló a partir de la fase acuosa. El ARN se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 70 % y se redisolvió en tampón libre de RNasa. El ARN aislado total se determinó usando espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) e integridad del ARN se verificó por Bioanalyzer 2100 (Agilent, EE.UU.). El número de integridad del ARN fue en todos los casos más alto que 7,9.

20 **Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa en tiempo real Taqman (RT-PCR)**

Se transcribió de forma reversa ACNc a partir de ARN usando kit Core Reagent de PCR Taqman (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania). RT-PCR se llevó a cabo usando Mezcla Taqman Universal PCR master (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania). La reacción se llevó a cabo en un instrumento de detección de secuencia ABI 7900HT (Applied Biosystems, CA, EE.UU.). Se adquirieron cebadores y sondas específicos de genes de Taqman para genes seleccionados (CPI-17 y WDR72) de Applied Biosystems. El gen de GADPH se usó para normalizar cada muestra. Se usó ARN de piel normal como calibrador. Se evaluó PCR cuantitativa usando el método de cuantificación relativo de $\Delta\Delta Ct$ [Livak KJ y Schmittgen TD (2001), *Methods* 25: 402-408]. Los valores de expresión se evaluaron por prueba t para igualdad de medios usando el software SPSS 17.0.

25

Resultados

30 Se han incluido trece pacientes (12 varones y una mujer; 2 de ellos afectados por xeroderma pigmentosum; edad media 72 años); un paciente rehusó el tratamiento después de la primera evaluación y antes de la primera biopsia. Dos pacientes rehusaron la segunda biopsia debido a asuntos personales concomitantes. La valoración subclínica, la microscopía confocal y la evaluación de histopatología después del tratamiento demostró una mejora en el campo de cancerización después del tratamiento con la composición tópica que comprende fotoliasa (Eryfotona® AK-NMSC). En contraste, esta mejora no está presente en los 3 pacientes tratados con el protector solar.

35

Los resultados de la evaluación de la RCM se resumen en la Tabla 1. La presencia de formación de escamas, corneocitos desprendidos y células nucleadas poligonales en el estrato córneo disminuyó durante el tratamiento con la composición tópica que comprende fotoliasa (Eryfotonat® AK-NMSC) ($p = 0,004$, $p = 0,018$ y $p = 0,021$, respectivamente). Los autores de la invención también notaron un incremento del patrón en panel atípico y de células nucleadas redondas en la capa granulosa espinosa ($p < 0,0005$ y $p = 0,019$, respectivamente). Finalmente, la puntuación de RCM promedio mejoró significativamente ($p = 0,002$) en los pacientes que reciben aplicación tópica de la composición tópica que comprende fotoliasa (Eryfotonat® AK-NMSC).

40

Tabla 1. Evolución de las puntuaciones de RCM en pacientes que reciben tratamiento del campo de cancerización con una composición tópica que comprende fotoliasa (Eryfotonat® AK-NMSC). Los valores que representan el promedio y la desviación estándar se muestran entre paréntesis, t_0 es el tiempo inicial anterior al tratamiento, t_f es el tiempo final al final del periodo de tratamiento de 4 semanas y CI es el intervalo de confianza.

45

	t_0	t_f	Cambio	CI al 95 %	Valor de P
Formación de escamas	1,18 (0,7)	0,25 (0,3)	-0,93 (0,5)	-1,423 a -0,434	0,004
Corneocitos	1 (0,9)	0,18 (0,4)	-0,82 (0,7)	-1,443 a -0,199	0,018

(continuación)

	t ₀	t _f	Cambio	CI al 95 %	Valor de P
Células nucleadas poligonales en el estrato córneo	0,69 (0,5)	0,14 (0,2)	-0,55 (0,5)	-0,977 a -0,117	0,021
Panal atípico	1,39 (0,4)	0,43 (0,4)	-0,96 (0,1)	-1,052 a -0,877	< 0,0005
Patrón epidérmico desarreglado	0,15 (0,2)	0	-0,15 (0,2)	-0,345 a -0,036	0,095
Células nucleadas redondas en la capa granulosa espinosa	0,98 (0,7)	0,42 (0,4)	-0,56 (0,5)	-0,993 a -0,127	0,019
Vasos sanguíneos redondos atravesando papila dérmica	0,12 (0,2)	0,04 (0,1)	-0,08 (0,2)	-0,314 a -0,148	0,413
Células inflamatorias	0,49 (0,6)	0,32 (0,4)	-0,17 (0,3)	-0,463 a -0,131	0,221

Los resultados de la inmunohistoquímica se resumen en la tabla 2. Deforma interesante, después de 4 semanas de tratamiento del campo de cancerización con la composición tópica que comprende fotoliasa (Eryfotonat® AK-NMSC), la expresión p21 en las capas suprabasales disminuyó, ($p = 0,042$) y una tendencia a una expresión de PCNA disminuida en la fase basal se detectó también ($p = 0,076$).

5

Tabla 2. Puntuaciones de inmunohistoquímica antes (t₀) y después de tratamiento de 4 semanas (t_f) con una composición tópica que comprende fotoliasa (Eryfotonat® AK-NMSC) en el campo de cancerización. N es el número de pacientes, SD es la desviación estándar.

		Promedio	N	SD	Valor de P
PCNA basal	t ₀	2,67	6	0,516	0,076
	t _f	2,17	6	0,408	
PCNA suprabasal	t ₀	2,83	6	0,408	0,296
	t _f	2,33	6	0,816	
p21 basal	t ₀	0,5	6	0,548	0,363
	t _f	0,17	6	0,408	
p21 suprabasal	t ₀	2,17	6	0,408	0,042
	t _f	1,33	6	0,816	

Los estudios inmunohistoquímicos en biopsias de piel de un paciente antes y después se 4 semanas de tratamiento con la composición tópica que comprende fotoliasa (Eryfotonat® AK-NMSC) muestra un decremento en la expresión de PCNA en la capa basal (Figura 1) y un decrecimiento en la expresión de p21 en el estrato superior de la epidermis (Figura 2).

10

La expresión de CPI-17 se evaluó en el campo de cancerización de siete pacientes por RT-PCR cuantitativa antes y después de 4 semanas de tratamiento con la composición tópica que comprende fotoliasa.

15

Tabla 3. Incremento en veces de expresión genómica de gen CPI-17 en el campo de cancerización de 7 pacientes tras tratamiento de 4 semanas con la composición tópica que comprende fotoliasa (Eryfotonat® AK-NMSC).

ES 2 545 855 T3

Paciente	CPI-17
1	2,98
2	6,51
3	1,82
4	0,99
5	2,11
6	0,89
7	1,12
Promedio	2,35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Fotoliasa para uso en el tratamiento tópico para reducir el riesgo de desarrollar lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) en pacientes humanos que tienen un campo de cancerización subclínico en el que el campo de cancerización se caracteriza por niveles de expresión incrementados de TP53, p21 y/o PCNA, y/o niveles de expresión disminuidos de CPI-17 con respecto a los niveles de expresión en piel sana.
2. Fotoliasa para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los pacientes ya tienen lesiones de queratosis actínica y/o cáncer de piel no melanoma (NMSC) o han experimentado estas enfermedades en el pasado.
- 10 3. Fotoliasa para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el paciente padece Xeroderma Pigmentosum.
4. Fotoliasa para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la fotoliasa está incorporada en liposomas.
5. Fotoliasa para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que los liposomas comprenden fosfolípidos.
- 15 6. Fotoliasa para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la fotoliasa es una deazaflavin fotoliasa.
7. Fotoliasa para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la fotoliasa se obtiene a partir de cianobacterias.
8. Fotoliasa para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que las cianobacterias son del género *Anacystis nidulans*.
- 20 9. Fotoliasa para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición tópica comprende además filtros UV.

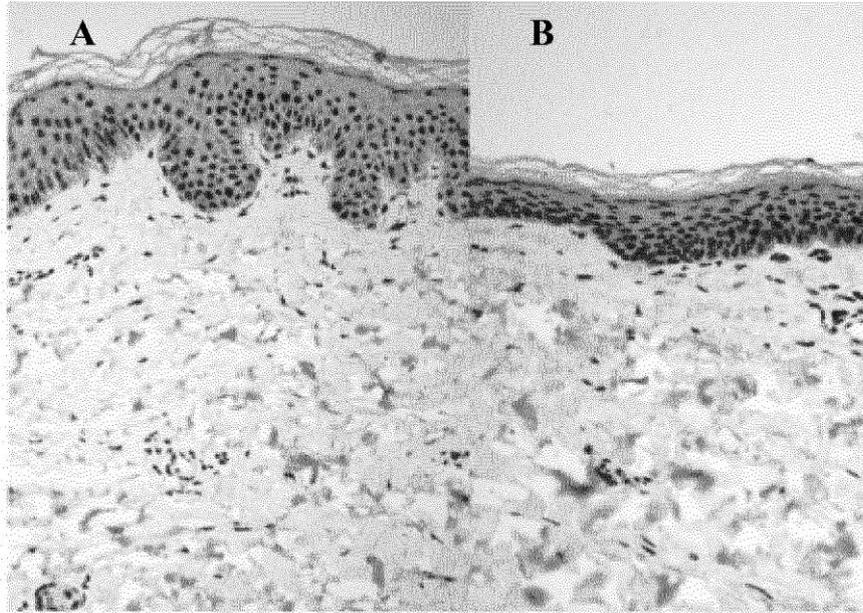


FIG. 1

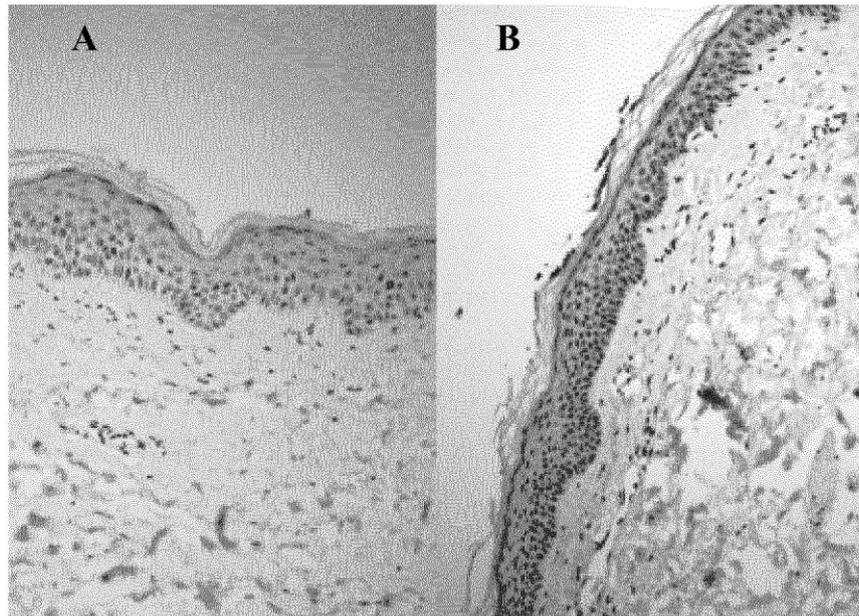


FIG. 2