

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 208**

51 Int. Cl.:

A61K 31/22 (2006.01)

A61K 31/663 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 8/49 (2006.01)

A61K 8/55 (2006.01)

A61K 31/33 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2008 E 08873234 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2252282**

54 Título: **Composición cosmética y/o dermatológica que comprende un inhibidor de la HMG-CoA reductasa y un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa**

30 Prioridad:

03.01.2008 FR 0850019

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

21.09.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (100.0%)
Jardin du Pharo, 58 boulevard Charles Livon
13284 Marseille Cedex 07, FR**

72 Inventor/es:

**CAU, PIERRE;
BOURGEOIS, PATRICE;
BONNIOL, VINCENT y
LEVY, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

VIGAND, Philippe

ES 2 546 208 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

Composición cosmética y/o dermatológica que comprende un inhibidor de la HMG-CoA reductasa y un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa.

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición cosmética y/o dermatológica para su uso en el tratamiento de trastornos cutáneos y del cabello.

10

En la siguiente descripción, las referencias entre paréntesis (X) se refieren a la lista de referencia al final de los ejemplos.

Técnica anterior

15

El núcleo de las células eucariotas se define por una doble membrana perforada con poros, la envoltura nuclear, que controla los intercambios moleculares entre los dos compartimentos nuclear y citoplasmático. Esta envoltura aísla parcialmente el contenido del núcleo, es decir, el material genético y toda la maquinaria enzimática requerida para las funciones del genoma nuclear.

20

La envoltura nuclear consiste en 2 membranas concéntricas, la membrana externa, continua con el retículo endoplasmático, y la membrana interna. La última se bordea sobre la cara interna de la misma por una red fibrilar densa denominada la lámina nuclear. Ésta es una red proteica que consiste sustancialmente en polímeros de láminas y proteínas asociadas. En los vertebrados, se identifican dos subclases de láminas: láminas de tipo A (láminas A y C), y láminas de tipo B (láminas B1, B2 y B3), todas las cuales participan en el desarrollo de la lámina. La última es mantiene en su sitio por asociación con otras proteínas fijadas a la membrana interna de la envoltura nuclear (para una revisión, véase Gruenbaum y col., 2005 (19)).

25

Las láminas son proteínas en forma de filamentos que pertenecen a la familia de los filamentos intermedios (tipo V) cada uno de los cuales tiene una estructura común: un segmento corto globular N-terminal (cabeza) separado de otro segmento globular C-terminal (cola) por un dominio central largo dividido en varias hélices *alfa* (*dominio bastón*). La cola globular contiene, en particular, una señal de localización nuclear (NLS) que permite el direccionamiento al núcleo después de la síntesis. El dominio central permite la asociación de dos moléculas de lámina paralelas y su organización en filamentos, a través de la asociación de los dímeros "cabeza-cola". Esta estructura les confiere unas propiedades mecánicas muy resistentes.

35

Únicamente la lámina A y las láminas B experimentan una maduración después de la síntesis de un precursor (para una revisión, véase Gruenbaum y col., 2000 (20)). La lámina C se sintetiza directamente en su forma madura.

40

El precursor de la lámina A y las láminas B termina en un motivo CaaX característico (C es una cisteína, a un aminoácido con una cadena alifática no cargada y X es cualquier aminoácido, que en este caso es metionina (para una revisión, véase Lévy & Cau 2003 (29)).

45

El motivo CaaX C-terminal permite la unión de un ácido graso (generalmente un ácido graso en C15, farnesilo), gracias a una farnesil transferasa. Esta prenilación (el motivo farnesilo obtenido a partir de una unidad alifática básica en C5 denominada isopreno) permite que las prelaminas se inserten en la membrana del retículo endoplasmático después de su síntesis en el citosol. Experimentan los efectos en las mismas de una endoproteasa, que se inserta en la membrana de la envoltura del retículo y cuyo sitio activo es citosólico. La endoproteasa específica de la prelamina A es Face1 (o ZMPSTE24, metalo-proteasa de cinc STE24 homóloga de levadura), mientras que Face2 (o Rce1, enzima convertidora de ras) es específica de las prelaminas B. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de la unión peptídica entre la cisteína y el siguiente aminoácido (alifático), acortando las prelaminas de 3 aminoácidos. El extremo carboxilo de la cisteína farnesilada se reconoce entonces por una isoprenilcisteína-carboximetil transferasa (ICMT), que fija un grupo metilo al mismo a través de esterificación.

50

Únicamente la maduración de la prelamina A se sigue únicamente de una segunda escisión endoproteolítica a través de Face1, que libera un farnesil-peptido de 15 aminoácidos y la lámina A madura. Esta lámina A, que ya no contiene el ácido graso, se vuelve soluble, se importa en el núcleo gracias a su señal de localización nuclear, y se localiza en la propia lámina nuclear, así como en el resto del compartimento nuclear, formando así un verdadero esqueleto nuclear (Gruenbaum y col., 2005 (19)). Por otro lado, en el extremo C-terminal, la cisteína de la lámina B madura

55

siempre se farnesila y se esterifica por metilo. Por lo tanto, permanece insertado en la membrana de la envoltura del retículo, y después en la cara nucleoplasmática de la envoltura nuclear, por lo tanto su localización exclusiva en la lámina nuclear, bajo la membrana interna de la envoltura nuclear donde se ancla.

5 El término prenilación se entiende como la unión al grupo tiol de una cisteína de una cadena farnesilo de 15 átomos de carbono, que después se denomina como farnesilación, o de una cadena geranyl-geranilo de 20 átomos de carbono, que después se denomina como geranyl-geranilación (Reid y col., 2004 (39)), o incluso de cualquier otro derivado de isopreno.

10 La etapa de farnesilación, que se cataliza por la farnesiltransferasa (FTasa), que reconoce la secuencia consenso C-terminal (*CaaX*), fija preferiblemente un grupo farnesilo sobre el resto cisteína del motivo.

La geranylgeranilación es la fijación por la geranylgeranyl-transferasa (GGTasa) de un grupo geranylgeranilo sobre el resto cisteína del motivo.

15

Los ácidos grasos se obtienen a partir de la ruta de biosíntesis, que se usa por las células para fabricar colesterol, esteroides, el hemo en hemoglobulina y ubiquinonas (Hampton y col., 1996 (20)).

20 La familia de las proteínas preniladas comprende aproximadamente 300 miembros en el genoma humano, la mayoría de las cuales pueden identificarse por el motivo *CaaX* C-terminal (Reid y col., 2004 (39)). Las proteínas de las familias *Ras*, *Rho*, *Rab* (Leung y col., 2006 (28)), ciertas proteínas que proporcionan una función de importancia hacia la mitocondria (HDJ2), y algunas proteínas mitóticas (CENPE, CENPF) están en particular preniladas (Winter-Vann & Casey 2005 (51)). En general si, en el motivo *CaaX*, X es una serina, una metionina, una cisteína, una alanina o un glutamato, el isoprenoide preferiblemente injertado es farnesilo. Si X es una leucina, el reconocimiento del motivo *CaaL* se producirá preferiblemente a través de la GGTasa, que catalizará la transferencia de un grupo geranylgeranilo (Basso y col., 2006 (1)). Es probable que otros grupos derivados de isopreno también puedan estar fijados a esta cisteína, a pesar de que no se describe en la bibliografía.

30 Existen tres genes de láminas en el hombre. El gen *LMNA* situado en 1q21.2-q21.3 (Wydner y col., 1996 (52)), produce las láminas A y C a modo de empalme alternativo. El gen *LMNA* consiste en 12 exones. El inicio del exón 1 codifica el extremo globular N-terminal común a las láminas A y C; el extremo del exón 1 y hasta el inicio del exón 7 codifica la porción helicoidal central; finalmente, los otros exones codifican el extremo globular C-terminal (Lévy & Cau 2003 (29)).

35 De hecho, el gen codifica diferentemente 4 productos empalmados, cuyas láminas C y la prelamina A son los 2 primarios (Lin & Worman 1993 (31)). La producción diferencial de las láminas A y C se realiza por el uso de un sitio de empalme alternativo del exón 10 del pre-mensajero, por lo que la lámina C se codifica por los exones 1 a 10 y la lámina A se codifica por los exones 1 a 9, los primeros 90 pares de bases del exón 10, y los exones 11 y 12 (lámina A-específicos).

40

En consecuencia, los péptidos de la prelamina A y la lámina C son idénticos en los primeros 566 aminoácidos, conteniendo entonces los extremos C-terminal de las láminas C y de la prelamina A 6 y 98 aminoácidos específicos, respectivamente.

45 Las láminas de tipo B incluyen tres proteínas diferentes (Shelton y col., 1981 (43)): las láminas B1, B2 (las dos isoformas más representadas) y B3. El gen *LMNB1* se sitúa en 5q23.3-q31.1 y comprende 11 exones que codifican la lámina B1 (Lin & Worman 1995 (30)). El gen *LMNB2* se sitúa en 19p13.3 y codifica las láminas B1 y B3 a través de un mecanismo de empalme alternativo (Biamonti y col., 1992 (2)).

50 Las láminas de tipo B se expresan consecutivamente en todas las células de las primeras fases de desarrollo, mientras que las láminas de tipo A están ausentes en general de las células madre embrionarias (Stewart y col., 1987 (45)) y se expresan en todas las células somáticas diferenciadas. Su expresión está sujeto a regulaciones, dependiendo del tejido y a lo largo de la vida (Duque y col., 2006 (9)). Parece que su expresión no es necesaria, ya que los ratones en los que la expresión de la lámina A se bloqueó específicamente, pero que no obstante expresan lámina C y las otras láminas, no tienen ningún fenotipo evidente (Fong y col., 2006 (14)).

55 Las láminas interactúan con un gran número de compañeros proteicos que tienen funciones muy diversas, por lo tanto, están implicados en un gran número de procesos nucleares, incluyendo la replicación y reparación del ADN, el control de la transcripción y el empalme, la organización de la estructura de la cromatina (para una revisión, véase

Shumaker y col., 2003 (44), Zastrow y col., 2004 (54), Hutchinson y col., 2004 (26), Gruenbaum y col., 2005 (19)). Las alteraciones de la estructura de la lámina son la fuente de numerosas enfermedades humanas hereditarias. Se deben a mutaciones de los genes que codifican las láminas, o de otras proteínas de la lámina. Estas enfermedades se han agrupado todas con el término genérico de laminopatías (Broer y col., 2006 (5), Mattout y col., 2006 (33)).

- 5 Las mutaciones en los genes de las enzimas responsables de la maduración de las láminas (Face1 en particular) se han identificado recientemente, que dan lugar a enfermedades que pertenecen asimismo al grupo de las laminopatías (Navarro y col., 2004 (36) y 2005 (35)).

Hasta la fecha, la única enfermedad del hombre que está asociada a los genes *LMNB1* o *2* es una leucodistrofia causada por una duplicación completa del gen *LMNB1* (Padiath y col., 2006 (37)). Aún cabe duda sobre implicación potencial de las variaciones de las secuencias encontradas en *LMNB2* en pacientes afectados por el síndrome de Barraquer-Simons (Hegele y col., 2006 (22)). Sin embargo, los experimentos *in vitro* con ARNi (ARN-interferencia) (Harborth y col., 2001 (21)), así como en el modelo murino (Vergnes y col., 2004 (50)), han mostrado que las láminas de tipo son esenciales para el desarrollo y la integridad celular. De hecho, la deficiencia en la lámina B1 en ratones da como resultado mortalidad perinatal. Además, los núcleos de los fibroblastos embrionarios del mismo ratón deficiente en *LMNB1* muestran alteraciones significativas en la morfología nuclear, cercanas a las observadas en pacientes portadores de mutaciones del gen *LMNA*. Además, recientemente se ha mostrado que las láminas B son necesarias para la formación del huso durante la mitosis, que tiende a demostrar que la función de las mismas es dinámica y múltiple durante el ciclo celular, y no únicamente restringida a mantener la arquitectura del núcleo (Tsai y col., 2006 (48)). Respecto a esta última función, un artículo reciente demuestra la función estructural de las láminas B: las células privadas artificialmente de láminas B1 tienen un núcleo "flotante" en la célula, que gira sobre sí mismo (Liu y col., 2007 (45)). La redundancia funcional existente entre las dos láminas B1 y B2 es sin duda también un reflejo directo de su indispensabilidad, que ejerce una fuerte presión de selección y enmascara el efecto de las posibles mutaciones en la secuencia de los genes correspondientes.

25 Las alteraciones funcionales de las láminas A/C, que se deben a las mutaciones en el gen *LMNA*, son el origen de al menos 15 trastornos que incluyen enfermedades muy diversas dentro de un espectro clínico que varía de formas menos graves que afectan a un único tejido de forma aislada, a formas sistémicas mortales durante el periodo perinatal.

30 Varias mutaciones del gen *LMNA* modifican significativamente el conjunto de las proteínas en la envoltura nuclear y alteran el funcionamiento del mismo. La morfología de los núcleos se altera en las células de diversos tejidos: a menudo tienen hernias que se extruyen del material genético en el citoplasma (Goldman y col., 2004 (18)).

35 Las proteínas asociadas comúnmente a la envoltura nuclear, las láminas B, ciertas proteínas de los poros nucleares y las proteínas LAP2 están ausentes de la periferia de estas hernias.

Estas anomalías morfológicas se siguen de alteraciones funcionales, que dan como resultado la muerte celular. Entre todas las enfermedades agrupadas juntas bajo el nombre de laminopatías, únicamente las relacionadas con la acumulación anormal de una forma prenilada de proteína son de interés en la presente invención.

45 Estas implican principalmente el síndrome de Hutchinson-Gilford o Progeria (De Sandre-Giovannoli y col., 2003 (7), Eriksson y col., 2003 (11)), y la dermatopatía restrictiva (Navarro y col., 2004 (36)). En estos dos síndromes, la causa fisiopatológica es una acumulación y persistencia de prelamina farnesilada inmadura en las células de los pacientes.

La dermatopatía restrictiva, que es mortal en el periodo natal, se caracteriza por signos clínicos que son casi todos resultados de una deficiencia en la piel que limita los movimientos *in utero*. Esta enfermedad es muy rara. La piel es rígida y tensa, cede en algunos sitios, causando así desgarros, por ejemplo, en las proximidades de las axilas y el cuello. Las pestañas, cejas y pelo en la piel están ausentes o son muy escasos. Hidramnios está a menudo presente, y la disminución del movimiento fetal se indica a partir del 6º mes de embarazo. En cuanto al sistema esquelético, las radiografías revelan contracturas en todas las articulaciones, pies en "piolet", clavículas delgadas, displásicas y bipartitas, costillas en cinta, huesos largos tubulares del brazo y desmineralización del cráneo. La transmisión de la dermatopatía restrictiva letal es recesiva autosómica.

55 Se han indicado mutaciones de *LMNA* y *ZMPSTE24/Face1* para esta enfermedad (Navarro y col., 2004 (36)). En ambos casos, el mecanismo fisiopatológico es el mismo: la prelamina A no puede madurar (mutación nula de Face1 o desaparición del sitio de escisión por mutación de la prelamina A), y permanece farnesilada y, por lo tanto, insertada en la membrana nuclear. La acumulación y persistencia de estos precursores anormales en las células, lo que probablemente impide la interacción normal de las láminas B y C con sus compañeros, da como resultado la

morte de las células y, a corto plazo, del paciente. Se demostró claramente que, de hecho, es la persistencia del grupo farnesilo, y no la ausencia de la lámina A madura, como quizás se había pensado en un principio, la que es responsable de la toxicidad celular (Fong y col., 2004 (16)).

- 5 En abril de 2003, en base a un solapamiento de los síntomas comunes a la displasia acromandibular y a ciertas enfermedades que dan como resultado un envejecimiento prematuro, los inventores demostraron que la Progeria, que es la forma más típica y grave de envejecimiento prematuro, es resultado de una mutación del gen *LMNA* (De Sandre-Giovannoli y col., 2003 (7)). Los niños afectados por esta enfermedad, también denominado síndrome de Hutchinson-Gilford, padecen envejecimiento acelerado, hasta diez veces más rápido que el de un individuo normal, y
- 10 tienen una esperanza de vida que no excede los 13 años. En Europa, un niño de aproximadamente seis millones se ve afectado. Los síntomas son envejecimiento de la piel calvicie, reducción del tamaño de la mandíbula, y problemas asociados con la vejez, por ejemplo, rigidez en las articulaciones y trastornos cardiovasculares. Los últimos, tales como infarto de miocardio o aterosclerosis, son con frecuencia la causa de la muerte.
- 15 La mutación responsable, situada en el exón 11 del gen *LMNA*, activa un sitio de empalme críptico del pre-ARNm, dando como resultado un ARNm con 150 nucleótidos eliminados (De Sandre-Giovannoli y col., 2003 (7), Eriksson y col., 2003 (11)). Este ARNm eliminado se convierte en una prelamina A anormal, progerina, que no puede madurar en la lámina A normal: la ausencia de 50 aminoácidos del exón 11 que comprende el sitio de reconocimiento de la proteasa bloquea la 2ª escisión de la progerina, cuyo extremo C-terminal retiene el grupo farnesilo de la misma. Por
- 20 lo tanto, permanece insertado en la cara nucleoplasmática de la envoltura nuclear, que tiene alteraciones características, hernias del nucleoplasma en el citosol y anomalías en la distribución de la heterocromatina periférica (Goldman y col., 2004 (18)). Aquí de nuevo, es la persistencia del grupo farnesilo, que también es necesario para anclar la membrana de la envoltura del retículo en la que se sitúan algunas de las enzimas responsables de la maduración (escisiones, metilación), la que es responsable de la toxicidad celular de la progerina (Fong y col., 2004
- 25 (16)).

Estas enfermedades sistémicas tienen la característica particular de relacionarse con la aparición prematura de signos comúnmente asociados con el envejecimiento. Su característica fisiopatológica común es la de generar una lámina prenilada, junto con las consecuencias descritas.

- 30 Dos estudios recientes han mostrado que una reducción en la acumulación intranuclear de la prelamina farnesilada truncada o no truncada impide eficazmente la aparición del fenotipo celular. El primero se realiza en el modelo murino progeroide deficiente en proteasa Face1 (Pendas y col., 2002 (38)). Cuando se cruzan con ratones que expresan menos de la mitad de Lámina A (ratones *Lmna +/-*), los efectos de la ausencia de Face1 disminuyen
- 35 (Varela y col., 2005 (49)). El segundo estudio muestra que el tratamiento de las células de pacientes HGPS con un *morfolino* (oligonucleótidos antisentido) que se dirige al sitio de empalme críptico abole el fenotipo mutante (Scaffidi & Mistelli 2005 (43)).

- Varios estudios recientes (véase Scaffidi & Mistelli 2006 (42)) muestran la implicación de la lámina A en el proceso de envejecimiento fisiológico. En particular, se ha demostrado que, durante el envejecimiento fisiológico, la progerina se sintetiza por las células en ausencia de cualquier mutación del gen *LMNA*, debido al uso de bajo ruido del sitio de empalme críptico del exón 11. Esta progerina se localiza en la lámina, en la periferia del núcleo celular. En núcleo de las células de pacientes ancianos "normales" puede tener hernias características de una laminopatía causada por
- 40 eventos de empalme accidentales, lo que da como resultado anomalías en las funciones celulares y son probablemente, al menos parcialmente, responsables de su envejecimiento.

En el caso de piel *in vivo*, la progerina también se sintetiza por una subpoblación de fibroblastos dérmicos y queratinocitos, células es que se acumula con la edad. Por lo tanto, la progeria puede ser un marcador para el envejecimiento cutáneo (McClintock y col., 2007 (34)).

- 50 Por un lado, parece que los mecanismos moleculares idénticos son responsables de los signos de envejecimiento prematuro en individuos afectados por Progeria y, por otro lado, en un grado mucho menor, están implicados en el envejecimiento fisiológico de individuos que no portan mutaciones.

- 55 Ramirez y col. "Human progeroid syndromes aging and cancer: new genetic and epigenetic insights into old question" Cell. Mol. Life Sci, vol 64, 2007, páginas 155-170 sugieren el uso de estatinas y aminobisfosfonatos para bloquear la farnesilación anormal de la lámina A actuando sobre la ruta de síntesis de de farnesil pirofosfato.

El documento de patente EP 1566177 describe la incubación del cultivo de fibroblastos con una composición que

comprende pamidronato o alendronato que permite estimular la síntesis de colágeno 1 por dichos fibroblastos (ejemplos 1 a 3). Este documento también describe una composición que comprende pamidronato o alendronato que permite reducir las arrugas (ejemplo 5).

- 5 Existen dos enfoques terapéuticos descritos en la técnica anterior para mejorar el fenotipo celular causado por la producción patológica de la progerina. La primera de estas soluciones es bastante simple para impedir el uso de este sitio de empalme críptico en el exón 11 a través del espliceosoma, "enmascarándole" por tratamiento con un oligonucleótido antisentido (Scaffidi & Misteli 2005 (41)), o con un retrovirus que produce un ARNsi (Huang y col., 2005 (25)). Los resultados son prometedores *in vitro*, pero, en este caso, es una materia de la terapia "génica", y el
- 10 desarrollo de un fármaco en base a este enfoque es inevitablemente largo y complicado, con todos los inconvenientes relacionados con la vectorización de los ASO con el fin de obtener un efecto *in vivo*. La segunda solución consiste en inhibir la farnesiltransferasa, la enzima que cataliza la transferencia del grupo farnesilo con respecto a las prelaminas usando farnesil pirofosfato. Cuando se usan dichos inhibidores (FTI), una envoltura nuclear "normal" se restaura sólo parcialmente en las células HGPS (Progeria) en el cultivo, y la supervivencia de los
- 15 ratones RD (KO ZMPSTE24) se mejora (Glynn & Glover 2005 (17), Capell y col., 2005 (6), Toth y col., 2005 (47), Fong y col., 2006 (15)).

Sin embargo, el bloqueo de la farnesilación puede inducir una geranilgeranilación compensatoria (Bishop y col., 2003 (3), Varela y col., 2008 (55)).

- 20 Por otro lado, recientemente se indicó que los FTI causan una detención del ciclo celular bloqueando el proteasoma (Demyanets y col., 2006 (8), Efué & Keymars 2006 (10)). Por lo tanto, el tratamiento causa indudablemente una acumulación de progerina en el nucleoplasma probablemente ubiquitinilada y no degradada por el proteasoma.

- 25 Adicionalmente, estudios recientes indican que el descenso de la tasa de farnesilación de la progerina *in vivo* es muy baja, del orden del 5 % (Young y col., 2006 (53)), lo que no es suficiente para explicar la restauración de la morfología nuclear observada *in vitro*.

- Finalmente, los FTI son específicos de una sola de las rutas de prenilación proteica, y no pueden contemplarse
- 30 como inhibidores generales de prenilaciones post-traduccionales.

Además, se indica que la ausencia total de una de las enzimas de esta ruta, mevalonato cinasa, es letal durante la infancia (mutación homocigota de pérdida de la función del gen codificante para esta enzima, un síndrome indicado por Hoffmann y col., 2003 (24)).

35 **Divulgación de la invención**

- Después de extensas investigaciones, los inventores han mostrado que la asociación de un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (familia de las estatinas), un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa
- 40 (familia de los aminobifosfonatos, NBP), o de una de las sales fisiológicamente aceptables de los mismos, es un tratamiento eficaz para situaciones patológicas y no patológicas relacionadas con la acumulación y/o persistencia de proteínas preniladas en las células, en la medida en que actúa sobre toda la ruta de prenilación proteica, tanto en C15 como en C20 o en las formas no caracterizadas. Los inventores han deducido adicionalmente que la asociación de un inhibidor de la hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de la farnesil pirofosfato
- 45 sintasa tiene un efecto sinérgico en la restauración del fenotipo normal en los fibroblastos de pacientes afectados por Progeria. El efecto de la asociación es notablemente mayor que el efecto de cualquiera de los inhibidores usados individualmente.

- El uso de la combinación en las células de pacientes afectados por Progeria y en un modelo de ratón que reproduce
- 50 demopatía restrictiva da como resultado una inhibición de prenilación proteica y, por lo tanto, la aparición de prelamina A no farnesilada y la mejora de los síntomas nucleares (Varela y col., 2008 (24)).

- Por lo tanto, la presente se refiere al uso de al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa, o de una de las sales fisiológicamente aceptables
- 55 del mismo, en la preparación de una composición cosmética y/o dermatológica. Esta composición, por ejemplo, puede estar diseñada para el tratamiento de situaciones patológicas o no patológicas relacionadas con la acumulación y/o persistencia de proteínas preniladas en las células.

En particular, la presente invención se refiere a una composición tópica dermatológica que comprende:

- al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, y
- al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa,

5 para su uso en el tratamiento de trastornos cutáneos y/o del cabello seleccionados entre el grupo que comprende el envejecimiento cutáneo prematuro patológico y/o envejecimiento mio-lipo-cutáneo prematuro patológico.

Esta invención también se refiere a un uso cosmético no terapéutico de una composición cosmética, que comprende:

10

- al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, y
- al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa,

para el tratamiento de trastornos cutáneos y/o del cabello seleccionados entre el grupo que comprende
15 envejecimiento cutáneo y/o lipodistrofia.

De acuerdo con otro aspecto, la presente describe asimismo:

- el uso conjunto o simultáneo, es decir, los al menos dos siguientes productos (el al menos un inhibidor
20 de hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa, por un lado, y el al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa) se administran en una única composición que contiene los mismos,
- el uso concomitante, es decir, por separado, administrándose cada uno de los al menos dos siguientes
productos (el al menos un inhibidor de hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa, por un lado, y el al menos
25 un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa) independientemente a través de rutas de administración
idénticas o diferentes, realizándose concomitantemente la administración de estos dos productos, o
- uso sucesivo, es decir, por separado, administrándose cada uno de los al menos dos siguientes
30 productos (el al menos un inhibidor de hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa, por un lado, y el al menos
un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa) de forma independiente a través de rutas de administración
idénticas o diferentes, realizándose la administración de estos dos productos de forma sucesiva, un
producto después de otro,

de al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, y el al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa en el tratamiento de trastornos cutáneos y/o del cabello.

35 Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto, los compuestos que se han mencionado anteriormente pueden usarse en una mezcla para administración simultánea o por separado para una administración concomitante o sucesiva.

Por ejemplo, puede administrarse en primer lugar el al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, después puede administrarse en segundo lugar el al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato
40 sintasa. En otro ejemplo, puede administrarse en primer lugar el al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa, después puede administrarse en segundo lugar el al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa.

De acuerdo con un tercer ejemplo, por un lado, el al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa y, por otro
45 lado, el al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, se administran al mismo tiempo pero, por ejemplo, a través de rutas de administración diferentes, por ejemplo, seleccionadas entre administración oral, administración tópica o por inyección.

Independientemente de la realización de la presente invención en particular en los aspectos que se han mencionado
50 anteriormente, por ejemplo, la composición usada en la presente invención puede prepararse extratemporáneamente en el momento de la administración o inmediatamente antes de la misma. La preparación puede hacerse, por ejemplo, por medio de una jeringa o un sistema de bombeo que permita que los dos compuestos que se han mencionado anteriormente se mezclen juntos en el momento de la administración o inmediatamente antes de la misma. La administración puede realizarse, por ejemplo, por medio de una jeringa doble y/o bomba
55 cosmética, por ejemplo, por medio de una bomba comercializada por la empresa Kemai (marca registrada).

En otras palabras, incluso aunque en la presente descripción se hace referencia a una composición, también se describe que cada uno de los compuestos de la composición puede administrarse conjuntamente o de forma concomitante con los demás compuestos (por ejemplo, en una única composición o en dos composiciones o en tres

composiciones, incluyendo cada una de estas composiciones uno o más de los componentes que se han mencionado anteriormente, siendo el método de administración de cada uno de los compuestos o composiciones opcionalmente idéntico o diferente), o independientemente entre sí, por ejemplo, sucesivamente, por ejemplo, administración separada de al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, 5 administración separada de al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa, realizándose esta administraciones con respecto a un único paciente, conjunta, concomitante o sucesiva o alternativamente, en el orden que se ha mencionado anteriormente o en otro orden. Estas diversas administraciones pueden realizarse independientemente entre sí o de forma interrelacionada (composición o co-administración), mediante un método de administración idéntico o diferente (inyección, ingestión, aplicación tópica, etc.), una o más veces por día, durante 10 uno o más días sucesivos o no sucesivos.

La composición, por ejemplo, puede estar diseñada para el tratamiento de situaciones patológicas o no patológicas relacionadas con la acumulación y/o persistencia de proteínas preniladas en las células.

15 También está dentro del alcance de la invención usar compuestos que son tanto inhibidores de la hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa como inhibidores de la farnesil pirofosfato sintasa.

En la presente, la composición cosmética y/o dermatológica descrita puede estar diseñada para el tratamiento de situaciones patológicas o no patológicas relacionadas con la acumulación y/o persistencia de progerina en las 20 células; incluso más particularmente, para el tratamiento e situaciones relacionadas con la acumulación y/o persistencia de la prelamina A farnesilada en las células, ya sea truncada o no truncada o modificada.

En particular, se admite que el envejecimiento fisiológico es en particular una consecuencia de la presencia de progerina en las células durante el transcurso de la vida. La progerina se concentra, en particular, en las células 25 mesenquimales, la composición puede estar diseñada para impedir los efectos del envejecimiento celular, particularmente en la piel y/o el endotelio vascular. La composición tópica dermatológica comprende:

- al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, y
- al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa, para su uso en el tratamiento de trastornos 30 cutáneos y/o del cabello seleccionados entre el grupo que comprende el envejecimiento cutáneo prematuro patológico y/o el envejecimiento mio-lipo-cutáneo prematuro patológico.

Por ejemplo, se usa dicha composición cosmética con el fin de impedir y/o tratar trastornos cutáneos y/o lipodistrofia. Estos trastornos cutáneos pueden ser trastornos de origen natural o patológico o asociados a un tratamiento 35 terapéutico. Los trastornos de origen natural son aquellos asociados al envejecimiento natural, por ejemplo, el envejecimiento cutáneo. Los trastornos patológicos, por ejemplo, los asociados con el envejecimiento cutáneo hormonal, envejecimiento foto-inducido, envejecimiento cutáneo prematuro, envejecimiento mio-lipo-cutáneo, lipodistrofia y dermatopatía restrictiva. Los trastornos asociados con un tratamiento, por ejemplo, los asociados con tratamientos quimioterapéuticos, irradiación de rayos X por rayos X, rayos gamma, rayos ultravioleta y los asociados 40 a efectos secundarios de los tratamientos.

La progeria se acompaña por una alopecia muy pronunciada. Los niños afectados pierden su pelo a partir de los 2 años, cuando el pelo se vuelve escaso, blanco y sedoso. Las pestañas y las cejas también se caen, y el pelo corporal es raro o completamente ausente (véase la descripción detallada de los síntomas clínicos compilados por 45 R. Hennekam (2006). Asimismo esta alopecia se observa en el modelo murino de la progeria (ratones deficientes en *Zmpste24*). De una manera completamente inesperada, el tratamiento con una combinación de pravastatina y zoledronato de acuerdo con la presente invención restaura, al menos parcialmente, el pelaje de estos ratones.

La composición cosmética y/o dermatológica de la presente invención puede estar destinada al tratamiento de cualquier ser vivo, hombre o animal, particularmente para prevenir los efectos del envejecimiento celular. Por lo tanto, la composición encuentra aplicación tanto en medicina humana como veterinaria, cosmética y/o en dermatología. Por ejemplo, permite reparar y/o impedir trastorno cutáneos fisiológicos o no fisiológicos, incluyendo el 50 envejecimiento de la piel y la alteración o desaparición del cabello.

55 De acuerdo con la invención, puede usarse cualquier inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa, o de una de las sales fisiológicamente aceptables del mismo, en la preparación de la composición de acuerdo con la invención.

Las sales fisiológicamente aceptables, por ejemplo, pueden ser sales formadas con ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, ácidos carboxílicos, por ejemplo, tales como ácido acético, fórmico, propiónico, benzoico,

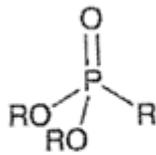
maleico, fumárico, succínico, tartárico, cítrico, oxálico, glioxílico y aspártico, alcanos sulfónicos, tales como ácidos metano o etano sulfónicos, ácidos arilsulfónicos, tales como ácido benceno o para tolueno sulfónicos.

En particular, el inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa puede ser uno de los miembros de la familia de los 5 polifosfonatos, particularmente aminobifosfonatos (NBPs), o una de las sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

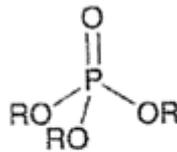
Los polifosfonatos son moléculas sintéticas usadas ampliamente en el tratamiento de la osteoporosis y para la regeneración ósea.

10

El término fosfonato se aplica a moléculas muy similares al fosfato:



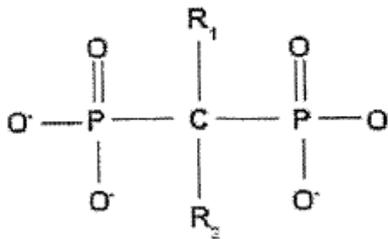
Fosfonato



Fosfato

La estructura núcleo de los bifosfonatos (BP) es el equivalente de un enlace P-O-P en ATP, por ejemplo, pero donde el oxígeno se reemplaza por un carbono. Esto confiere a estas moléculas un grado de estabilidad completamente 15 distinto.

Un bifosfonato sencillo será equivalente a ADP, estando los dos grupos fosfonato (O_3P^-) reemplazados por el grupo bifosfonato.



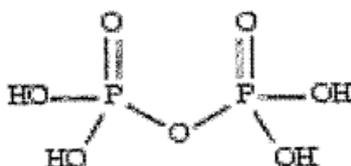
20

A diferencia del oxígeno de los fosfatos, el carbono central puede estar también implicado en 2 enlaces, y es la naturaleza de los grupos injertados sobre este carbono lo que determina la especificidad de los bifosfonatos.

25 Cuando las cadenas "laterales" (R_1 y R_2) comprenden una función amino (NH), o más generalmente uno o más átomos de nitrógeno, se hace referencia a un aminobifosfonato o NBP.

Por supuesto, otros sustituyentes pueden unirse a los átomos de oxígeno.

30 El ácido pirofosfórico o pirofosfato en solución (PPi)



Ácido pirofosfórico

se usa en numerosas reacciones metabólicas como un transportador de sustrato, y se restaura al final de la reacción. Una de las rutas metabólicas que usa las moléculas acopladas con pirofosfato es la de la prenilación proteica.

El injerto de un isopentenil-PP (unidad de base en C5) sobre un geranil-PP (C10) para producir una farnesil-PP, que es una reacción catalizada por la enzima de la farnesil pirofosfato sintasa (FPS), libera un PPi.

10

Es esta etapa la que se inhibe específicamente por los NBP.

A este respecto, y a modo de ejemplo, el aminobifosfonato (inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa) puede escogerse de entre:

15

- ácido alendrónico o la forma iónica del mismo, alendronato;
- ácido clodrónico o la forma iónica del mismo, clodronato;
- ácido etidrónico o la forma iónica del mismo, etidronato;
- ácido ibandrónico o la forma iónica del mismo, ibandronato;
- ácido medrónico o la forma iónica del mismo, medronato;
- ácido neridrónico o la forma iónica del mismo, neridronato;
- ácido olpadrónico o la forma iónica del mismo, olpadronato;
- ácido pamidrónico o la forma iónica del mismo, pamidronato;
- ácido risedrónico o la forma iónica del mismo, risedronato;
- ácido tiludrónico o la forma iónica del mismo, tiludronato;
- ácido zoledrónico o la forma iónica del mismo, zoledronato;
- ácido 4-N,N-dimetilaminometano difosfónico o la forma iónica del mismo, dimetilaminometanodifosfonato;
- α -amino-(4-hidroxi-bencilideno) difosfonato.

20

25

30 Preferiblemente, de acuerdo con la invención, se prefiere usar ácido zoledrónico (también denominado ácido zolendrónico) o la forma iónica del mismo, zoledronato (también denominado zolendronato).

De acuerdo con la invención, puede usarse cualquier inhibidor de la HMG-CoA reductasa, o una de las sales fisiológicamente aceptables del mismo, en la preparación de las composiciones.

35

En particular, el inhibidor de la HMG-CoA reductasa puede ser una molécula de la familia de las estatinas, ya sea soluble en agua o liposoluble, o una de las sales fisiológicamente aceptables de las mismas.

Se ha mostrado que las estatinas existen en los hongos. Tienen una actividad inhibidora con respecto a la HMG-CoA reductasa, una enzima clave en la biosíntesis del colesterol y esteroides, que cataliza la reducción del hidroximetilglutarato acoplado con la Coenzima A en ácido mevalónico (mevalonato en solución). Esta inhibición se asegura por su analogía estructural con el esqueleto de hidroximetilglutarato. La ruta metabólica implicada es ciertamente la de la biosíntesis de colesterol, pero es también la de la síntesis de grupos fenilo, que son polímeros de la unidad de base de 5 carbonos de isopreno usados para modificar aproximadamente 300 proteínas en células y para fijar una cola lipófila a los mismos, permitiendo, en particular, el anclaje de los mismos a las membranas.

45

Los poliprenos principales, cada uno de los cuales se obtiene a partir de piruvato y HMG-CoA, son geranilo (C10), farnesilo (C15) y geranilgeranilo (C20).

50 Todas las estatinas son globalmente hepatoselectivas, pero no todas tienen el mismo modo de entrada en las células. De hecho, la pravastatina y la rosuvastatina son ambas hidrófilas y, por lo tanto, solubles en agua, por otro lado, todas las demás son lipófilas y, por lo tanto, pueden difundirse libremente a través de las membranas plásmicas (capas dobles de moléculas lipídicas), lo que explica indudablemente el mayor grado de toxicidad de las

mismas. Las estatinas solubles en agua necesitan un transportador específico para entrar en la célula, *Organic Anion Transporter 3*, o OAT3, o SLC22A8 (Takeda y col., 2004 (46)).

5 Se usan ampliamente para el tratamiento de la hipercolesterolemia, y los efectos laterales de las mismas, que son raros, están bien caracterizados. Este es el caso en particular de la rhabdomiólisis (del 1 al 7% de los casos dependiendo de la molécula usada, Evans y col., 2002 (12)), cuyos signos tempranos son dolor muscular en el paciente en tratamiento y dan como resultado el cese inmediato del tratamiento.

10 A este respecto, y como un ejemplo, puede escogerse una estatina entre atorvastatina, simvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina (o compactina), fludostatina, velostatina, fluvastatina, dalvastatina, cerivastatina, pentostatina, rosuvastatina, lovastatina, pitavastatina, o una de las sales fisiológicamente aceptables de las mismas.

15 La lovastatina, pravastatina y simvastatina son moléculas obtenidas a partir de metabolitos fúngicos, mientras que las otras (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, pitavastatina y rosuvastatina) son completamente sintéticas. De acuerdo con la invención, se usa preferiblemente la pravastatina, que es una estatina semi-natural soluble en agua.

De acuerdo con la invención, por supuesto es posible usar uno, dos o más inhibidores de la farnesilpifosfato sintasa asociados a uno, dos o más inhibidores de HMG-CoA reductasa.

20 La composición desvelada puede estar destinada al tratamiento de situaciones patológicas o no patológicas que requieren inhibir la prenilación proteica. Estas enfermedades pueden marcarse o no, por ejemplo, el síndrome de Noonan, síndrome cardio-fascio-cutáneo, o enfermedades asociadas a una prenilación anormal o persistencia de Ras y proteínas de transducción de señal.

25 En la presente, se desvela la composición destinada al tratamiento de situaciones patológicas o no patológicas que muestran signos de envejecimiento, ya sea, natural, prematuro o acelerado, en particular, en casos de signos de deterioro del endotelio vascular (protección del endotelio vascular), envejecimiento de la piel, pérdida del pelo y/o del cabello, y lisis ósea.

30 En la presente, se desvela una composición dermatológica y/o cosmética destinada al tratamiento de Progeria (HGPS, síndrome de Hutchinson-Gilford Progeria) y la dermatopatía restrictiva (DR o RD).

De acuerdo con la invención, el inhibidor de la farnesilpifosfato sintasa y el inhibidor de la HMG-CoA reductasa están ventajosamente presentes en la composición en dosis fisiológicamente eficaces.

35 De manera general, las cantidades a administrar pueden adaptarse en base al paciente, la enfermedad, el método de administración, etc. Se entiende que pueden realizarse aplicaciones repetidas, posiblemente en combinación con otros principios activos o cualquier vehículo.

40 En general, la dosis diaria de los inhibidores será la dosis máxima para obtener el efecto dermatológico y/o cosmético deseado.

45 De acuerdo con la invención, el inhibidor de la hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y el inhibidor de la farnesilpifosfato sintasa pueden usarse en la composición, mezclados con uno o más excipientes o vehículos inertes, es decir, fisiológicamente inactivos y no tóxicos. Puede hacerse referencia, por ejemplo, a los ingredientes usados habitualmente en las preparaciones cosméticas o dermatológicas.

50 La composición cosmética y/o dermatológica de esta invención incluye al menos un producto cosmético y/o dermatológico. Por "producto cosmético y/o dermatológico" se entenderá cualquier producto que permita formar una composición, junto los inhibidores que se han mencionado anteriormente, que permita la aplicación cosmética y/o dermatológica, es decir, una composición capaz de aplicarse a la piel o que permita el tratamiento de la piel desde un punto de vista cosmético y/o dermatológico.

55 Como mínimo, este producto cosmético y/o dermatológico es el que permite que los dos inhibidores se suspendan o solubilicen para poder aplicarlos a la piel. Por ejemplo, en este caso, puede implicar un alcohol, agua, un tampón, una solución salina, una solución isotónica, o una mezcla de dos o más de los mismos.

Preferiblemente, por supuesto, el producto cosmético y/o dermatológico es un producto fisiológicamente aceptable, para su uso tópico en particular.

El producto cosmético y/o dermatológico utilizable en la composición de la presente invención puede incluir asimismo o consistir en cualquier compuesto o mezcla de compuestos usados habitualmente en composiciones cosméticas y/o dermatológicas.

5 Por ejemplo, esto puede implicar uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que incluye tensioactivos, agentes espesantes, agentes gelificantes, conservantes, humectantes, emulsionantes, perfume, siliconas, agentes quelantes, antioxidantes, tintes cosméticos, fungicidas, agentes antibacterianos, agentes formadores de película, estabilizantes, agente tamponantes, filtros UV, aglutinantes y estabilizantes de emulsión.

10 Por "agente emulsionante" se entenderá cualquier compuesto que permita promover mezclas de líquidos no miscibles. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el emulsionante puede seleccionarse entre el grupo que incluye sustancias catiónicas y aniónicas, por ejemplo, ácidos grasos y glicoles, por ejemplo, butilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, poliglucósidos, esteroides vegetales, alcoholes estearílicos, 15 behenol-25 y alcohol cetearílico.

Por "conservante" se entenderá cualquier compuesto que permita inhibir el desarrollo de microorganismos en una composición cosmética y/o dermatológica. Estos compuestos se conocen por el experto en la técnica. Por ejemplo, esto puede implicar un fungicida y/o un agente antibacteriano.

20 Por "fungicida" se entenderá cualquier compuesto capaz de reducir y/o inhibir la proliferación de hongos en una composición cosmética y/o dermatológica.

Por "agente antibacteriano" se entenderá cualquier compuesto capaz de reducir o inhibir la proliferación de bacterias en una composición cosmética y/o dermatológica. Por ejemplo, el conservante puede seleccionarse entre el grupo que incluye parabenos, por ejemplo, butilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, isobutilparabeno, metilparabeno, ácidos orgánicos, diazolidinas, isotiazolinonas, hidroximetilglicinatos, alcoholes fenólicos, 5-bromo-5-nitro-1,3, 30 dioxano, diazolidinil urea, 3'-Demetoxi-3O-Demetilmatairesinol (DMDM) hidantoína.

Por ejemplo, la silicona puede seleccionarse entre el grupo que incluye dimeticonas, dimeticololes, fenil trimeticonas y aceites de silicona volátiles y no volátiles.

Por "agente quelante" se entenderá cualquier compuesto que forma complejos con iones metálicos modificando la estabilidad y/o viscosidad de una composición cosmética y/o dermatológica. Estos compuestos se conocen por un 35 experto en la técnica. Por ejemplo, el agente quelante puede seleccionarse entre el grupo que incluye ácido nitroloacético, ácido poliaminocarboxílico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA) y sales de los mismos.

Por "agente espesante" se entenderá cualquier compuesto capaz de aumentar la viscosidad de una composición cosmética y/o dermatológica. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el agente 40 espesante puede seleccionarse entre el grupo que incluye polímeros naturales como ácido alginico y derivados del mismo, celulosa y derivados de la misma, escleroglucanos, goma xantano, polímeros y copolímeros de carboxivinilo sintético que pueden tener asimismo una función emulsionante, por ejemplo, acrilato, metacrilato, acrilamida, y las mezclas de los mismos, por ejemplo, el copolímero acrilato de alquilo/acrilato en C10 a 30, y polimetilmetacrilato.

45 Por "agente humectante" se entenderá cualquier compuesto capaz de mantener y/o conservar la humedad de una composición cosmética y/o dermatológica. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el agente humectante puede seleccionarse entre butilenglicol, propilenglicol y polietilenglicol.

Por "antioxidante" se entenderá cualquier compuesto capaz de inhibir reacciones de oxidación de oxígeno y rancidez. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el antioxidante puede 50 seleccionarse entre el grupo que incluye sulfitos, aminoácidos, por ejemplo, glicina, histidina, tirosina, triptófano y derivados de los mismos, imidazoles, péptidos, por ejemplo, D-carnosina y L-carnosina.

Por "tensioactivo" se entenderá cualquier compuesto que permita reducir la tensión superficial de la composición y promover la distribución uniforme de los compuestos de una composición cosmética y/o dermatológica. Estos 55 compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tensioactivo puede seleccionarse entre el grupo que incluye cetil betaína, cocamidopropil betaína, cocoanfodiacetato disódico, laureth sulfosuccinato disódico, hexilenglicol, laureth-3, laureth-4, polietilenglicol (PEG) PEG-30, cocoato de glicerilo, aceite de ricino hidrogenado PEG-40, PEG-7, cocoato de glicerilo, polisorbato 20, polisorbato 80, cetil fosfato potásico, cetearil sulfato sódico,

laureth sulfato sódico químico, lauril sulfato sódico, palmitato sódico (hexadecanoato sódico) esteareth-100, esteareth-2 y esteareth-21.

5 Por "agente absorbente" se entenderá un compuesto que absorbe sustancias solubles en agua y/o liposolubles disueltas o dispersas. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el absorbente puede seleccionarse entre el grupo que incluye nitruro de boro, ácido salicílico, carbonato de magnesio, celulosa microcristalina, sílice (dióxido de silicio) y talco (E553).

10 Por "agente formador de película" se entenderá un compuesto que permite la formación de una película continua durante la aplicación de una composición cosmética y/o dermatológica. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el agente formador de película puede seleccionarse entre el grupo que incluye copolímero de acrilamida/acrilato de amonio, copolímero de acrilamida, copolímero de acrilamidopropiltrimonio/cloruro de acrilato, copolímero de acrilato/acrilato de alquilo C10-30, cera de abeja blanca (E901), *cyamopsis tetragonolobus* (Guar), hidroximetilcelulosa, polietilentereftalato (PET),
15 poligilcerilmetacrilato, policuaturnio-10, policuaturnio-11, policuaturnio-7, copolímero de polivinilpirrolidona (PVP)/Eicoseno, copolímero PVP/Hexadeceno, copolímero PVP/acetato de vinilo (VA).

20 Por "agente estabilizante" se entenderá un compuesto que permite mejorar la estabilidad de una composición cosmética y/o dermatológica y/o permite mejorar la estabilidad de los componentes incluidos en dicha composición. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el agente estabilizante puede seleccionarse entre el grupo que incluye hidroxietilcelulosa, celulosa microcristalina, policaprolactona y estannato sódico.

25 Por "agente tamponante" se entenderá un compuesto que permite mejorar el pH de una composición cosmética y/o dermatológica. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el agente tamponante puede seleccionarse entre el grupo que incluye aminometil propanol, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido ortofosfórico, ácido sebáico (ácido decanedioico), citrato sódico, hidróxido sódico, ácido tartárico, pirofosfato tetrasódico y trietilamina (TEA).

30 Por "filtro UV" se entenderá un compuesto que permita filtrar ciertos rayos UV. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el filtro UV puede seleccionarse entre el grupo que incluye benzofenona-3 (oxibenzona), benzofenona-4 (sulisobenzona), avobenzona, etilhexilmetoxicinnamato, octilmetoxicinnamato y salicilato de etilhexilo.

35 Por "hidratante" se entenderá un compuesto que permita aumentar el contenido de agua de una composición cosmética y/o dermatológica. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el hidratante puede seleccionarse entre el grupo que incluye aloe (aloe vera), extracto vegetal de piña, dimeticonol, *Echinacea angustifolia*, glicina, extracto de regaliz, extracto de jazmín, ésteres de jojoba, estearato de magnesio, manitol, miel y aceite de ricino.

40 Por "aglutinante" se entenderá un compuesto que permita aumentar la cohesión de una composición cosmética. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el aglutinante puede seleccionarse entre el grupo que incluye copolímeros de acrilato, *cyamopsis tetragonolobus* (Guar), hidroximetilcelulosa, miristato de isopropilo, carbonato de magnesio, manitol, polietilenglicol-90M, polideceno, copolímero PVP/Eicoseno, copolímero
45 PVP/Hexadeceno, copolímero PVP/VA, copolímero acrilato sódico, copolímero carboximetil sódico betaglucano, carboximetil dextrano sódico, cera parafina y goma xantano.

50 Por "estabilizante de emulsión" se entenderá un compuesto que permita mejorar la emulsificación de un compuesto cosmético y/o dermatológico y/o mejorar la estabilidad de una emulsión cosmética y/o dermatológica. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el estabilizante de emulsión puede seleccionarse entre el grupo que incluye glicol estearato acetilado, carbómero, alcohol cetearilo, *cyamopsis tetragonolobus*, hidroxietilcelulosa, celulosa microcristalina, PEG-90M, copolímero PVP/VA, carboximetil dextrano sódico, ácido esteárico, octadecanol, parafina sintética y goma xantano.

55 Por "perfume" se entenderá un compuesto que permita dar a una composición cosmética y/o dermatológica un olor particular. Estos compuestos se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, el perfume puede ser cualquier perfume apropiado para uso cosmético y/o dermatológico. El perfume puede seleccionarse, por ejemplo, entre el grupo que incluye extractos vegetales naturales, esencias de plantas, por ejemplo, extractos y/o esencias de rosas, camomila y menta.

El compuesto o compuestos usados para preparar el producto cosmético y/o dermatológico depende, en particular, de la formulación escogida para el uso cosmético y/o dermatológico de la composición de la presente invención.

5 La composición cosmética y/o dermatológica puede estar en cualquier forma apropiada para el uso de la misma. Por ejemplo, puede implicar una solución, una suspensión, una emulsión, una microemulsión o una pasta. Por ejemplo, puede implicar un gel, una crema, un aerosol, una pomada, una espuma, un polvo, un aceite, comprimidos, supositorios, cápsulas de gel, cápsulas, etc., posiblemente en forma galénica, o un dispositivo que asegure una liberación prolongada y/o retardada. Para este tipo de formulación, se usa ventajosamente un agente, tal como
10 celulosa, carbonatos o almidón.

La composición cosmética y/o dermatológica de la invención puede incluir asimismo agua. En este caso, la composición incluye preferiblemente agua desmineralizada o destilada.

15 Dicha composición puede incluir asimismo al menos un principio activo, particularmente otro principio terapéutica y/o cosmética y/o dermatológicamente activo, por ejemplo, para su uso simultáneo, por separado o prolongado en el tiempo, dependiendo de la formulación galénica usada.

La composición puede incluir adicionalmente un medio que permita facilitar la penetración del mismo en la piel. Por
20 ejemplo, un compuesto seleccionado entre el grupo que incluye un vasodilatador y glucocorticoides. Esto es beneficioso cuando la composición de esta invención está destinada a su uso tópico.

La composición de la presente invención puede usarse a través de cualquier medio apropiado conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, para su uso tópico, transdérmico o transcutáneo, o para una composición
25 administrada por vía oral. Asimismo puede usarse en un parche transdérmico. Asimismo puede aplicarse a la piel por medio de un pulverizador o por remojo.

Para la aplicación de la composición, también puede usarse un medio físico, que aumenta la penetración de la composición en la piel, por ejemplo, una película plástica depositada en o que envuelva la piel después de la
30 aplicación de la composición.

De acuerdo con la invención, en la composición cosmética y/o dermatológica de la invención, la relación del inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa con respecto al inhibidor de la hidroximetilgutaril coenzima A reductasa, o una de las sales fisiológicamente aceptables de los mismos, puede estar entre 0,002 y 50, preferiblemente entre 0,005 y 25,
35 preferiblemente entre 0,01 y 1,8, y preferiblemente de 0,05 a 0,35.

En la composición cosmética y/o dermatológica de la invención, la cantidad de inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa puede estar 0,001 al 0,500 por ciento en peso, preferiblemente del 0,005 al 0,025, preferiblemente del 0,025 al 0,1, preferiblemente del 0,100 al 0,150, preferiblemente del 0,150 al 0,200, preferiblemente del 0,200 al 0,250,
40 preferiblemente del 0,250 al 0,300, preferiblemente del 0,300 al 0,350, preferiblemente del 0,350 al 0,400, preferiblemente del 0,400 al 0,450, y preferiblemente del 0,450 al 0,500 por ciento en peso de la composición cosmética y/o dermatológica.

En la composición cosmética y/o dermatológica de la invención, la cantidad de inhibidores de la hidroximetilgutaril coenzima A reductasa puede estar entre el 0,010 al 0,500 por ciento en peso, preferiblemente del 0,075 al 0,095, preferiblemente del 0,095 al 0,100, preferiblemente del 0,100 al 0,150, preferiblemente del 0,150 al 0,200, preferiblemente del 0,200 al 0,250, preferiblemente del 0,250 al 0,300, preferiblemente del 0,300 al 0,350, preferiblemente del 0,350 al 0,400, preferiblemente del 0,400 al 0,450, y preferiblemente del 0,450 al 0,500 por
45 ciento en peso de la composición cosmética y/o dermatológica.

En la composición cosmética y/o dermatológica de la invención, la suma de la cantidad de inhibidores de la hidroximetilgutaril coenzima A reductasa y el inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa puede estar entre 0,010 y 1,000, preferiblemente del 0,1 a 0,800 por ciento en peso de la composición, y preferiblemente la cantidad es igual al
50 0,1 por ciento en peso.

Otras ventajas pueden ser evidentes adicionalmente para un experto en la técnica tras la lectura de los siguientes ejemplos, dados con fines ilustrativos y mostrados en las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 muestra los resultados de la transferencia de Western obtenidos a partir de fibroblastos de control "normales" tratados con dosis en aumento de una estatina soluble en agua (pravastatina P, de 20 a 100 μ M), y de un aminobifosfonato (NBP, zoledronato Z, de 20 a 100 μ M) (Pistas A a I, P20/Z20, P20/Z60, P20/Z100, P60/Z20, P60/Z60, P60/Z100, P100/Z20, P100/Z60 y P100/Z100, respectivamente). La Pista J es un control positivo para la presencia de prelamina A (fibroblastos de pacientes RD), la pista K es el control negativo, tratado con el disolvente en solitario (PBS).
- La figura 2 muestra los resultados obtenidos a dosis eficaces para cada uno de los productos.
- La figura 3 muestra el efecto superior obtenido al administrar los 2 productos juntos.
- La figura 4 muestra la acción de la combinación de los 2 productos en células maduras.
- La figura 5 muestra la multiplicación celular de fibroblastos midiendo el índice mitótico con respecto a las condiciones de cultivo celular. El índice mitótico corresponde a la relación entre el número de núcleos marcados (que están divididos) con respecto al número total de núcleos en el campo observado con respecto a cada tratamiento.
- Figura 6: Transferencia de Western que muestra que el bloqueo de la prenilación de la prelamina A requiere la inhibición tanto de la farnesiltransferasa como de la geranilgeraniltransferasa de tipo I. Detección de la lámina A/C en células HeLa tratadas con la farnesiltransferasa y/o geranilgeraniltransferasa de tipo I. LA = lámina A, LC = lámina C, Pre = Prelamina A.
- Figura 7: La lámina A (células de control) y prelamina A (células ratón *Zmpste24*^{-/-}) se analizaron por espectrometría de masas (MALDI-ToF). a, b: porciones del espectro correspondientes a los péptidos farnesilados (a) y geranilgeranilados (b).
- Figura 8: Análisis por espectrometría de masas de proteínas extraídas de la envoltura nuclear de células no tratadas (a), de células de pacientes de progeria tratadas con FTI (2,5 μ M cada uno, c).
- Figura 9: Análisis por espectrometría de masas de proteínas extraídas de la envoltura nuclear de fibroblastos no tratados (a) o los tratados con la mezcla de pravastatina + zoledronato (1 μ M cada uno, b) obtenida a partir de ratones *Zmpste24*^{-/-}.
- Figura 10: Ilustraciones de diversos experimentos que muestran el efecto sinérgico de la combinación pravastatina + zoledronato en la acumulación de prelamina A en células de control y en las de pacientes de progeria: (a) Detección inmunocitoquímica de lámina A/C y de prelamina A en fibroblastos humanos normales no tratados o tratados con pravastatina y/o zoledronato. (b) Detección inmunocitoquímica de lámina A/C y prelamina A en fibroblastos humanos normales y los de pacientes de progeria tratados con la combinación pravastatina + zoledronato. (c) Análisis cuantitativo del efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato en la morfología nuclear de células de pacientes de progeria. (d) Análisis cuantitativo del efecto del tratamiento de pravastatina + zoledronato en la morfología nuclear de células de pacientes de progeria en presencia de farnesol, geranilgeraniol o de ambos compuestos. Barras de error = media \pm error estándar de la media. Barra de escala = 10 μ m.
- Figura 11: Ilustración de los resultados del tratamiento de pravastatina + zoledronato que muestra la corrección de la morfología nuclear y la inducción de una relocalización parcial de las isoformas de la lámina A/C y de la lámina B1 de la lámina nuclear en el nucleoplasma, en células de pacientes de progeria. (A) Inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las imágenes a a c de cada panel son proyecciones de la intensidad promedio de 27 imágenes de la pila y muestran los túbulos del retículo nuclear marcado por la calreticulina en las células de progeria incubadas por PBS. Imágenes d a l: Secciones confocales aisladas de 0,2 μ m de espesor. Efecto del tratamiento de la pravastatina + zoledronato (g) y (h). Colocalización de la lámina B1 y la calreticulina. Barra de escala = 5 μ m.
- Figura 12: Ilustración del efecto de la pravastatina y zoledronato combinados o sin combinar en la morfología nuclear de las células de ratón *Zmpste24*^{-/-} (a) y de ratones de control (b) en cultivo, en presencia de farnesol, geranilgeraniol y de ambas moléculas.
- Figura 13: Efecto del tratamiento de pravastatina y zoledronato en anomalías de rotura bicatenarias (DSB) del ADN en las células de pacientes de progeria. Inmunodetección del foci de la histona fosforilada H2AX detectada 24 horas después de la irradiación, foci correspondiente a las roturas bicatenarias no reparadas (imágenes superiores).

Marcado nuclear del DAPI (imágenes inferiores). Curvas inferiores: Evolución del número de foci de histona fosforilada H2AX en relación con el tiempo después de la irradiación en las células de control (cuadrado negro) y las células de progeria (cuadrado blanco) incubadas con PBS o tratadas con pravastatina + zoledronato. Cada curva representa la media \pm error estándar de la media al menos 3 experimentos.

5
 10
 15
 Figura 14: Efecto del tratamiento de la pravastatina + zoledronato en el fenotipo progeroide de ratones *Zmpste24*^{-/-}: (a) Fotografías representativas de ratones de 3 meses *Zmpste24*^{+/+}, *Zmpste24*^{-/-} y *Zmpste24*^{-/-} tratados con la combinación pravastatina + zoledronato. Barra de escala = 1 cm. (b) Peso de ratones de 3 meses *Zmpste24*^{+/+} (n = 12), *Zmpste24*^{-/-} (n = 13) y *Zmpste24*^{-/-} tratados (n = 15). (c) Curvas Kaplan-Meier que muestran un aumento significativo de la duración de la vida de los ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados. (d) Ilustración microtomografía computerizada tridimensionalmente de la tibia de ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados y no tratados (imagen superior). El panel inferior muestra el volumen óseo relativo y el número de huesos trabeculares en los ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados y no tratados. (e) Cuantificación de las anomalías nucleares de los hepatocitos de ratones *Zmpste24*^{+/+} *Zmpste24*^{-/-} y ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados. Las flechas blancas muestran los núcleos anormales. Barra de escala = 10 μ m. (f) Expresión relativa de los genes diana p53 en el hígado y corazón de ratones *Zmpste24*^{+/+} *Zmpste24*^{-/-} y ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados, analizados por RT-PCR cuantitativa. *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,0001. Las barras de error representan la media \pm error estándar de la media.

Figura 15: Efecto de una pravastatina en solitario o de zoledronato en la vida de ratones *Zmpste24*^{-/-}; curvas Kaplan-Meier con pravastatina en solitario (a) y zoledronato en solitario (b) en ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados (rombo blanco) y no tratados (círculos negros).

Figura 16: Efecto de un tratamiento de pravastatina + zoledronato en la dirección de la vida de ratones *Lmna*^{-/-}: Curvas Kaplan-Meier de ratones *Lmna*^{-/-} tratados con pravastatina + zoledronato (n = 12, rombo blanco), en comparación la de ratones no tratados (círculos negros, n = 11).

EJEMPLOS

30
EJEMPLO 1: Efecto sinérgico de la asociación de un inhibidor de la hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa (una estatina soluble en agua: pravastatina) y un inhibidor de la farnesilpifosfato sintasa (un aminobifosfonato: zoledronato) en cultivos celulares normales y progeroides.

A PROTOCOLOS

35 A.1. Células y cultivo celular

Las líneas celulares son los fibroblastos de control AG16409 obtenidos a partir del Coriell Institute, o fibroblastos obtenidos a partir de biopsias de pacientes afectados por Dermopatía Restrictiva. Se cultivan a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en sala blanca P2.

40 El medio de cultivo completo habitual es:

- RPMI (Invitrogen) complementado con
- Suero Fetal de Ternero al 20% (Invitrogen)
- 45 - L-Glutamina 200 mM (Invitrogen)
- Mezcla de Penicilina/Estreptomicina/Fungizona 1 x (Stock 100 X, Cambrex).

A.2. Recolección de las células

50 Las células se recolectan por tripsinización del siguiente modo (protocolo para un matraz grande, 75 cm², BD Falcon):

- El medio se aspira;
- Las células se lavan con 10 ml de 1 x PBS (Invitrogen);
- 55 - Se añaden 5 ml de una solución de 1 X Tripsina/EDTA (Cambrex);
- El matraz se incuba durante aproximadamente 6 min a 37 °C, el tiempo requerido para que las células se desprendan;
- La tripsina se inhibe por dilución en 15 ml de medio completo;
- Las células se sedimentan por centrifugación durante 10 min a 1.000 revoluciones por minuto a 16 °C;

- El sedimento se suspende de nuevo en 2 ml de 1 x PBS, y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones.

Las células obtenidas se congelan para su uso posterior o se subcultivan a partir de este sedimento lavado.

5

A.3. Tratamientos

La solución de pravastatina (estatina soluble en agua) usada se prepara como se indica a continuación:

10 Se recogen 40 mg de pravastatina (Sigma Aldrich, P4498) en agua estéril para formar una solución madre 10 mM.

Las concentraciones ensayadas finales fueron 500 nM, 1, 5, 50 y 100 μ M, que se obtuvieron diluyendo la solución madre en el medio completo.

15 La solución de zoledronato (NBP) usada se prepara como se indica a continuación:

Una solución madre de ácido (1-hidroxi-2-imidazol-1-il-1-fosfono-etil)fosfónico (0,8 mg/ml, Novartis) se ajusta a una concentración de 2 mM.

20 Las concentraciones ensayadas finales fueron 500 nM, 1, 5, 50 y 100 μ M, que se obtuvieron diluyendo la solución madre en el medio completo.

A.4. Transferencia de Western

25 A.4.1. Preparación de las células

Para un experimento de transferencia de Western, las células se trataron como se indica a continuación:

Se siembran aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células en un matraz grande y se cultivan en las condiciones anteriores hasta casi confluencia (4 días).

30

Al final de 4 días, las células se lavan con 1 x PBS y se recogen en un medio completo complementado con el tratamiento.

35 Las células se incuban durante el tiempo de tratamiento (de 6 a 72 horas, secuencial o simultáneamente) en la incubadora a 37 °C.

Al final del tratamiento, las células se tripsinizan (protocolo anterior) y el sedimento resultante se almacena a -80 °C hasta que se extraen las proteínas.

40

A.4.2. Extracción de las proteínas para transferencia de Western

El sedimento celular se recoge en 300 μ l de un tampón de lisis:

Triton X 100	1%
SDS	0,1%
Desoxicolato sódico	0,5 %
NaCl	50 mM
EDTA	1 mM
TrisHCl pH 7.4	20 mM
Inhibidor de la proteasa (Roche 11697498001)	1 comprimido por 50 ml

45

Adición extemporánea de

Ortovanadato sódico	1 mM
PMSF	1 mM

Las células se exponen a sonicación dos veces durante 30 s (*Brandson Sonifier Cell Disruptor B15*).

50 Los restos celulares se centrifugan durante 10 min a 10,000 revoluciones por minuto a 4 °C.

El sobrenadante proteico se conserva a -80 °C hasta su uso.

El análisis proteico se realiza al momento de la descongelación.

5

A.4.3. Transferencia de Western

- Gel

10 Se usa convencionalmente un gel de acrilamida al 8% para detectar las diversas formas de láminas A/C.

Acrilamida/bisacrilamida 37/1	8%
TrisHCl pH 8,8	375 mM
SDS	0,1%
APS	0,1%
TEMED	0,01%

Un gel de concentración se vierte sobre el gel separador

Acrilamida/bisacrilamida 37,5/1	3%
TrisHCl pH 6,8	375 mM
SDS	0,1%
APS	0,1%
TEMED	0,01%

15

Se determina la concentración proteica de las muestras, y las alícuotas se ajustan a 50 µg por tubo en un tampón de lisis en csp 15 µl.

Se añaden 5 µl de un tampón de carga a cada muestra:

20

SDS	4%
TrisHCl pH 6,8	100 mM
Glicerol	20%
β-mercaptoetanol	20%
Azul de bromofenol	trazas

Las muestras se desnaturalizan por calentamiento durante 5 min a 95 °C y se depositaron en los pocillos.

La migración se produce a 50 y después a 100 voltios, en un tampón:

25

Tris-Base	0,3%
Glicina	1,44%
SDS	0,1%

- Transferencia

La membrana de transferencia (Hybon P, Amersham Biosciences) se prepara por remojo en etanol seguido de un baño en agua estéril y durante 10 min en el tampón de transferencia:

30

Tris-Base	12 mM
Glicina	96 mM
Etanol	20%

El gel se humedece durante 20 min en el tampón de transferencia, y después el sándwich se monta (sistema Miniprotéan, Biorad).

35

La transferencia se produce generalmente por la noche, en una cámara fría a 10 voltios.

La membrana se aclara en 1 x PBS, se mantiene húmeda y se usa tal cual para la operación de detección.

- Detección

5 La membrana se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de saturación:

Caseína	10%
Tween 20	0,1%
PBS	1 X

Se aclara dos veces 10 min en un tampón de lavado (Tween 20 al 0,1%/1 x PBS).

10 El anticuerpo primario se diluye en el tampón de saturación (para detalles y dilución, véase la sección de inmunomarcado a continuación).

La membrana se incuba con los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

15 Tras la finalización de ésta, se aclara 3 veces con un tampón de lavado, después se lava 3 veces durante 15 min con el mismo tampón.

El anticuerpo secundario (sistema acoplado a peroxidasa, Jackson Immunoresearch) se diluye a 1/10.000 en un tampón de saturación.

20

La membrana se incuba con esta solución durante 30 a 45 min a temperatura ambiente en agitación.

Tras la finalización, se aclara 3 veces con un tampón de lavado y después se lava 3 veces durante 15 min con el mismo tampón.

25

La operación de detección se realiza con el kit *ECL Plus Western Blotting System* de Amersham Bioscience, según las instrucciones del proveedor.

Después del desarrollo, la membrana se expone sobre una película *Biomax MR* (Kodak), el tiempo requerido para obtener una señal satisfactoria.

A.5. Inmunomarcado

A.5.1. Preparación de las células

35

Un cultivo celular se tripsiniza y las células se contaron en una cámara Neubauer.

Se sembraron pocillos de cultivo estilo Labtech (Nunc, Ref. 177399), a la velocidad de 5×10^4 células por pocillo.

40 El medio de cultivo completo se complementa con el tratamiento o tratamientos (estatina, NBP, ambos), y las células se cultivan durante el tiempo *ad hoc*.

Tras la finalización, el medio de cultivo se aspira y los pocillos se desmontan.

45 Los portaobjetos se lavan en 1 x PBS.

Las células se fijan en una solución al 4% de paraformaldehído (en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

50 Se realiza un lavado de 10 minutos en 1 x PBS.

Las células se deshidratan por baños sucesivos de 3 min en soluciones que contienen un porcentaje en aumento de etanol (70, 90, 100%, repitiéndose el último baño).

55 Después del secado, los portaobjetos se almacenan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

A.5.2. Marcado

Después de la descongelación, las células se incuban durante 5 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda en 50 μ l de una solución de permeabilización:

5	PBS	1 X
	Triton X 100	0,5 %
	RNS (Suero de Conejo Normal, Vector S5000)	5 %
	Inhibidor de la proteasa (Roche 11697498001)	1 comprimido por 50 ml

Se realizan 3 baños de preincubación de 15 min cada uno en 50 μ l de la solución de incubación:

	PBS	1 X
	RNS	5 %
	Inhibidor de la proteasa (Roche 11697498001)	1 comprimido por 50 ml

10 El anticuerpo primario se diluye a 1/100 en 50 μ l de solución de incubación se pone en contacto con las células durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

Los anticuerpos primarios usados son de 2 tipos:

- 15 - Ratón anti-lámina A/C (lado N-terminal), clon 4A7, donación de G. Morris (Oswestry, Reino Unido)
 - Cabra anti-prelamina A (15 aa extremo C-terminal), producto SC6214, Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Se realizan 3 aclarados de 15 min cada uno en 50 μ l de 1 x PBS.

20 La incubación con el anticuerpo secundario se produce durante 1 hora en 50 ml de solución de incubación a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Los anticuerpos secundarios son de dos tipos:

- Burro anti-ratón, Jackson Immunoresearch, dilución a 1/100
 - Burro anti-cabra, Jackson Immunoresearch, dilución a 1/200.

25 Se realizan 3 aclarados de 15 min cada uno en 50 μ l de 1 x PBS.

La incubación con 100 μ l de 50 ng/ml de solución de DAPI (SERVA, Ref. 18860) se realiza durante 15 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

30 Se realizan 3 aclarados de 5 min cada uno en 1 x PBS en bandejas portaobjetos.

Se realiza un aclarado final durante 5 min en una solución Tween 20 al 0,1% en PBS.

35 A.5.3. Montaje

Las células se sumergen en una gota de VectaShield (Vector), se cubren con un cubreobjetos y se observan en un microscopio de fluorescencia (Leica DMR, Leica Microsystems), equipado con un sistema de cámara coolSNAP (Princeton).

40 **B. RESULTADOS**

B.1. Transferencia de Western (Figura 1)

45 Los fibroblastos de control "normales" se trataron con una estatina soluble en agua (pravastatina P, de 20 a 100 μ M), y con un aminobifosfonato (NBP zoledronato Z, de 30 a 100 μ M) en asociación (Pistas A a I, P20/Z20, P20/Z60, P20/Z100, P60/Z20, P60/Z60, P60/Z100, P100/Z20, P100/Z60 AND P100/Z100, respectivamente). La transferencia de Western muestra la "aparición" de una banda que corresponde al tamaño de la prelamina A no madura (no truncada) en función del aumento de la concentración de las dos moléculas, lo que confirma que es necesaria la farnesilación a la maduración de la lámina A. Este resultado muestra que el bloqueo de la síntesis de farnesil-PP en dos puntos de la ruta metabólica es más eficaz que el bloqueo en un único punto, en cuanto a la inhibición de la

farnesilación de la prelamina A, al menos *ex vivo*.

B.2. Dosis y tiempo-respuesta en inmunohistoquímica (figura 2)

5 Las curvas dosis-respuesta y tiempo-respuesta hicieron posible determinar la eficacia máxima midiendo 2 parámetros en las células de control sanas, por un lado, y después en las células de pacientes HGPS.

La combinación pravastatina (soluble en agua)/zoledronato (NBP) más eficaz se obtuvo durante una administración 1 μM de pravastatina durante 24 horas, y de zoledronato durante 12 horas en células sanas. No se observó
10 toxicidad. Usando el mismo protocolo de administración, el número de núcleos "deformados" cayó del 75 al 40% en las células HGPS (células con anomalías nucleares). Se midió la tasa de prelamina A obtenida de células sanas. Esta medición mostró que esta tasa es máxima.

B.3. Efecto del tratamiento en inmunohistoquímica (figura 3)

15 La acción combinada de la pravastatina y zoledronato, tratamiento: Pravastatina 100 μM durante 12 horas, zoledronato 20 μM durante 6 horas muestra una mejor eficacia, ya que la tasa de prelamina A producida en células sanas (se estima al 35 %) es mucho mayor en combinación que si las moléculas se añaden individualmente (25 y 15 %, respectivamente). Además, la tasa de núcleos deformados (un signo de toxicidad en células sanas) es mínima
20 (menos del 10%, e inferior a la de las células tratadas con pravastatina en solitario (aproximadamente 12%).

B.4. Efecto inmunohistoquímico sobre células maduras (figura 4)

En base al número de "pases" (número de subcultivos de las células) y, por lo tanto, en base a la edad de las
25 células, la proporción de células anormales aumenta. Esta característica es típica de las células HGPS no tratadas. Si las células HGPS se tratan con pravastatina 1 μM durante 24 horas y con zoledronato 1 μM durante 12 hora, esta proporción se mantiene, e incluso desciende ligeramente (menos del 40% frente a más del 80% en células tratadas con un placebo).

30 B.5. Conclusión

La combinación pravastatina/zoledronato es eficaz a dosis para las que casi no se observa ningún efecto cuando las moléculas se administran por separado.

35 Por lo tanto, el efecto fisiológico de bloqueo de la ruta de prenilación se obtiene con dosis mucho menores que las usadas en un tratamiento único, en artículos publicados sobre cultivos celulares (Kusuyama y col., 2006 (27), 10 μM de pravastatina en solitario en progenitores de células vasculares; Flint y col., 1997 (13), 25 μM de pravastatina en células musculares de rata neonatal).

40 **EJEMPLO 2: Efecto de una composición cosmética de acuerdo con la invención que incluye un inhibidor soluble en agua de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa en la división de fibroblastos humanos maduros y en fibroblastos humanos jóvenes.**

A. OBJETO DEL EJEMPLO

45 En el presente ejemplo, se mide la evaluación del efecto *in vitro* de un inhibidor soluble en agua o liposoluble de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa sobre la tasa de división celular (índice mitótico) de los fibroblastos. Asimismo, se realizó una comparación del efecto de la composición sobre fibroblastos humanos maduros en comparación con fibroblastos humanos jóvenes. El número de
50 principios activos en este ejemplo es cuatro, habiéndose usado los productos en combinaciones de dos. Los principios activos son:

A1: Zolendronato
A2: Alendronato
55 B1: Pravastatina
B2: Simvastatina

Las combinaciones particulares usadas en este ejemplo son: A1B1, A1B2, A2B1, A2B2.

B. PROTOCOLO

En el presente ejemplo, se cultivaron dos lotes de fibroblastos, fibroblastos maduros (lote N° 9052) y los jóvenes (lote N° 7080) en un medio RPMI (Invitrogen) que contenía suero fetal de ternero sin antibiótico al 10%, durante 24 horas después de la tripsinización de los platos suministrados.

Los diversos principios activos se añadieron a una concentración final de 1 μ M cada uno durante 24 horas (se realizó una dilución de 1.000 veces de una solución madre en agua para los compuestos A1, A2 y B1, o en etanol al 100% para el compuesto B2).

El índice mitótico se evaluó mediante la incorporación de Bromo-desoxi-uridina (BrdU) durante un periodo de 45 minutos, después de 24 horas de incubación de las células con una de las combinaciones de principio activo. El análisis inmunohistoquímico permite revelar las células en la fase de síntesis de ADN (células en predivisión). Se realizó una tinción de los núcleos (material genético) incorporando di-amino fenil indol (DAPI).

La captura de 6 campos microscópicos (OLYMPUS IX 70) permitió medir el índice mitótico a través de análisis por imagen (OLYMPUS AnalySIS). El índice mitótico corresponde a la relación del número de núcleos que incorporan el BrdU con respecto al número de núcleos que incorporan el DAPI. Se calcula estadísticamente un índice medio con una desviación estándar de entre 0,005 y 0,061.

Una prueba de T de dos colas permitió la medición de la relevancia estadística de los resultados obtenidos.

C. RESULTADOS**25 C.1. Observación visual general de las células**

Estos resultados muestran una capacidad de división muy baja de los fibroblastos maduros en ausencia de cualquier tratamiento, previamente al estudio.

Los fibroblastos jóvenes mostraron una capacidad de división mayor que la de los fibroblastos maduros. La capacidad de división de los fibroblastos maduros fue menor del 5 %, mientras que la capacidad de división de los fibroblastos jóvenes fue del 15,6%. Por lo tanto, la diferencia en la capacidad de división entre los fibroblastos maduros no tratados y los fibroblastos jóvenes no tratados fue igual a 3.

Al realizar este ejemplo, no se observó visualmente toxicidad después de 24 horas de incubación de los fibroblastos con las combinaciones ensayadas de principios activos.

Al realizar este ejemplo, no se observó ningún efecto tóxico del etanol (0,1% final) después de 24 horas de incubación.

40 D. EVALUACIÓN DE LOS ÍNDICES MITÓTICOS (figura 5)

De manera general, el número de fibroblastos maduros sin ningún tratamiento en fase de síntesis de ADN fue extremadamente pequeño: inferior al 5 % (véase la figura 5, columna 1).

El índice mitótico no fue muy elevado para los fibroblastos jóvenes: del orden del 15 % (véase la figura 5, columna 6).

Por comparación con los fibroblastos maduros de control sin tratamiento alguno, los fibroblastos de control expuestos a etanol (0,1% - 24 horas), no muestran ninguna diferencia significativa ($p = 0,11$, $n = 6$) en el índice mitótico de los mismos. Después, los valores se consolidaron (Control, $n = 12$).

Los resultados mostrados en la figura 5, columna 2 muestran un efecto de activación de A1B1 = Zolendronato-Pravastatina en el índice mitótico de los fibroblastos maduros en comparación con el control (estimulación por un factor de 2 máximo) ($p < 0,001$, $n \geq 6$).

Por lo tanto, este ejemplo muestra que la aplicación de la combinación Zolendronato-Pravastatina tiene un efecto de activación sobre la división celular de los fibroblastos de un sujeto anciano.

EJEMPLO 3: Efecto de la asociación de un inhibidor soluble en agua de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa sobre un modelo de ratón que tiene un síndrome progeroide

- 5 Los ratones KO *Zmpste24^{-/-}* usados aquí son los descritos en el artículo de referencia de Varela y col., 2005 (49). Se aportó una prueba de la eficacia de la combinación de las 2 moléculas (pravastatina y zoledronato) en cooperación con un laboratorio español (Pr C. Lopez-Otin). La eficacia se obtiene a dosis combinadas que no tienen efecto cuando los productos se usan separados, demostrando así un efecto sinérgico.
- 10 Las 2 moléculas (ácido zolendróico (Zometa (marca registrada)) 100 µg/kg/día y pravastatina 100 mg/kg/día) se diluyeron con 1 x PBS y se inyectaron por vía intraperitoneal, diariamente, en ratones de 1 mes de edad y hasta la muerte de los mismos. Los controles son ratones salvajes del mismo rango tratados únicamente con 1 x PBS.

La supervivencia de los ratones tratados mejoró en gran medida, y fue máxima, en particular, para las hembras, con un aumento medio de vida de aproximadamente el 80%. Los síntomas clínicos de la enfermedad se redujeron considerablemente en comparación con los individuos tratados con el PBS en solitario. En particular, se observó un efecto del tratamiento sobre la piel y el recrecimiento del pelo en estos ratones, en comparación con los ratones tratados con el PBS, que mostraron grandes regiones sin pelo.

- 20 **EJEMPLO 4: Composiciones cosméticas de acuerdo con la invención que incluyen un inhibidor soluble en agua de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa**

Composición 1

Ingredientes	Porcentaje
Pravastatina	0,075
Ácido Alendróico	0,025
Alcohol Desnaturalizado	15,00
PEG-8 Dimeticona	5,000
Gliceril Polimetacrilato	4,950
Glicerina	3,000
PEG-400	3,000
Butilenglicol	1,070
Fenoxietanol	0,430
Perfume (Fragancia)	0,350
Copolímero Acrilatos/Acrilato de Alquilo C10-30	0,320
PPG-26-Buteth-26	0,220
Clorfenesina	0,200
Trometamina	0,170
PEG-40 aceite de ricino hidrogenado	0,140
Dióxido de titanio, Mica, Sílice	0,300
Metilparabeno	0,120
Propilenglicol	0,050
Laureth-3	0,050
Etilparabeno	0,024
Butilparabeno	0,024
Hidroxietilcelulosa	0,020
Propilparabeno	0,015
Hialuronato Sódico	0,005
Agua	csp 100

25

Composición 2

Ingredientes	Porcentaje
Pravastatina	0,075
Ácido Alendróico	0,025
Glicerina	5,000
Beheneth-25	5,000

ES 2 546 208 T3

Carbonato de Dicaprililo	4,000
Octildodecanol	3,000
Alcohol cetearílico	3,000
Polimetacrilato de Glicerilo	2,970
Butilenglicol	2,010
Dimeticona	2,000
Oleato de decilo	2,000
Aceite de almendras dulces	2,000
Palmitato de Cetilo	2,000
Polimetilmetacrilato	1,000
Fenoxietanol	0,430
Butilparabeno	0,424
Poliacrilato sódico	0,300
Copolímero Acrilatos/Acrilato de Alquilo C10-30	0,300
Clorfenesina	0,300
Acetato de tocoferilo	0,250
Perfume (Fragancia)	0,200
Laureth-3	0,150
Metilparabeno	0,120
EDTA de disodio	0,100
Goma Xantano	0,100
Hidróxido sódico	0,089
Hidroxietilcelulosa	0,060
PEG-8 (polietilenglicol)	0,049
Propilenglicol	0,030
Tocoferol	0,025
Etilparabeno	0,024
Propilparabeno	0,015
Isobutilparabeno	0,010
Palmitato de Ascorbilo	0,004
Ácido Ascórbico	0,0008
Ácido Cítrico	0,0008
Agua	csp 100

Composición 3

Ingredientes	Porcentaje
Triglicérido Caprílico/Cáprico	5,000
Gliceril Polimetacrilato	4,950
Esteareth-21	3,000
Glicerina	3,000
Polimetil Metacrilato	3,000
Butilenglicol	2,010
Esteareth-2	2,000
Ciclopentasiloxano	1,505
Butyrospermum Parkii (manteca de karité)	1,000
Aceite de almendras dulces	1,000
Laureth-3	0,750
PCA Sódico	0,523
Fenoxietanol	0,430
Carbómero	0,300
Acetato de Tocoferol	0,250
Nitruro de Boro	0,250
Clorfenesina	0,250
Copolímero Dimeticona	0,245
Perfume (Fragancia)	0,200
Poliacrilamida	0,197

ES 2 546 208 T3

Metilparabeno	0,120
Isoparafina C14-14	0,100
EDTA de disodio	0,100
Hidróxido sódico	0,0875
Hidroxietilcelulosa	0,060
Propilenglicol	0,050
Laureth-7	0,025
PEG-8 (Polietilenglicol), Tocoferal, Palmitato de Ascorbilo, Ácido Ascórbico, Ácido Cítrico	0,080
Etilparabeno	0,024
Butilparabeno	0,024
Propilparabeno	0,015
C,I 42090 (azul 1)	0,0002
Pravastatina	0,075
Ácido Alendrónico	0,025
Agua	csp 100

Composición 4

Ingredientes	Porcentaje
Triglicérido Caprílico/Cáprico	5,000
Gliceril Polimetacrilato	4,950
Esteareth-21	3,000
Glicerina	3,000
Polimetil Metacrilato	3,000
Butilenglicol	2,010
Esteareth-2	2,000
Ciclopentasiloxano	1,505
Butyrospermum Parkii (manteca de karité)	1,000
Aceite de almendras dulces	1,000
Laureth-3	0,750
PCA Sódico	0,523
Fenoxietanol	0,430
Carbómero	0,300
Acetato de Tocoferol	0,250
Nitruro de Boro	0,250
Clorfenesina	0,250
Copolímero Dimeticona	0,245
Perfume (Fragancia)	0,200
Poliacrilamida	0,197
Metilparabeno	0,120
Isoparafina C13-14	0,100
EDTA de disodio	0,100
Hidroxietilcelulosa	0,060
Propilenglicol	0,050
Laureth-7	0,025
PEG-8, Tocoferol, Palmitato de Ascorbilo, Ácido Ascórbico, Ácido Cítrico	0,080
Etilparabeno	0,024
Butilparabeno	0,024
Propilparabeno	0,015
C.I 42090 (Azul 1)	0,0002
Pravastatina	0,095
Ácido Zolendrónico	0,005
Agua	csp 100

Composición 5

Ingredientes	Porcentaje
--------------	------------

ES 2 546 208 T3

Alcohol Desnaturalizado	15,000
PEG-8 Dimeticona	5,000
Gliceril Polimetacrilato	4,950
Glicerina	3,000
PEG-400	3,000
Butilenglicol	1,070
Fenoxietanol	0,430
Perfume (Fragancia)	0,350
Copolímero Acrilatos/Acrilato de Alquilo C10-30	0,320
PPG-26-Buteth-26	0,220
Clorfenesina	0,200
Trometamina	0,170
PEG-40 aceite de ricino hidrogenado	0,140
Dióxido de Titanio, Mica, Sílice	0,300
Metilparabeno	0,120
Propilenglicol	0,050
Etilparabeno	0,024
Butilparabeno	0,024
Hidroxietilcelulosa	0,020
Propilparabeno	0,015
Hialuronato Sódico	0,005
Pravastatina	0,095
Ácido Zolendrónico	0,005
Agua	csp 100

Composición 6

Ingredientes	Porcentaje
Glicerina	5,000
Beheneth-25	5,000
Carbonato de Dicaprililo	4,000
Octildodecanol	3,000
Alcohol Cetearílico	3,000
Polimetacrilato de Glicerilo	2,970
Butilenglicol	2,010
Dimeticona	2,000
Oleato de decilo	2,000
Aceite de almendras dulces	2,000
Palmitato de Cetilo	2,000
Polimetilmetacrilato	1,000
Fenoxietanol	0,430
Butilparabeno	0,424
Poliacrilato sódico	0,300
Copolímero Acrilatos/Acrilato de Alquilo C10-30	0,300
Clorfenesina	0,300
Acetato de tocoferilo	0,250
Perfume (Fragancia)	0,200
Laureth-3	0,150
Metilparabeno	0,120
EDTA de disodio	0,100
Goma Xantano	0,100
Hidróxido sódico	0,089
Hidroxietilcelulosa	0,060
PEG-8 (Polietilenglicol)	0,049
Propilenglicol	0,030
Tocoferol	0,025
Etilparabeno	0,024

Propilparabeno	0,015
Isobutilparabeno	0,010
Palmitato de Ascorbilo	0,004
Ácido Ascórbico	0,0008
Ácido Cítrico	0,0008
Pravastatina	0,095
Ácido Zolendrónico	0,005
Agua	csp 100

Composición 7

Ingredientes	Porcentaje
Agua desmineralizada	86,678%
Cetiol A (marca registrada) (Laurato de hexilo)	5,000%
Glicerina Codex	3,000%
Simulsol 165 (marca registrada) (estearato de glicerilo)	1,500%
Montanov 14 (marca) (alcohol miristílico y glucósido de miristilo)	1,000%
Phenonip (marca registrada) (fenoxietanol, metilparabeno, butilparabeno, etilparabeno, propilparabeno)	0,600%
Solución acuosa al 10% de NaOH	0,512%
Covabsorb (marca registrada) (Metoxicinnamato de etilhexilo, Metoxidibenzoilmetano de butilo, Salicilato de etilhexilo, PPG-26-Buteth-26, Polietilenglicol hidrogenado G-40, Aceite de ricino)	0,500%
Pravastatina	0,500%
Carbopol (marca no registrada) (ácido prop-2-enoico)	0,300%
Clorfenesina	0,250%
Sepigel 305 (marca) (Poliacrilamida e Isoparafina en C13-14 y Laureth-7)	0,100%
Alendronato	0,060%
	100,000%

Composición 8

Agua desmineralizada	87,218%
Cetiol A (marca registrada) (Laurato de hexilo)	5,000%
Glicerina Codex	3,000%
Simulsol 165 (marca registrada) (estearato de glicerilo)	1,500%
Montanov 14 (marca) (alcohol miristílico y miristil glucósido)	1,000%
Phenonip (marca registrada) (fenoxietanol, metilparabeno, butilparabeno, etilparabeno, propilparabeno)	0,600%
Solución acuosa al 10% de NaOH	0,512%
Covabsorb (marca registrada) (Metoxicinnamato de etilhexilo, Metoxidibenzoilmetano de butilo, Salicilato de etilhexilo, PPG-26-Buteth-26, Polietilenglicol hidrogenado G-40, Aceite de ricino)	0,500%
Carbopol (marca no registrada) (ácido prop-2-enoico)	0,300%
Clorfenesina	0,250%
Sepigel 305 (marca) (Poliacrilamida e Isoparafina en C13-14 y Laureth-7)	0,100%
Pravastatina	0,010%
Alendronato	0,010%
	100,00%

5

EJEMPLO 5: Pruebas de irritación cutánea sobre piel reconstruida usando las composiciones cosméticas de acuerdo con la invención que incluyen un inhibidor soluble en agua de la hidroximetilgultaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa

10 En el presente ejemplo, se aplican composiciones cosméticas que incluyen un inhibidor soluble en agua de la hidroximetilgultaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa (una estatina: pravastatina) y un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa, ácido zolendrónico o ácido alendrónico, a epidermis humanas reconstruidas *in vitro*. La

dimensión de la capa dérmica es de 0,5 cm². Se aplican diversas cantidades de la composición cosmética, que varían entre 30 a 50 mg.

La viabilidad celular se determina por un ensayo "MTT". El ensayo "MTT" es un ensayo colorimétrico basado en la cuantificación de deshidrogenasas mitocondriales, que son enzimas que indican la viabilidad celular. Este ensayo se realiza en dos momentos de aplicación diferentes: 24 y 72 horas.

Asimismo, se realizan controles positivos usando dodecil sulfato sódico (SDS) y controles negativos.

10 EJEMPLO 6: Pruebas de irritación ocular aguda usando composiciones cosméticas de acuerdo con la invención, incluyendo un inhibidor soluble en agua de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa

En el presente ejemplo, las pruebas se realizaron de acuerdo con las "buenas prácticas de laboratorio" según los requisitos reglamentarios, la Orden del 10 de agosto de 2004 y el Artículo L5131-5 del Código de Salud Pública.

La evaluación de la citotoxicidad se realiza usando la técnica de la precipitación salina del rojo neutro sobre células corneales de la línea SIRC.

20 Ejemplo 7: Efectos de la combinación de un inhibidor soluble en agua de la hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa sobre extractos *ex vivo* de piel humana

A. Protocolo

En el presente ejemplo, las pruebas se realizaron en piel obtenida a partir de un donante de aproximadamente 60 años. Se hizo una preparación de 21 explantes de piel humana y se mantuvo viva en un medio BEM (medio de explantes de BIO-EC).

Los explantes se dividieron en 3 lotes de seis explantes y un lote de control T0 de 3 explantes, como se indica a continuación:

- **T0** Control plástico: 3 explantes
- **T** Control no tratado: 6 explantes
- **R** Control positivo: 6 explantes
- 35 - **P** Explantes tratados con la composición de la invención: 6 explantes

A.1. Tratamiento

El tratamiento se realizó de diferentes maneras, el primer día (J0), dos horas después de la preparación de los explantes, después J+1 día, J+2 días, J+4 días, J+6 días, J+8 días y J+10 días.

Los productos se aplicaron a los explantes como se indica a continuación:

- **T**: los explantes no reciben ningún tratamiento,
- 45 - **R**: cada uno de los explantes recibe 1 mg del control positivo (crema en retinol) los días J0, J+2 y J+4.
- **P1**: cada uno de los explantes recibe 2 mg del producto P en cada momento del tratamiento.

El tratamiento se realizó a través de la aplicación tópica de la composición de la invención. La composición se distribuyó después sobre toda la superficie del explante, usando una espátula. La mitad del medio de cultivo se repuso cada dos días y los explantes se mantuvieron vivos a 37 °C en una atmósfera húmeda enriquecida con CO₂ al 5 %.

A.2. Muestreo para histología

55 El día J0, los 3 explantes del lote T0 se muestrearon.

Los días J+6 y J+11, se muestrearon 3 explantes de cada lote. Las muestras se cortaron en dos, una mitad se fijó en formol y la otra mitad se congeló a -80 °C, de acuerdo con el procedimiento BIO-EC "P006-PPEH".

B. Estudio histológico

Después de 24 horas de la fijación en formol, las muestras se deshidrataron, se impregnaron y se recubrieron con parafina. Se realizaron secciones de 5 µm para su observación morfológica.

5

B.1. Primera etapa: Estudio morfológico

El estudio morfológico de las estructuras epidérmicas y dérmicas se realizó en secciones coloreadas con tricrómico de Masson, una variante de Goldner.

10

B.2. Segunda etapa:**B.2.1. Inmunomarcado con KI67:**

15 El inmunomarcado de las células en mitosis se realizó en secciones congeladas con el anticuerpo policlonal anti-KI 67 (Novo Castra) desarrollado en DAB. Las células positivas se cuentan sobre toda la longitud epidérmica y los promedios se normalizaron con respecto al número de células marcadas por cm.

B.2.2. Inmunomarcado con colágeno I:

20

El inmunomarcado con colágeno I se realizó en secciones congeladas con el anticuerpo policlonal anti-colágeno I desarrollado en FITC. Los núcleos se colorearon para el recuento con yoduro propidio.

B.2.3. Inmunomarcado con colágeno III:

25

El inmunomarcado con colágeno III se realizó en secciones congeladas con el anticuerpo policlonal anti-colágeno III desarrollado en DAB. Los núcleos se colorearon para el recuento con hemalum de Masson.

B.2.4. Inmunomarcado con colágeno IV:

30

Inmunomarcado con colágeno IV se realizó en secciones congeladas con el anticuerpo policlonal anti-colágeno IV (Cliniscience) desarrollado en FITC. Los núcleos se colorearon para el recuento con yoduro de propidio.

B.2.5. Inmunomarcado con colágeno VII:

35

El inmunomarcado con colágeno VII se realizó en secciones congeladas con el anticuerpo monoclonal anti-colágeno VII desarrollado en FITC. Los núcleos se colorearon para el recuento con yoduro de propidio.

B.2.6. Inmunomarcado con PECAM1:

40

Las células endoteliales se visualizaron por inmunomarcado con PECAM-1, que se realizó en secciones congeladas con el anticuerpo monoclonal anti-PECAM1 desarrollado en Fast-red.

EJEMPLO 8: Efecto de la combinación de una hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa soluble en agua y el inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa sobre cultivos *in vitro* de células constitutivas de la piel.

45

Este ejemplo se realizó con las mismas combinaciones de principios activos que en el ejemplo 2 anterior. Estas diversas variaciones de principios activos se usaron *in vitro* con el fin de evaluar el efecto de los mismos sobre los parámetros fisiológicos implicados en el envejecimiento de la piel.

50

Las combinaciones usadas en este ejemplo son A1B1, A1B2, A2B1, A2B2, respectivamente. Estas cuatro combinaciones se ensayaron en varias concentraciones, realizándose los experimentos por triplicado (lo que representa al menos 36 puntos experimentales).

55

Las concentraciones de las 4 combinaciones se proponen por el solicitante y, por lo tanto, en esta fase de diseño, no se anticipa ninguna citotoxicidad *in vitro* (salvo a título de control básico). El experimento se realizó en cultivos de fibroblastos como se presenta en el ejemplo 1. Asimismo, esta prueba se aplica a cultivos de queratinocitos. Los siguientes parámetros se examinaron para las 4 combinaciones de principios activos a las concentraciones

indicadas.

- Medición del índice mitótico.
- Medición de la remodelación de la matriz extracelular a través de la contracción de las estructuras reticulares del colágeno.
- Medición de la distribución del ADN genómico después de la irradiación UVB (estrés fotoinducido que se aproxima a las condiciones de baño de sol).

La medición del índice mitótico se realizó después de exponer las células a los principios activos durante un tiempo único. El índice se calculó a través del recuento por análisis de imagen de los núcleos celulares que incorporan un análogo de timidina convertido en fluorescente del número total de núcleos. Se analizaron varios campos. Las fotos se archivaron con fines iconográficos.

La remodelación de la matriz extracelular inducida por los fibroblastos expuestos a los principios activos se evaluó incorporando estas células en estructuras reticulares de colágeno y cuantificando su capacidad para retraer estas estructuras reticulares. La evaluación de la superficie retraída produjo un índice de remodelación. Las fotos se archivaron con fines iconográficos.

La medición de la distribución del ADN genómico se realizó después de irradiar las células con una dosis de UVB imitando las condiciones de una quemadura solar. En una primera fase, se anticipó evaluar el efecto de los principios activos durante la reparación del ADN seguida en una cinética de 3 fases. La cuantificación se realizó a través de la detección y el análisis por imagen de los dímeros de pirimidina ciclobuteno inducidos por irradiación UVB usando una técnica de inmunohistoquímica.

Las fotos se archivaron con fines iconográficos.

Ejemplo 9: Un tratamiento que combina una estatina y un aminobifosfonato aumenta la vida de un modelo de ratón que reproduce un síndrome humano de envejecimiento prematuro.

Este ejemplo se publica de forma análoga en Varela y col., Nature Medicine 2008, 7, 767 (55).

Material y métodos

Ratones:

Se describió la producción de los ratones *Zmpste24^{-/-}* y *Lmna^{-/-}* (Pendas y col., 2002 (38); Sullivan y col., 1999 (56)). La microtomografía computerizada de los huesos de los ratones se realizó usando el sistema micro-CT SkyScan 1172 (SkyScan - marca registrada). Todos los experimentos en ratones cumplían las normas aprobadas por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo (España). A los ratones se les administró cada día pravastatina (100 mg/kg/día) y zoledronato (100 mg/kg/día) diluidos en PBS. Los ratones que recibieron el tratamiento de pravastatina-zoledronato o los ratones de control que recibieron únicamente PBS no tuvieron ninguna lesión evidente o estrés.

Cultivo celular

Los fibroblastos dérmicos de un sujeto de control (GM00038) y de pacientes afectados de progeria y portadores de la mutación G608G (AG11498 y AG01972) se obtuvieron a partir del depósito de células Coriell. Las células HeLa procedían de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Las células se cultivaron en DMEM (Gibco) complementado con FBS al 10% (Gibco) y antibiótico al 1%-antimicótico (Gibco). Los fibroblastos procedían de colas de ratones de 12 días de edad (Varela y col., 2005). La concentración y la duración del tratamiento con la estatina y el aminobifosfonato se indican en la leyenda de las figuras. Durante el tratamiento combinado con estatina + aminobifosfonato en presencia de farnesol y/o geranilgeraniol, se añadieron 1 mM de pravastatina y 1 mM de zoledronato al medio de cultivo con concentraciones crecientes de farnesol y/o geranilgeraniol. El porcentaje de núcleos anormales se midió 48 horas después del inicio del tratamiento.

Inmunocitoquímica

Los fibroblastos se cultivaron en cámaras Lab Tek (Nalgen Nunc International), se lavaron en PBS y después se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 min. Las células se deshidrataron en baños de etanol de concentración

creciente y se permeabilizaron durante 5 min a 25 °C en PBS que contenía Triton X-100 (0,5 %), suero al 5 % (cabra o conejo). Los portaobjetos se preincubaron a 25 °C en PBS durante 5 min.

La dilución de anticuerpos primarios fue 1:100 para el anticuerpo policlonal de cabra anti-prelamina A Sc-6214, 5 Santa Cruz Biotechnologies), 1:40 para el anticuerpo anti-lámina A/C (4A7 suministrado por G. Morris), 1:200 para el anticuerpo de conejo anti-calreticulina (Stressgen) y 1:100 para el anticuerpo anti-lámina B1 (Abcam). Después del lavado en PBS, los portaobjetos se incubaron durante 1 hora a 25 °C con los anticuerpos secundarios diluidos en la solución de incubación. La dilución de los anticuerpos secundarios fue como se indica a continuación: 1:100 para IgG de burro anti-ratón acoplado a FITC (Jackson ImmunoResearch), 1:400 para la IgG de burro anti-cabra acoplada a Alexa 488 (Molecular Probes) y 1:100 para la IgG de burro anti-conejo acoplada a isotiocianato de tetrametilrodamina (Sigma). Después, las células se lavaron, los núcleos se colorearon durante 15 min a 25 °C con DAPI 9100 ng/ml, Sigma-Aldrich), y finalmente se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,5 %. Los portaobjetos se montaron en Vectashield (Vector). Se registraron imágenes digitales con un microscopio Leica DMR equipado con una cámara CoolSnap o con un microscopio confocal Leica TCS SP5. Los núcleos se observaron en 15 las células después del marcado de la lámina A/C. Se analizaron más de 100 núcleos en fibroblastos de control para cada uno de los tratamientos. El número de núcleos celulares de pacientes afectados por progeria que se analizó fue de 250 (pase 8), 198 (pase 13) y 150 (pase 20).

Irradiación de rayos X y estudio de la histona fosforilada H2AX

20 Las células de pacientes de progeria y las células de control 1BR3 se irradiaron con un equipo de rayos X Philips. El haz de rayos X se produjo por un ánodo de tungsteno sometido a una tensión de 200 kV a una intensidad de 20 mA, con un filtro de cobre que medía 0,1 mm de diámetro. La velocidad de la dosis fue de 1,243 Gy/min. La histona fosforilada H2AX se detectó con anticuerpos que reconocían específicamente la serina fosforilada 139 (Upstate Biotechnology-Euromedex, Mundolsheim, Francia), a la dilución de 1:800, y anticuerpos anti-ratón conjugados con FITC (1:100, Sigma-Aldrich). El número de roturas bicatenarias (DSB) en relación con el tiempo de reparación se ajustó usando la fórmula $N_t = N_0 (1/1 + \beta t)^\alpha$, donde α y β pueden ser parámetros ajustables y N_t y N_0 son el número de DSB en el momento t y el momento 0.

30 Transferencia de Western

Las células eran homogéneas en el siguiente medio: Tris 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, NaF 50 mM, ditiotreitól 1 mM, 2 mg/ml de pepstatina A, en presencia de inhibidores de proteasa (Complete inhibitor cocktail, Roche) e inhibidores de fosfatasa (Phosphatase Inhibitor Cocktails I and II, Sigma). Después de la electroforesis, 35 las proteínas se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa bloqueadas con polvo de leche desnatada al 5 %, usando el tampón TBS-T (Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,05 %), y se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo anti-lámina A/C específico (4A7, 1:500) o un anticuerpo anti-lámina A específico (C20, Santa Cruz Biotechnology, 1:250) o un anticuerpo de actina anti-beta (A5441, Sigma, 1:5000). Los anticuerpos se diluyeron en TBS-T que contenía polvo de leche desnatada al 3%. Después, las transferencias se incubaron con un anticuerpo 40 acoplado a peroxidasa (cabra anti-ratón o anti-conejo, Jackson ImmunoResearch) en TBS-T que contenía polvo de leche desnatada al 1,5 %, después se lavó, y finalmente se desarrolló a través de quimioluminiscencia (Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate, Millipore - marca registrada).

Análisis de espectrometría de masas

45 Los fibroblastos de ratón *Zmpste24^{-/-}* y de control, así como las células linfoblastoides de pacientes de progeria, se homogeneizaron, los núcleos se aislaron por ultracentrifugación y las proteínas nucleares obtenidas como se describe en Blobel y Potter, V.R. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield, Science 154, 1662-1665, 1966. Las proteínas de la lámina nuclear se separaron por electroforesis SDS-PAGE, y las bandas 50 que contenían la lámina A, la prelamina A y la progerina se extirparon. Los fragmentos de gel se lavaron dos veces con 180 ml de una mezcla de bicarbonato de amonio/acetónitrilo (70:30, 25 mM), se secaron (15 min, 90 °C) y se digirieron (1 hora, 60 °C) con tripsina (12 ng/ml, Promega) en bicarbonato de amonio 25 mM. En un experimento típico, se puso 1 ml de CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinnámico, Waters) en un espectrómetro MALDI-ToF. Una vez seco, se puso 1 ml de la solución peptídica y 1 ml de la matriz (CHCA) en el espectrómetro equipado con una fuente 55 láser (Voyager-DE STR (marca registrada), Applied Biosystems). Los datos recogidos de 200 disparos láser produjeron espectros que se analizaron por el programa Data Explorer (Versión 4.0.0.0, Applied Biosystems).

PCR cuantitativa en tiempo real

La tasa de expresión de genes diana p53 (*Atf3*, *Gadd45g* y *Cdkn1a*, que codifica p21) se midió usando el dispositivo del sistema de detección ABI PRISM 7900HT Sequence (Applied Biosystems).

Análisis estadístico

5

La diferencia entre los diversos grupos de ratones tratados o no tratados y células se analizó usando la prueba t. Los cálculos se hicieron con el programa Microsoft Excel. Los datos se expresaron como una media \pm error estándar de la media (SEM).

10 Resultados

Las células HeLa se cultivaron en presencia de inhibidores de la farnesiltransferasa (FTI-277, Sigma-Aldrich) y/o inhibidores de la geranilgeraniltransferasa de tipo I (GGTI-2147, Sigma-Aldrich) en las concentraciones indicadas. Únicamente la combinación de ambos inhibidores conduce a la acumulación de una cantidad significativa de prelamina A no prenilada en las células, en comparación con el efecto de cada uno de los inhibidores usados en solitario.

Estos resultados se muestran en la figura 6, que es una fotografía de una transferencia de Western obtenida, que muestra la detección de la lámina A/C en células HeLa tratadas con los inhibidores de la farnesiltransferasa y/o con inhibidores de la geranilgeraniltransferasa de tipo I. LA = lámina A, LC = lámina C, Pre = prelamina A.

Estos resultados confirman que el bloqueo de la prenilación de la prelamina A requiere tanto la inhibición de la farnesiltransferasa y de geranilgeraniltransferasa de tipo I de acuerdo con la presente invención.

25 El inhibidor de la farnesiltransferasa (FTI) induce la geranilgeranilación compensatoria de la progerina (en las células de pacientes afectados por la progeria) y en fibroblastos de ratones *Zmpste24^{-/-}*.

Como se espera, el análisis de espectrometría de masas muestra la presencia de péptidos trípticos de la prelamina A farnesilada y carboximetilada en células de ratones *Zmpste24^{-/-}*, pero no en las células de ratones de control.

Estos resultados se muestran en la figura 9a. El péptido farnesilado está desprovisto de los residuos 3 SIM, que muestra que *Zmpste24* no es indispensable a la primera escisión durante la maduración de la prelamina A. Se observó un descenso en la cantidad de prelamina A farnesilada en las células de ratones tratados con FTI. Durante la observación de la porción del espectro correspondiente a los péptidos geranilgeranilados, no se detectó ningún péptido obtenido de la prelamina A en las células de ratones *Zmpste24^{-/-}* no tratados. Sin embargo, un péptido cuya masa era compatible con un fragmento geranilgeranilado de prelamina A se detectó después del tratamiento con FTI. Estos resultados se muestran en la figura 9b.

En las células de pacientes de progeria, los péptidos correspondientes a la progerina farnesilada y carboximetilada se detectaron en ausencia de cualquier tratamiento, como se indica en la figura 7a. El tratamiento de estas células con FTI-127 causó la aparición de péptidos cuya masa corresponde a la de los péptidos geranilgeranilados de progerina, como se observa en la figura 7b.

Todos estos datos muestran que la progerina y la prelamina A se geranilgeranilaron como alternativa bajo los efectos de los FTI, y proporciona una explicación al bajo grado de eficacia de los tratamientos con FTI en modelos murinos del síndrome progeroide.

Las células de pacientes de progeria y de ratones *Zmpste24^{-/-}* se usaron para evaluar estrategias terapéuticas destinadas a prevenir la prenilación cruzada de la prelamina A y la progerina. Se tiene la hipótesis de que la farnesilación de las diversas variantes anormales de la lámina A pueden inhibirse mediante fármacos que actúan sobre la ruta de biosíntesis de farnesilpifosfato, un sustrato de la farnesiltransferasa y el precursor para el pifosfato de geranilgeranilo, un sustrato de la geranilgeraniltransferasa de tipo I. Por lo tanto, se ensayó el efecto de dos fármacos, una estatina y un aminobifosfonato, que se sabe que actúan sobre las células de pacientes de progeria en dos fases de esta ruta metabólica. El análisis de espectrometría de masas muestra que la combinación de pravastatina (estatina) y zoledronato (aminobifosfonato) provoca la aparición de un péptido que corresponde al extremo C-terminal no prenilado de progerina, un péptido que es indetectable en las células tratadas con FTI, mientras que no se detectaron los péptidos farnesilados ni los péptidos geranilgeranilados, como se observa en la figura 7c). El tratamiento de estatina + aminobifosfonato no inhibió, de hecho, la prenilación de la progerina. Se hizo la misma observación para la prelamina A, como se observa en la figura 8. El péptido C-terminal no prenilado de la misma se detectó en las células tratadas con la mezcla estatina + aminobifosfonato, mientras que estuvo ausente de

las células no tratadas, en las que se encontró el péptido farnesilado y carboximetilado. Finalmente, a diferencia de FTI, el tratamiento de pravastatina + zoledronato no revela la prelamina A geranilgeranilada.

Leyenda de la figura 9: Se analizaron la lámina A (células de control) y la prelamina A (células de ratones *Zmpste24*^{-/-}) mediante espectrometría de masas (MALDI-ToF). a, b: porciones del espectro correspondiente a los péptidos trípticos farnesilados (a) y geranilgeranilados (b). Cada uno de los picos se marca con la masa teórica (entre paréntesis) del péptido obtenido a partir de la digestión de tripsina de la lámina A o la prelamina A. El número de residuos se indica claramente en azul. La secuencia peptídica y la masa de los mismos se indican en rojo. Farn = farnesilo; CM = carboximetilado; Ger = geranilgeranilado.

Leyenda de la figura 7: Análisis de espectrometría de masas de proteínas extraídas de la envoltura nuclear de células no tratadas (a), células de pacientes de progeria tratados con FTI (2,5 mM, b) o tratados con la mezcla de pravastatina + zoledronato (1 μ M cada uno, c). La porción de los espectros correspondiente a las proteínas no modificadas, farnesiladas y geranilgeraniladas se muestra en la parte superior, centro e inferior de la figura. Cada pico corresponde al péptido de progerina tríptico y se marca con la masa monoisotópica medida en el experimento y con la masa teórica (entre paréntesis). El número de residuos de aminoácidos se indica en azul. La secuencia peptídica y la masa de los mismos se indican en rojo.

La progerina está predominantemente farnesilada (F) y carboximetilada (Cm) en las células no tratadas (a, panel central), mientras que, bajo los efectos de los FTI, este pico es muy bajo y la progerina parece estar geranilgeranilada y fosforilada (b, panel inferior). Después del tratamiento de pravastatina-zoledronato, la progerina no modificada es la forma predominante.

Leyenda de la figura 8: Análisis de espectrometría de masas de proteínas extraídas de la envoltura nuclear de fibroblastos no tratados (a), o los tratados con la mezcla de pravastatina+zoledronato (1 μ M cada vez, b) obtenidos de ratones *Zmpste24*^{-/-}. La porción de los espectros correspondientes a las proteínas no modificadas, farnesiladas y geranilgeraniladas se muestra en la parte superior, centro e inferior de la figura. Cada pico corresponde a la proteína de progerina tríptica y se marca con la masa monoisotópica medida en el experimento y con la masa teórica (entre paréntesis). El número de los residuos aminoácidos se indica en azul. La secuencia peptídica y la masa de la misma se indican en rojo.

En esta figura, se aprecia que la prelamina A está predominantemente farnesilada (F) y carboximetilada (Cm) en las células no tratadas (a, panel central), mientras que las formas no modificadas o geranilgeraniladas no se detectan. Después del tratamiento con pravastatina + zoledronato, las proteínas preniladas ya no pueden detectarse y la forma no modificada de la prelamina A es predominante (b, panel superior).

El tratamiento con pravastatina + zoledronato corrige las anomalías nucleares de las células de pacientes de progeria y ratones *Zmpste24*^{-/-} en cultivo, y restaura parcialmente los mecanismos para reparar las lesiones de ADN inducidas por irradiación de rayos X (figuras 10, 11, 12 y 13).

El tratamiento con pravastatina + zoledronato causa la aparición de la prelamina A en el núcleo de las células de control (figura 10a), como en el núcleo de las células de pacientes de progeria, pero con una mejora marcada en la morfología nuclear de las últimas (figura 10b). El análisis cuantitativo muestra un aumento de las anomalías nucleares en las células de pacientes de progeria con el número de pases, un número de anomalías que disminuye bajo los efectos del tratamiento con pravastatina + zoledronato (figura 10c). Observadas bajo un microscopio confocal, las células de pacientes de progeria contenían agregados de la lámina A/C, invaginaciones profundas de la cara nucleoplásmica de la envoltura nuclear en el nucleoplasma (retículo nuclear) marcadas por los anticuerpos anti-calreticulina (figura 11a-f). Estos agregados de la lámina A/C estaban ausentes de las células de los sujetos de control (figuras 10j-l) y desaparecieron de las células de los pacientes de progeria bajo los efectos del tratamiento con pravastatina + zoledronato (figura 10g-i). La ubicación de la lámina B1, un constituyente farnesilado de la lámina nuclear, se modificó bajo los efectos del tratamiento, lo que confirma que el tratamiento bloquea la prenilación de las láminas.

Se ha verificado que la mejora en la forma de los núcleos como resultado del tratamiento con pravastatina + zoledronato está de hecho vinculada con el bloqueo de la prenilación de progerina, incubando las células con farnesol y/o geranilgeraniol. La suplementación de las células con farnesol y geranilgeraniol permite a las células sintetizar farnesilpírofosfato y geranilgeranil pírofosfato y, por lo tanto, prenilar la progerina incluso en presencia de pravastatina + zoledronato (figura 10d). El farnesol abole el efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato, que es otra prueba de que el efecto del tratamiento pasa por la inhibición de la síntesis de farnesilpírofosfato. Cabe

apreciar que el geranilgeraniol también bloquea el efecto del tratamiento, lo que demuestra que la forma geranilgeranilada de progerina también es tóxica para las células (figura 10d). Se observaron los mismos efectos se observaron en las células *Zmpste24^{-/-}* (figura 12a), lo que sugiere que los datos relacionados con la progerina pueden extenderse a la prelamina A, la proteína acumulada en las células *Zmpste24^{-/-}*. Ni el farnesol ni el geranilgeraniol produce ningún efecto sobre los fibroblastos de control, eliminando así la posibilidad de un artefacto inducido por estas moléculas (figura 12b).

Finalmente, el tratamiento con pravastatina + zoledronato provoca una reducción en el número de foci de la histona fosforilada H2AX, foci que están relacionados directamente con el número de roturas bicatenarias no reparadas del ADN (figura 13).

En conclusión, los datos adquiridos *in vitro* muestran que la combinación pravastatina + zoledronato inhibe parcialmente la farnesilación y la geranilgeranilación, causa modificaciones relacionadas con la ubicación esperada de la lámina y la redistribución, dentro del nucleoplasma, de la prelamina no prenilada A y la progerina en células *Zmpste24^{-/-}* y de de pacientes de progeria. Además, la reducción de la cantidad de progerina farnesilada en la lámina y la reubicación de la misma en el nucleoplasma explica los efectos beneficiosos del tratamiento sobre las células de pacientes de progeria.

Leyenda de la figura 10: Efecto sinérgico de la combinación de pravastatina + zoledronato sobre la acumulación de prelamina A en las células de control y de pacientes de progeria.

(a) Detección inmunocitoquímica de la lámina A/C y la prelamina A en fibroblastos humanos normales, que están sin tratar, tratados con pravastatina (60 μ M, 12 horas), con zoledronato (60 μ M, 6 horas), en solitario o en combinación. (b) Detección inmunocitoquímica de la lámina A/C y de la prelamina A en fibroblastos normales humanos y de pacientes de progeria tratados durante 24 horas con la combinación de pravastatina + zoledronato (1 μ M cada vez). (c) Análisis cuantitativo del efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato (1 μ M cada vez) sobre la morfología nuclear de las células de pacientes de progeria. Las células tratadas o no tratadas se inmunomarcaron con un anticuerpo anti-lámina A/C en los pasos 8 (p8), 13 (p13) y 20 (p20). Las flechas de color blanco muestran los núcleos anormales. (d) Análisis cuantitativo del efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato (1 μ M cada vez) en la morfología nuclear de los pacientes de progeria en presencia de farnesol, geranilgeraniol o ambos compuestos. Barras de error = media \pm error estándar de la media. Barra de escala = 10 μ m.

Leyenda de la figura 11: El tratamiento con pravastatina + zoledronato corrige la morfología nuclear e induce la reubicación parcial de las isoformas de la lámina A/C y la lámina B1 de la lámina nuclear en el nucleoplasma, en células de pacientes de progeria.

(A) Colonización de la lámina A/C y de la calreticulina en estas células de progeria tratadas y no tratadas. Inmunofluorescencia y microscopía confocal (Leica TCS SP5, pila tridimensional de imágenes de 2048 x 2048 píxeles, aumento de tamaño de 0,2 μ m, promedio de 3 líneas, acumulación de 3 imágenes, zoom x 1,7). Las imágenes a a c de cada panel son proyecciones de la intensidad media de 27 imágenes de la pila y muestran los túbulos del retículo nuclear marcado por la calreticulina en las células de progeria incubadas con PBS. Imágenes d a l: Secciones confocales aisladas de 0,2 μ m de espesor. El tratamiento de pravastatina + zoledronato corrige la forma de las células de progeria, reduce el número de túbulos del retículo nuclear (g) y el grosor de la lámina nuclear (h). (B) Colocalización de la lámina B1 y la calreticulina. El tratamiento con pravastatina + zoledronato aumenta la señal de marcado nucleoplásmico por la lámina B1, lo que indica que la farnesilación de esta proteína se inhibe parcialmente. Barra de escala = 5 μ m.

Leyenda de la figura 12: Los precursores de farnesilpirofosfato y pirofosfato de geranilgeraniol abolen el efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato en las células de ratones *Zmpste24^{-/-}* en cultivo.

Cuantificación del efecto de la pravastatina (1 μ M) y zoledronato (1 μ M) combinados o sin combinar en la morfología nuclear de células de ratones *Zmpste24^{-/-}* (a) y de ratones de control (b) en cultivo, en presencia de farnesol, geranilgeraniol o ambas moléculas.

Farnesol y geranilgeraniol, en solitario o en combinación, abolen el efecto del tratamiento de pravastatina + zoledronato en la morfología nuclear de las células *Zmpste24^{-/-}*.

Leyenda de la figura 13: El tratamiento con pravastatina + zoledronato corrige parcialmente las anomalías de reparación de las roturas bicatenarias del ADN en células de pacientes de progeria.

- 5 Se incubaron fibroblastos de control y de pacientes de progeria con la mezcla de pravastatina + zoledronato (1 μ M cada vez) o con PBS, y se irradiaron con rayos X (2 Gy). Inmunodetección de la histona fosforilada H2AX detectada 24 horas después de la irradiación, foci correspondientes a las roturas bicatenarias no reparadas (imágenes superiores). Marcado nuclear de DAPI (imágenes inferiores).
- 10 Curvas en la parte inferior: Evolución en el número de foci de histona fosforilada H2AX con respecto al tiempo, después de la irradiación en las células de control (cuadrado negro) y las células de progeria (círculo blanco), incubadas con PBS o tratadas con pravastatina + zoledronato. Cada curva representa la media \pm error estándar de la media de al menos 3 experimentos.
- 15 **El tratamiento que combina pravastatina + zoledronato mejora el fenotipo progeroide de ratones *Zmpste24*^{-/-} (figuras 14, 15 y 16):**

Los ratones *Zmpste24*^{-/-} y los ratones de control se trataron diariamente con pravastatina, zoledronato o la combinación de ambos fármacos, a una dosis que se había mostrado previamente como no tóxica para los ratones.

- 20 Como ya se ha observado para las células de pacientes de progeria, cada uno de los fármacos por separado, pravastatina o zoledronato, no mejora la esperanza de vida de los ratones *Zmpste24*^{-/-} (figura 15). Por otro lado, la combinación de los dos fármacos mejora significativamente el fenotipo progeroide de los ratones *Zmpste24*^{-/-}: el tratamiento mejora la ganancia de peso, aumenta la cantidad de grasa subcutánea, reduce el grado de cifosis y alopecia y aumenta la esperanza de vida. El valor de supervivencia medio pasa de 101 a 179 días y el valor máximo
- 25 pasa de 151 a 222 días ($P < 0,001$, figura 14c). Cabe apreciarse que todos los signos fenotípicos corregidos por el tratamiento en ratones también son característicos de la progeria en el hombre. El tratamiento combinado corrige el descenso de la densidad ósea, que es una de las características de los ratones *Zmpste24*^{-/-} y de los pacientes afectados por progeria o un síndrome progeroide relacionado. La microtomografía computerizada de los huesos muestra un aumento en la mineralización ósea y en el espesor del córtex tibial en los ratones tratados (figura 14d).
- 30 Además, la cuantificación de las anomalías morfológicas nucleares en el hígado de ratones tratados *Zmpste24*^{+/+}, *Zmpste24*^{-/-} y ratones tratados *Zmpste24*^{-/-} muestra que el tratamiento con pravastatina + zoledronato normaliza la forma de los núcleos de las células *Zmpste24*^{-/-} (figura 14e). El tratamiento corrige adicionalmente la transcripción aumentada de los genes diana de la proteína p53, un aumento que se ha descrito en las células de ratón *Zmpste24*^{-/-} (Varela y col., 2005) (figura 14f). Finalmente, se busca descubrir si el tratamiento puede haber tenido un efecto sobre
- 35 ratones *Lmna*^{-/-} que son incapaces de acumular la prelamina A. El tratamiento con pravastatina + zoledronato no tuvo ningún efecto sobre la esperanza de vida de estos ratones (figura 16), lo que es una prueba adicional de que este tratamiento únicamente puede tener un efecto en los ratones que acumulan prelamina A en la envoltura nuclear.
- 40 Leyenda de la figura 14: El tratamiento con pravastatina + zoledronato mejora el fenotipo progeroide de los ratones *Zmpste24*^{-/-}:

(a) Fotografías representativas de ratones de 3 meses *Zmpste24*^{+/+}, *Zmpste24*^{-/-} y *Zmpste24*^{-/-} tratados con la combinación de pravastatina (100 mg/kg/día) y zoledronato (100 mg/kg/día). Barra de escala = 1 cm. (b) Peso de

- 45 ratones de 3 meses *Zmpste24*^{+/+} (n = 12), ratones *Zmpste24*^{-/-} (n = 13) y ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados (n = 15). (c) Curvas Kaplan-Meier que muestran un aumento significativo en la esperanza de vida de los ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados (n = 15) en comparación con la de los ratones no tratados (n = 13). (d) Representación tridimensional microtomográfica computerizada de la tibia de ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados y no tratados (imagen superior). El panel inferior representa el volumen óseo relativo (volumen del tejido óseo/volumen de la tibia) y el número de trabéculas
- 50 óseas en los ratones *Zmpste24*^{-/-} no tratados (n = 6) y tratados (n = 5). (e) Cuantificación de las anomalías nucleares de los hepatocitos de ratones *Zmpste24*^{+/+}, *Zmpste24*^{-/-} y ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados. Las flechas de color blanco muestran los núcleos anormales. Barra de escala = 10 μ m. (f) Expresión relativa de los genes diana de p53 en el hígado y el corazón de ratones *Zmpste24*^{+/+}, *Zmpste24*^{-/-} y ratones *Zmpste24*^{-/-} tratados, como se analizó por RT-PCR cuantitativa. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Las barras de error representan la media \pm error estándar de
- 55 la media.

Leyenda de la figura 15: Ni la pravastatina en solitario ni el zoledronato en solitario aumentan la esperanza de vida de los ratones *Zmpste24*^{-/-}:

Las curvas de Kaplan-Meier muestran que la pravastatina en solitario (n = 5) (a), y el zoledronato en solitario (n = 5) (b) no corrigen la esperanza de vida de los ratones tratados *Zmpste24^{+/+}*, *Zmpste24^{-/-}* y los ratones *Zmpste24^{-/-}* tratados (rombo blanco) y no tratados (círculos negros, n = 11).

5 Leyenda de la figura 16: El tratamiento con pravastatina + zoledronato no corrige la esperanza de vida de los ratones *Lmna^{-/-}*.

Las curvas Kaplan-Meier muestran la esperanza de vida de los ratones *Lmna^{-/-}* tratados con pravastatina + zoledronato (n = 12, rombo blanco), en comparación con la de los ratones no tratados (círculos negros, n = 11). El
10 tratamiento con pravastatina + zoledronato no tubo ningún efecto sobre los ratones sin lámina A/C.

Resumen/conclusión/perspectivas

Varios síndromes progeroides humanos, incluyendo progeria de Hutchinson-Gilford, están causados por la
15 acumulación en la envoltura nuclear de una forma farnesilada eliminada (progerina) o no eliminada de prelamina A. La progerina también se produce durante el transcurso del envejecimiento fisiológico. Estudios previos realizados con células de pacientes afectados por progeria mostraron que los inhibidores de la farnesiltransferasa (FTI) mejoran la morfología de los núcleos, lo que sugiere que estos inhibidores podrían constituir un tratamiento para estos síndromes devastadores.

20 Los inventores han mostrado aquí que la prelamina A y la progerina experimentan una prenilación alternativa a través de la geranilgeraniltransferasa, cuando la farnesiltransferasa se inhibe, lo que podría explicar el bajo grado de eficacia de los FTI en la mejora del fenotipo de modelos murinos de estos síndromes progeroides.

25 También muestran que la combinación de una estatina y un aminobifosfonato inhibe eficazmente tanto la farnesilación como la geranilgeranilación de la prelamina A y la progerina, y mejora significativamente el fenotipo de envejecimiento de ratones en los que el gen que codifica la metaloproteasa *Zmpste24* se inactivó, que está implicado en la maduración de la prelamina A. La mejora del fenotipo incluye la de la curva de crecimiento y peso, la lipodistrofia, la pérdida del pelo y las anomalías óseas.

30 Además, la esperanza de vida de estos ratones se aumenta sustancialmente.

Estos datos abren un nuevo enfoque terapéutico a los síndromes progeroides humanos que implican una
35 acumulación de proteínas preniladas en la envoltura nuclear.

El tratamiento de pravastatina + aminobifosfonato está en proceso de usarse en Marsella durante los siguientes 3 años en niños afectados por progeria, dentro del marco de un ensayo terapéutico Europeo (15 niños) que estará bajo la responsabilidad del Prof. Nicolas Lévy, y financiado por el Ministerio de Salud (PHRC 2008) y la French Muscular Dystrophy Association (AFM), y que ha recibido autorización del AFSSAPS y el CCP Sud-Méditerranée.

40 El mismo tratamiento se proporcionará pronto en Roma, bajo la responsabilidad del Prof. Giuseppe Novelli, para pacientes afectados por displasia acromandibular, otro síndrome progeroide que implica una acumulación de prelamina A farnesilada.

45 **Lista de referencias**

- (1) Basso AD, Kirschmeier P, Bishop WR. *Farnesyl transferase inhibitors*. J Lipid Res 47:15-31, 2006.
- (2) Biamonti G, Giacca M, Perini G, Contreas G, Zentilin L, Weighardt F, Guerra M, Della Valle G, Saccone S, Riva S et al. *The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase*. Mol Cell Biol 12:3499-3506, 1992.
- (3) Bishop WR, Kirschmeier P, Baun C. *Farnesyl transferase inhibitors: mechanism of action, translational studies and clinical evaluation*. Cancer Biol Ther 2:S96-104, 2003.
- (4) Broers JL, Hutchinson CJ, Ramaekers FC. *Laminopathies*. J Pathol 204:478-488, 2004.
- (5) Broers JLV, Ramaekers FCS, Bonne G, Ben Yaou R, Hutchinson CJ. *Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature aging*. Physiol Rev 86:967-1008, 2006.
- (6) Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, Collins FS. *Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Proc Natl Acad Sci USA 102:12879-12884, 2005.
- (7) De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, Levy N. *Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria*. Science 300:2055, 2003.
- (8) Demyanets S, Kaun C, Pfaffenberger S, Philipp J, Hohensinner PJ, Rega G, Pammer J, Maurer G, Huber K, Wojta J. *Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors induce apoptosis in human cardiac myocytes in vitro*. Biochem Pharmacol 71:1324-1330, 2006.

- (9) Duque G, Rivas D. *Age-related changes in Lamin A/C expression in the osteoarticular system: laminopathies as a potential new aging mechanism.* Mech Aging Dev 127:378-383, 2006.
- (10) Efuet ET, Keyomarsi K. *Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome.* Cancer Res 66:1040-1051, 2006.
- (11) Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. *Recurrent de novo point mutation in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome.* Nature 423:293-298, 2003.
- (12) Evans M, Rees A. *The myotoxicity of statins.* Cur Op Lipid, 13:415-420, 2002.
- (13) Flint OP, Masters BA, Gregg RE, Durham SK. *HMG CoA reductase inhibitor-induced myotoxicity: pravastatin and lovastatin inhibit the geranylgeranylation of low-molecular-weight proteins in neonatal rat muscle cell culture.* Tox Appl Pharmacol 145:99-110, 1997.
- (14) Fong LG, Frost D, Meta M, Qiao X, Yang SH, Coffinier C, Young SG. *A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria.* Science,311 : 1621-1623, 2006.
- (15) Fong LG, Ng JK, Lammerding J, Vickers TA, Meta M, Coté N, Gavino B, Qiao X, Chang SY, Young SR, Yang SH, Stewart CL, Lee RT, Bennett CF, Bergo MO, Young SG. *Prelamin A and Lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina.* J Clin Invest 116:743-752, 2006.
- (16) Fong LG, Ng JK, Meta M, Cote N, Yang SH, Stewart CL, Sullivan T, Burghardt A, Majumdar S, Reue K, Bergo MO, Young SG. *Heterozygosity for Lmna deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in Zmpste24-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci USA 101:18111-18116, 2004.
- (17) Glynn MW, Glover TW. *Incomplete processing of mutant lamin A in Hutchinson-Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition.* Hum Mol Genet 14:2959-2969, 2005.

- (18) Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS. *Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome.* Proc Natl Acad Sci USA 101:8963-8968, 2004.
- (19) Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL. *The nuclear lamina comes of age.* Nat Mol Cell Biol 6:21-31, 2005.
- (20) Hampton R, Dimster-Denk D, Rine J. *The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation.* Trends Biochem Sci 21:140-145, 1996.
- (21) Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. *Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs.* J Cell Sci 114:4557-4565, 2001.
- (22) Hegele RA, Cao H, Liu DM, Costain GA, Charlton-Menys V, Rodger NW, Durrington PN. *Sequencing of reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy.* Am J Hum Genet 79:383-389, 2006.
- (23) Hildebrand T, Ruesegger P. *A new method for the model independent assessment of thickness in three dimensional images.* J Microsc 185:67-75, 1997.
- (24) Hoffmann GF, Charpentier C, Mayatepek E, Mancini J, Leichsenring M, Gibson KM, Divry P, Hrebicek M, Lehnert W, Sartor K. *Clinical and biochemical phenotype in 11 patients with mevalonic aciduria.* Pediatrics 91:915-921, 1993.
- (25) Huang S, Chen L, Libina N, Janes J, Martin GM, Campisi J, Oshima J. *Correction of cellular phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria cells by RNA interference.* Hum Genet. 2005 Oct 6;:1-7
- (26) Hutchinson CJ, Worman HJ. *A-type lamins: guardians of the soma?* Nat Cell Biol 6:1062-1067, 2004.
- (27) Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Murata T, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. *The effects of*

- HMG-CoA reductase inhibitor on vascular progenitor cells.* J Pharmacol Sci 1001:344-349, 2006.
- (28) Leung KF, Baron R, Seabra MC. *Geranylgeranylation of Rab GTPases.* J Lipid Res 47:467-475, 2006.
- (29) Lévy N, Cau P. *Anomalies du noyau et maladies.* Pour la Science 313 :2-7, 2003.
- (30) Lin F, Worman HJ. *Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1.* Genomics 27:230-236, 1995.
- (31) Lin F, Worman HJ. *Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C.* J Biol Chem 268:16321-16326, 1993.
- (32) Liu Y, Wang Y, Rusinol AE, Sinensky MS, Liu J, Shell SM, Zou Y. *Involvement of xeroderma pigmentosum group A (XPA) in progeria arising from defective maturation of prelamin A.* FASEB J. 2007 Sep 11;
- (33) Mattout A, Dechat T, Adam SA, Goldman RD, Gruenbaum Y. *Nuclear lamins, diseases and aging.* Cur Op Cell Biol 18:335-341, 2006.
- (34) McClintock D, Ratner D, Lokuge M, Owens DM, Gordon LB, Collins FS, Djabali K. *The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin.* PloS One, 2007, 2, e1269
- (35) Navarro CL, Cadinanos J, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Courrier S, Boccaccio I, Boyer A, Kleijer WJ, Wagner A, Giuliano F, Beemer FA, Freije JM, Cau P, Hennekam RC, Lopez-Otin C, Badens C, Levy N. *Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors.* Hum Mol Genet 14:1503-1513, 2005.
- (36) Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Genevieve D, Hadj-Rabia S, Gaudy-Marqueste C, Smitt HS, Vabres P, Faivre L, Verloes A, Van Essen T, Flori E, Hennekam R, Beemer FA, Laurent N, Le Merrer M, Cau P, Levy N. *Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization*

and identify restrictive dermatopathy as a lethal neonatal laminopathy. Hum Mol Genet 13:2493-2503, 2004.

- (37) Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koeppen A, Hogan K, Ptacek LJ, Fu YH. *Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy.* Nature Genet 38:1114-1123, 2006.
- (38) Pendas AM, Zhou Z, Cadinanos J, Freije JM, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodriguez F, Tryggvason K, Lopez-Otin C. *Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice.* Nat Genet 31:94-99, 2002.
- (39) Reid TS, Terry KL, Casey PJ, Beese LS. *Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity.* J Mol Biol 343:417-433, 2004.
- (40) Scaffidi P, Misteli T. *Lamin A-dependent nuclear defects in human aging.* Scienceexpress, 27 avril 2006.
- (41) Scaffidi P, Misteli T. *Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome.* Nat Med 11:440-445, 2005.
- (42) Scaffidi P, Misteli T. *Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome.* Nature Med 11:440-445, 2005.
- (43) Shelton KR, Egle PM, Cochran DL. *Nuclear envelope proteins: identification of lamin B subtypes.* Biochem Biophys Res Comm 103:975-981, 1981.
- (44) Shumaker DK, Kuczmarski ER, Goldman RD. *The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions.* Curr Op Cell Biol 15:358-366, 2003.
- (45) Stewart C, Burke B. *Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B.* Cell 51:383-392, 1987.

- (46) Takedaa M, Noshiroa R, Onozatob ML, Tojob A, Hasannejada H, Huangc XL, Narikawac S, Endoua H. Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharm* 483 :133– 138, 2004.
- (47) Toth JI, Yang SH, Qiao X, Beigneux AP, Gelb MH, Moulson CL, Miner JH, Young SG, Fong LG. *Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:12873-12878, 2005.
- (48) Tsai MY, Wang S, Heidinger JM, Shumaker DK, Adam SA, Goldman RD, Zheng Y. *A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly*. *Science* 311:1887-1893, 2006.
- (49) Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, Zhou Z, Rodriguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, Lopez-Otin C. *Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation*. *Nature* 437:564-568, 2005.
- (50) Vergnes L, Peterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K. *Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10428-10433, 2004.
- (51) Winter-Vann AM, Casey PJ. *Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis*. *Nat Rev Cancer* 5:405-412, 2005.
- (52) Wydner KL, McNeil JA, Lin F, Worman HJ, Lawrence JB. *Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1 and LBR by fluorescence in situ hybridization*. *Genomics* 32:474-478, 1996.
- (53) Young SG, Meta M, Yang SH, Fong LG. *Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes*. *J Biol Chem* 281:39741-39745, 2006.
- (54) Zastrow MS, Vlcek S, Wilson KL. *Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues*. *J Cell Sci* 117:979-987, 2004.
- (55) Varela, I. Pereira, S. Ugalde, A. P. Navarro, C. L. Suarez, M. F. Cau, P. Cadinanos, J. Osorio, F. G. Foray, N. Cobo, J. de Carlos, F. Levy, N. Freije, J. M. Lopez-Otin, C. *Combined treatment with*

statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. Nature Medicine 14: 767-772, 2008

- (56) Sullivan, T. Escalante-Alcalde, D. Bhatt, H. Anver, M. Bhat, N. Nagashima, K. Stewart, C. L. Burke, B. *Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. J. Cell Biol. 147: 913-920, 1999*

REIVINDICACIONES

1. Composición tópica dermatológica que comprende:
- 5 - al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, y
 - al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa,
- para su uso en el tratamiento de trastornos cutáneos y/o del cabello seleccionados entre el grupo que comprende el envejecimiento cutáneo prematuro patológico y/o el envejecimiento mio-lipo-cutáneo prematuro patológico.
- 10 2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una molécula de la familia de las estatinas o una de las sales fisiológicamente aceptables de la misma.
3. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es
 15 una estatina soluble en agua.
4. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una estatina liposoluble.
- 20 5. Composición de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 4, en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa se selecciona entre el grupo que comprende atorvastatina, simvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina (o compactina), fluindostatina, velostatina, fluvastatina, dalvastatina, cerivastatina, pentostatina, rosuvastatina, lovastatina, pitavastatina, o una de las sales fisiológicamente aceptables de los mismas.
- 25 6. Composición de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 5, en la que el inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa se selecciona entre el grupo que comprende una molécula de la familia de los aminobifosfonatos (NBP) o una de las sales fisiológicamente aceptables del mismo.
7. Composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el aminobifosfonato puede seleccionarse
 30 entre:
- ácido alendrónico o la forma iónica del mismo, alendronato;
 - ácido clodrónico o la forma iónica del mismo, clodronato;
 - ácido etidrónico o la forma iónica del mismo, etidronato;

35 - ácido ibandrónico o la forma iónica del mismo, ibandronato;

 - ácido medrónico o la forma iónica del mismo, medronato;
 - ácido neridrónico o la forma iónica del mismo, neridronato;
 - ácido olpadrónico o la forma iónica del mismo, olpadronato;
 - ácido pamidrónico o la forma iónica del mismo, pamidronato;

40 - ácido risedrónico o la forma iónica del mismo, risedronato;

 - ácido tiludrónico o la forma iónica del mismo, tiludronato;
 - ácido zoledrónico o la forma iónica del mismo, zoledronato;
 - ácido 4-N,N-dimetilaminometano difosfónico o la forma iónica del mismo, dimetilaminometanodifosfonato;
 - α -amino-(4-hidroxi-bencilideno)difosfonato.
- 45 8. Composición de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 7, en la que el inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa es ácido zoledrónico o la forma iónica del mismo, zoledronato.
9. Composición de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 8, en la que la cantidad de
 50 inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa es del 0,001 al 0,050 por ciento en peso de la composición cosmética y/o dermatológica.
10. Composición de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 9, en la que la cantidad de
 inhibidor de la HMG-CoA reductasa es del 0,010 al 0,100 por ciento en peso de la composición dermatológica.
- 55 11. Composición de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 10, en la que la suma de la cantidad del inhibidor de la HMG-CoA reductasa y la cantidad del inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa es del 0,011 al 0,150 por ciento en peso de la composición dermatológica.

12. Uso cosmético no terapéutico de una composición cosmética que comprende:
- al menos un inhibidor de hidroximetilglutarilo-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, y
 - al menos un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa,
- 5 para el tratamiento de trastornos cutáneos y/o del cabello seleccionados entre el grupo que comprende envejecimiento cutáneo y/o lipodistrofia.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una molécula de la familia de las estatinas o una de las sales fisiológicamente aceptables del mismo.
- 10 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una estatina soluble en agua.
- 15 15. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una estatina liposoluble.
16. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa se selecciona entre el grupo que comprende atorvastatina, simvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina (o compactina), fluindostatina, velostatina, fluvastatina, dalvastatina, cerivastatina, pentostatina, rosuvastatina, lovastatina, pitavastatina, o una de las sales fisiológicamente aceptables de las mismas.
- 20 17. Uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 12 a 16, en el que el inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa se selecciona entre el grupo que comprende una molécula de la familia de los aminobifosfonatos (NBP) o una de las sales fisiológicamente aceptables del mismo.
- 25 18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el aminobifosfonato puede seleccionarse entre:
- ácido alendrónico o la forma iónica del mismo, alendronato;
 - 30 - ácido clodrónico o la forma iónica del mismo, clodronato;
 - ácido etidrónico o la forma iónica del mismo, etidronato;
 - ácido ibandrónico o la forma iónica del mismo, ibandronato;
 - ácido medrónico o la forma iónica del mismo, medronato;
 - 35 - ácido neridrónico o la forma iónica del mismo, neridronato;
 - ácido olpadrónico o la forma iónica del mismo, olpadronato;
 - ácido pamidrónico o la forma iónica del mismo, pamidronato;
 - ácido risedrónico o la forma iónica del mismo, risedronato;
 - ácido tiludrónico o la forma iónica del mismo, tiludronato;
 - 40 - ácido zoledrónico o la forma iónica del mismo, zoledronato;
 - ácido 4-N,N-dimetilaminometano difosfónico o la forma iónica del mismo, dimetilaminometanodifosfonato;
 - α -amino-(4-hidroxibencilideno) difosfonato.
19. Uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 12 a 17, en el que el inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa es ácido zoledrónico o la forma iónica del mismo, zoledronato.
- 45 20. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en el que la cantidad de inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa es del 0,001 al 0,050 por ciento en peso de la composición dermatológica.
21. Uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 12 a 20, en el que la cantidad de inhibidor de la HMG-CoA reductasa es del 0,010 al 0,100 por ciento en peso de la composición dermatológica.
- 50 22. Uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 12 a 21, en el que la suma de la cantidad de inhibidor de la HMG-CoA reductasa y la cantidad de inhibidor de la farnesilpirofosfato sintasa es del 0,011 al 0,150 por ciento en peso de la composición dermatológica.
- 55 23. Uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 12 a 21, en el que la composición cosmética comprende al menos uno de los compuestos seleccionados entre el grupo que comprende un tensioactivo, agente espesante, agente gelificante, conservante, humectante, emulsionante, perfume, silicona, agente quelante, antioxidante, tinte cosmético, fungicida, agente antibacteriano, agente formador de película, estabilizante, agente

tamponante, filtro UV, aglutinante y estabilizante de emulsión.

24. Uso como se ha indicado en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 23, en el que la composición cosmética está en forma de una crema, aerosol, gel, pomada, polvo, espuma, leche, complemento alimenticio o
5 producto administrable por vía oral.

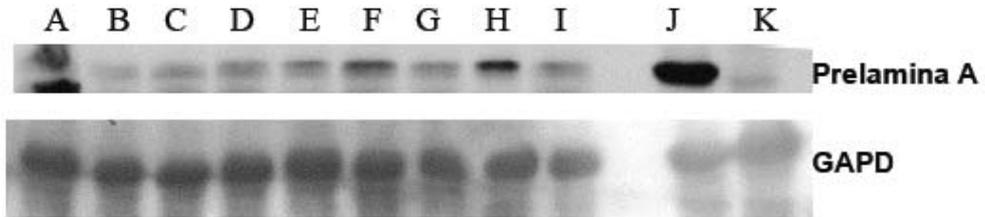


Figura 1

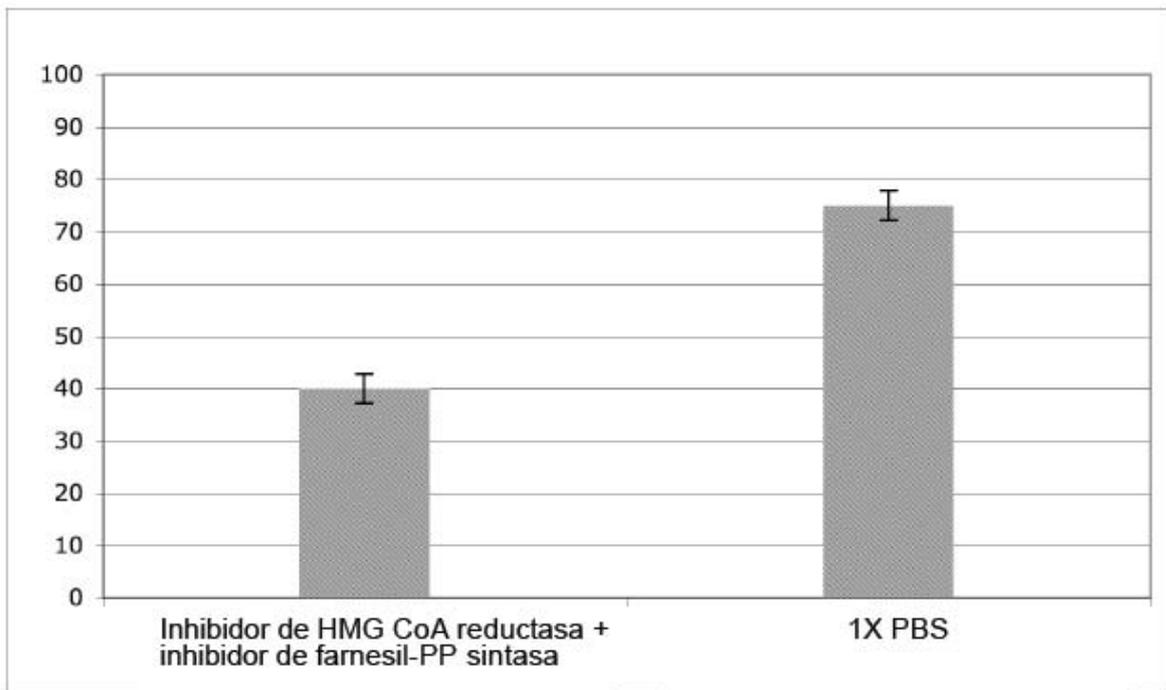


Figura 2

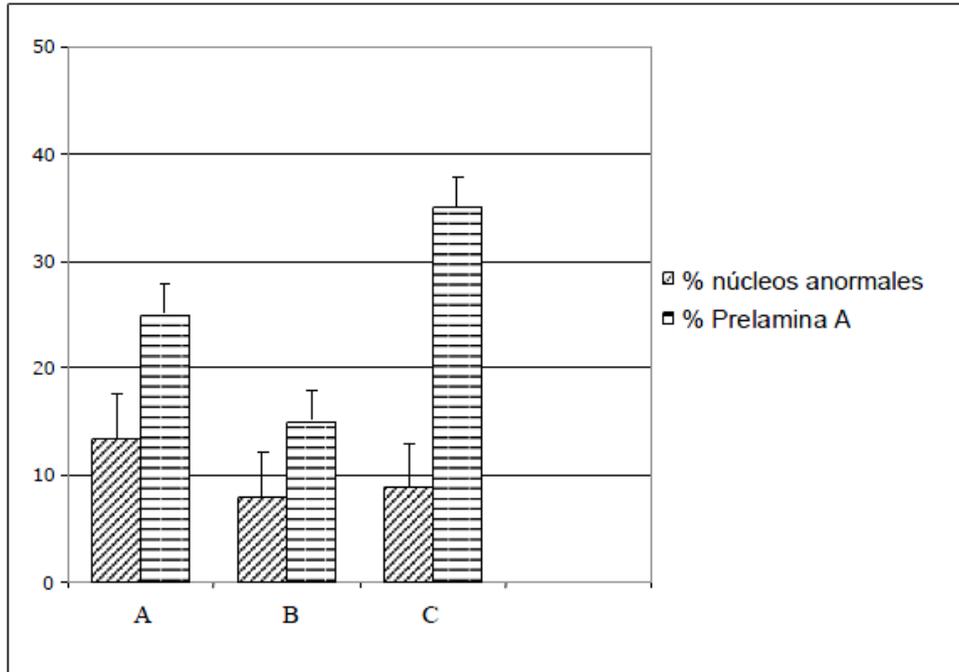


Figura 3

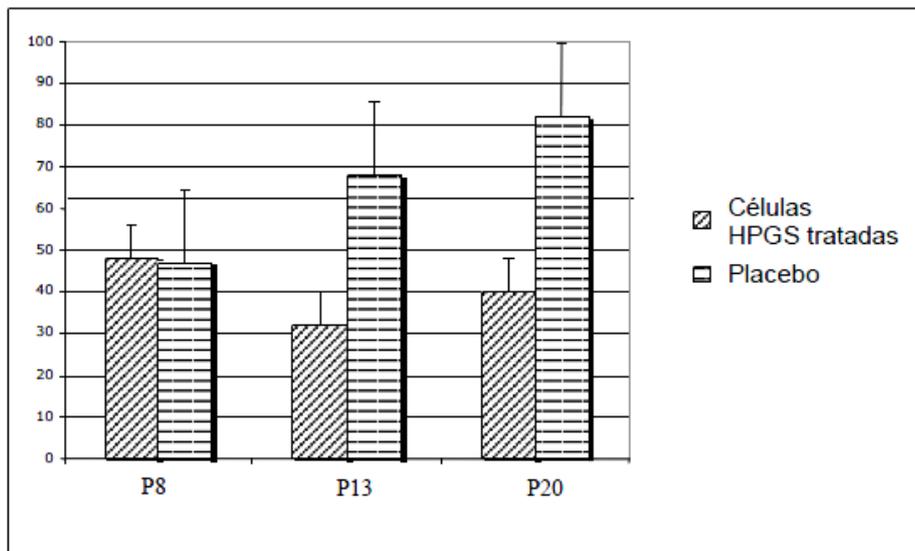


Figura 4

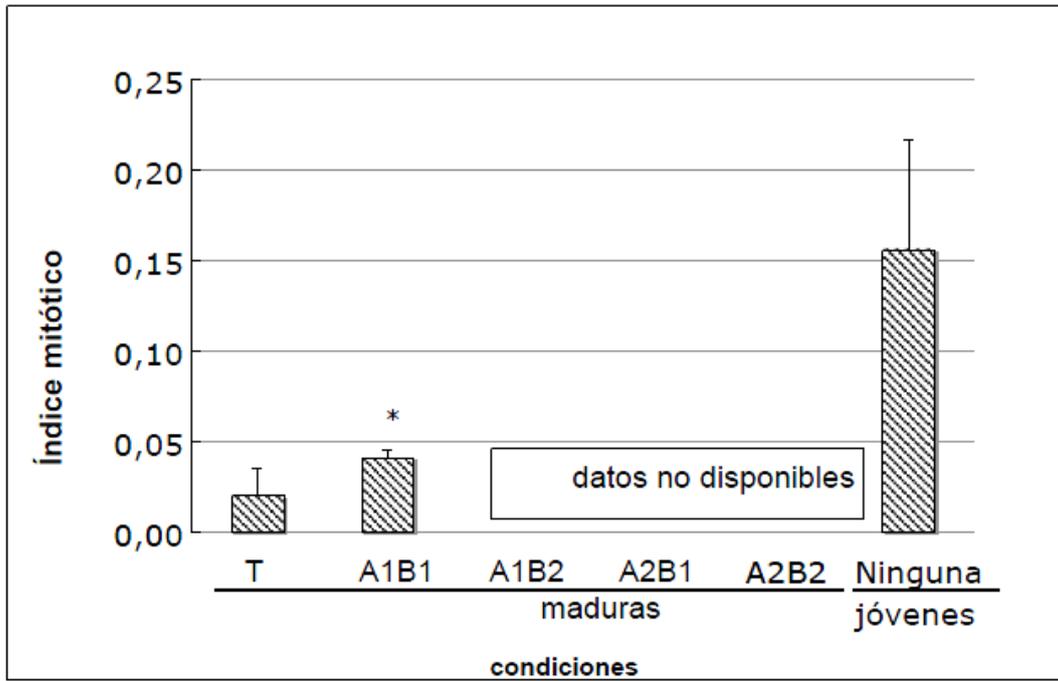


Figura 5

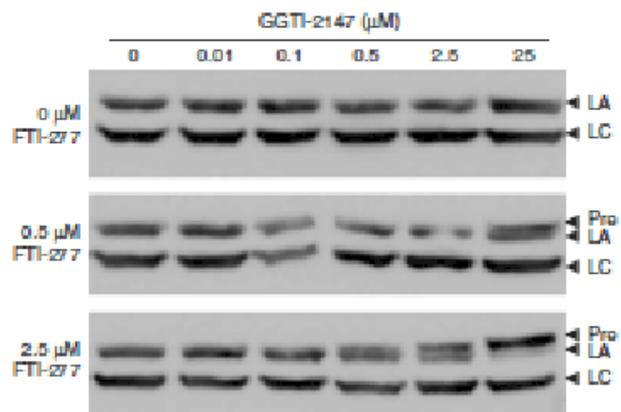


Figura 6

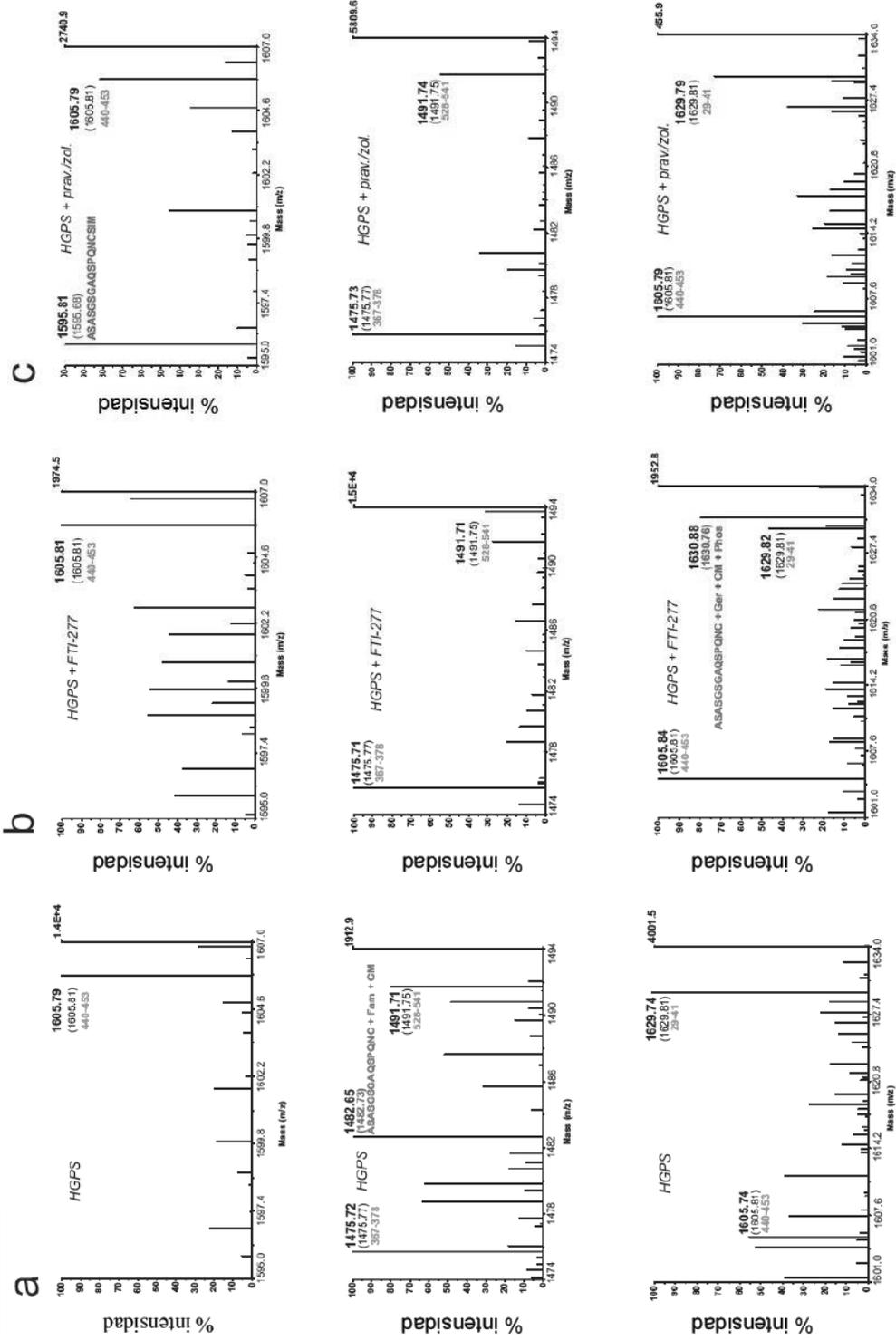


FIGURA 7

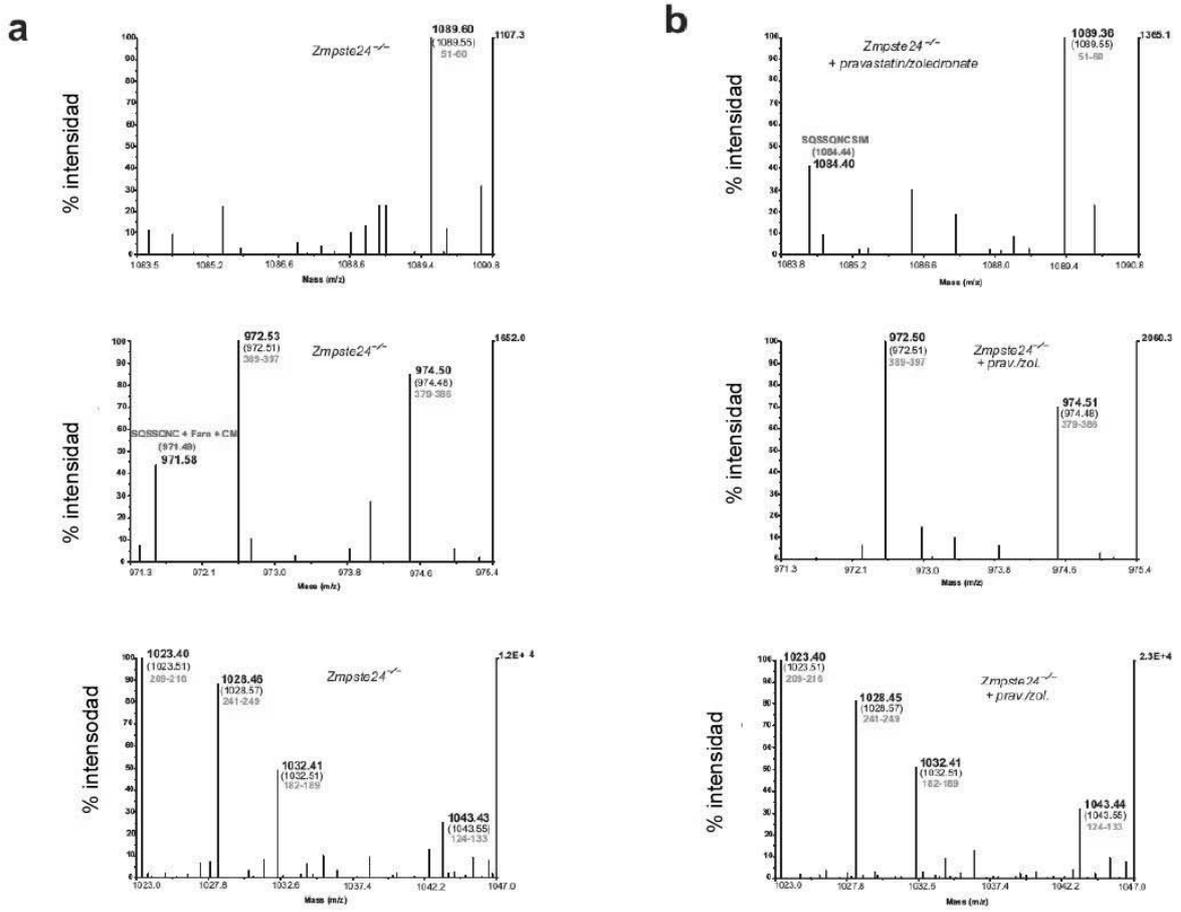


FIGURA 8

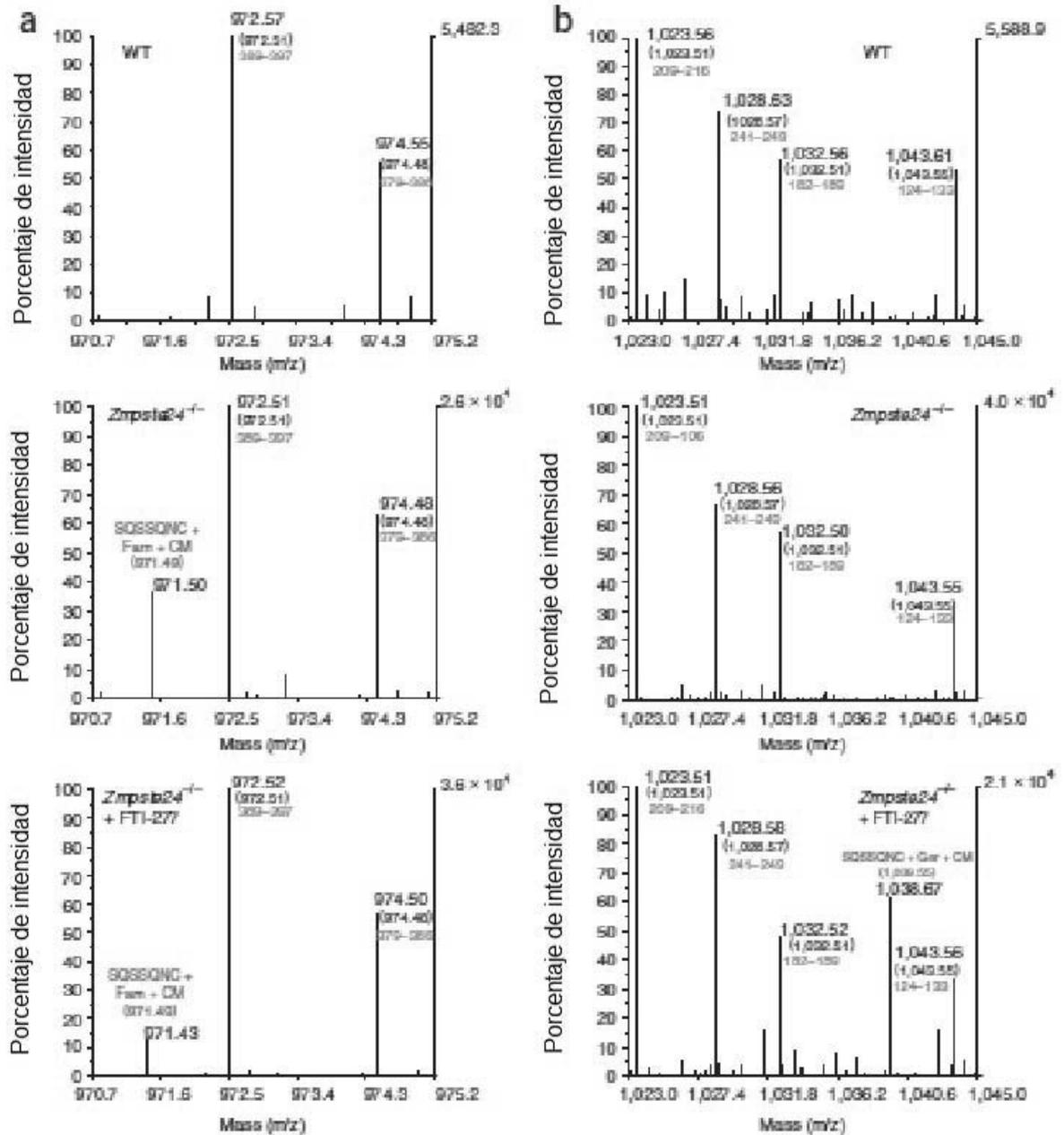


FIGURA 9

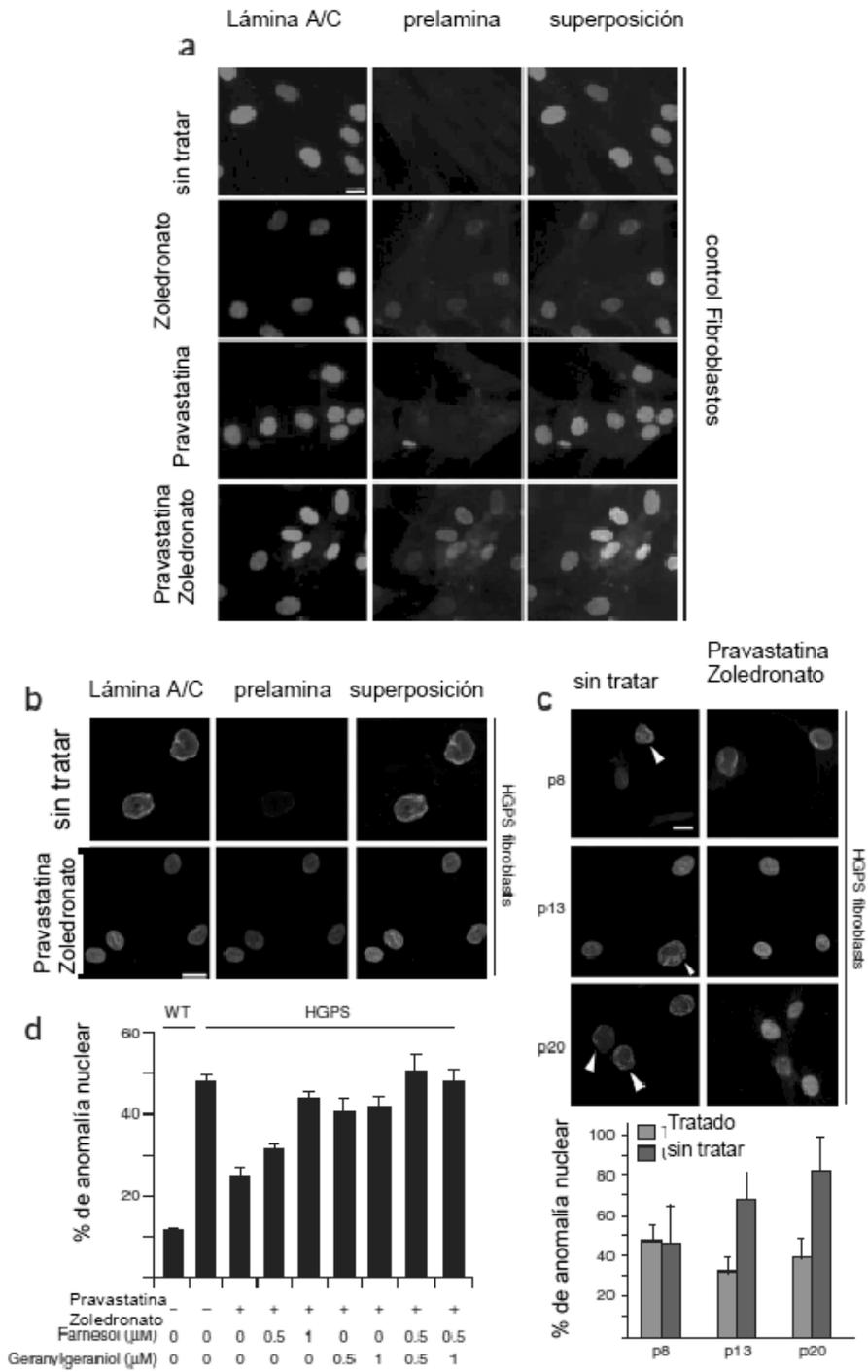


FIGURA 10

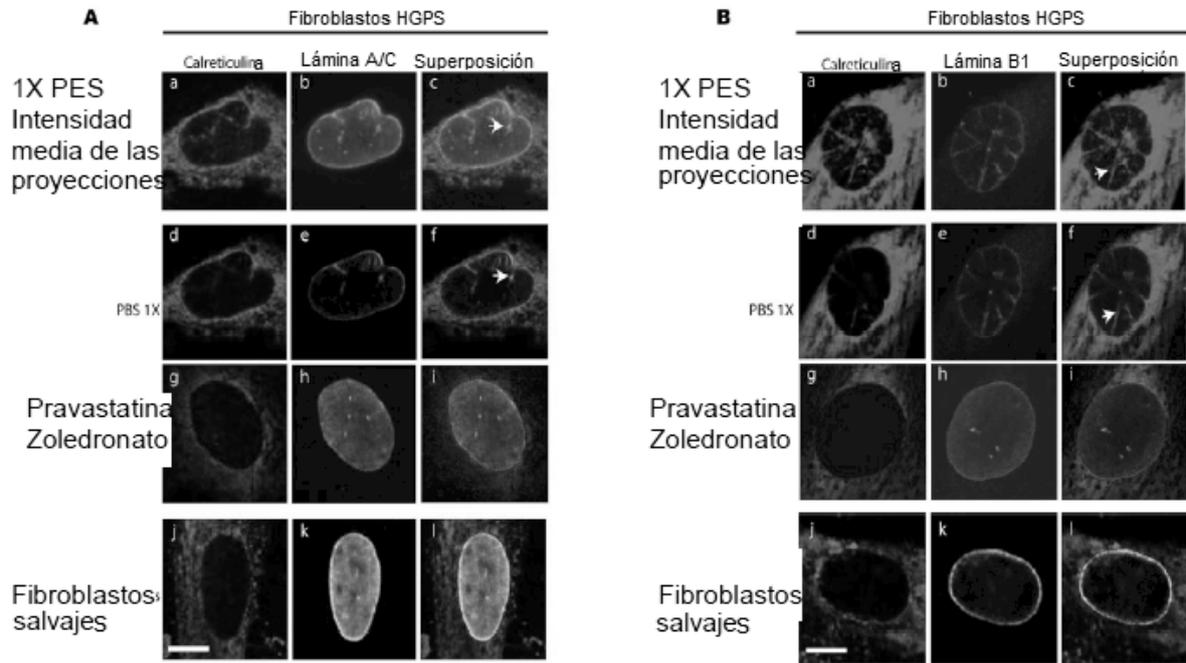
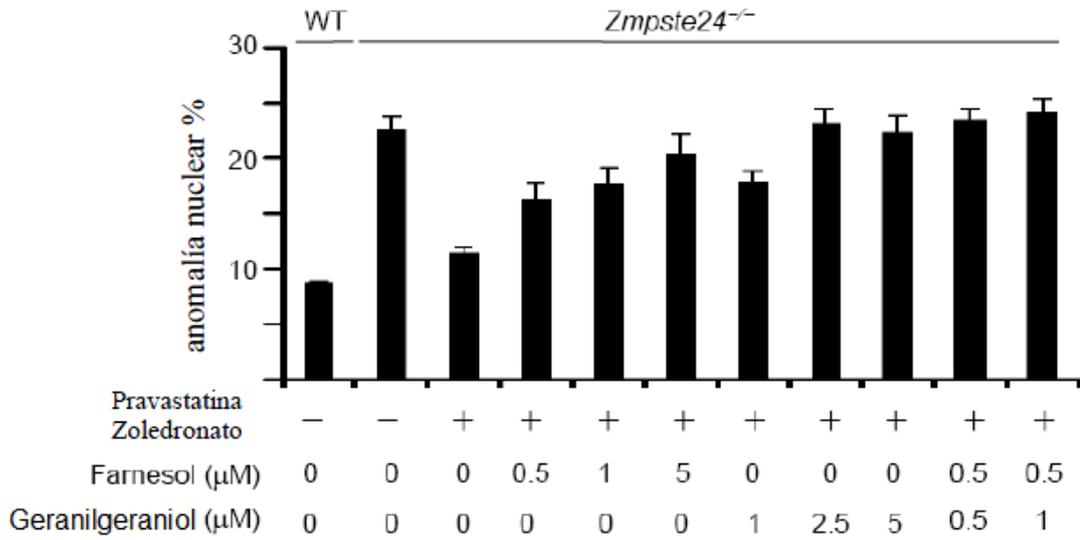
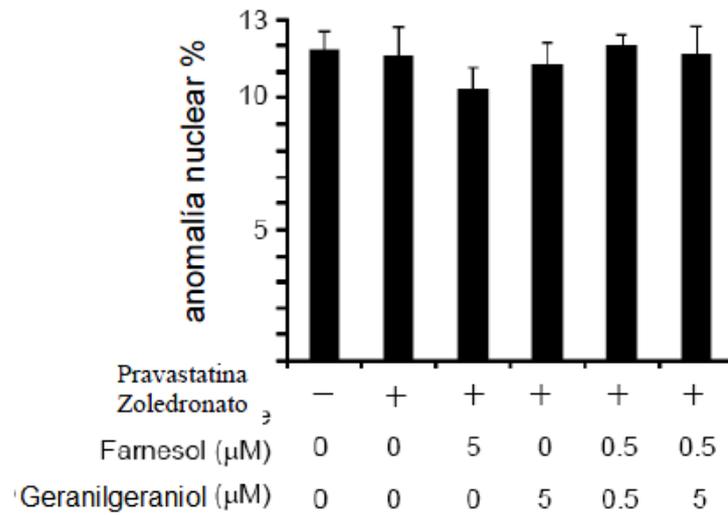


Figura 11

a



b



Figuras 12

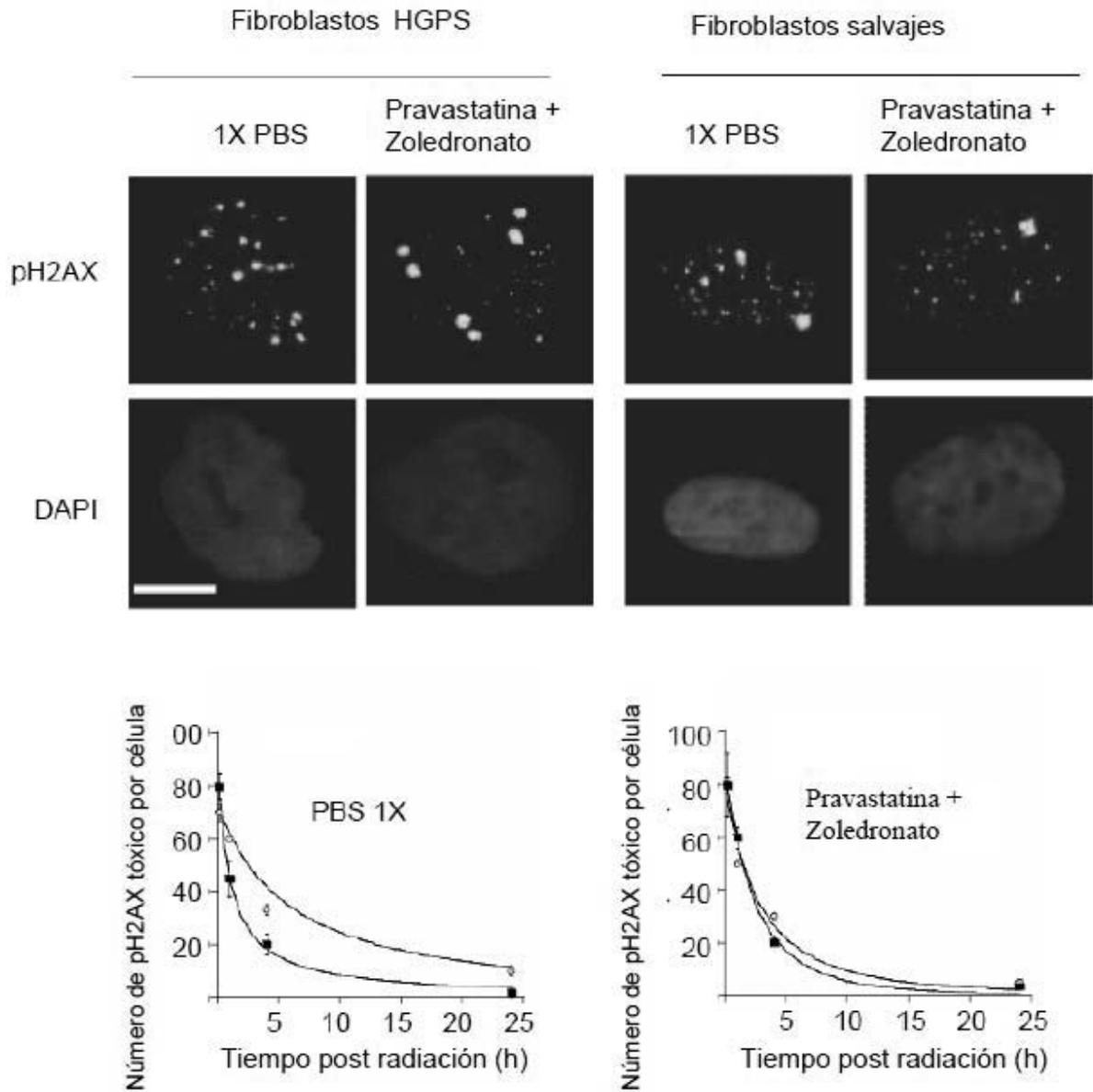


Figura 13

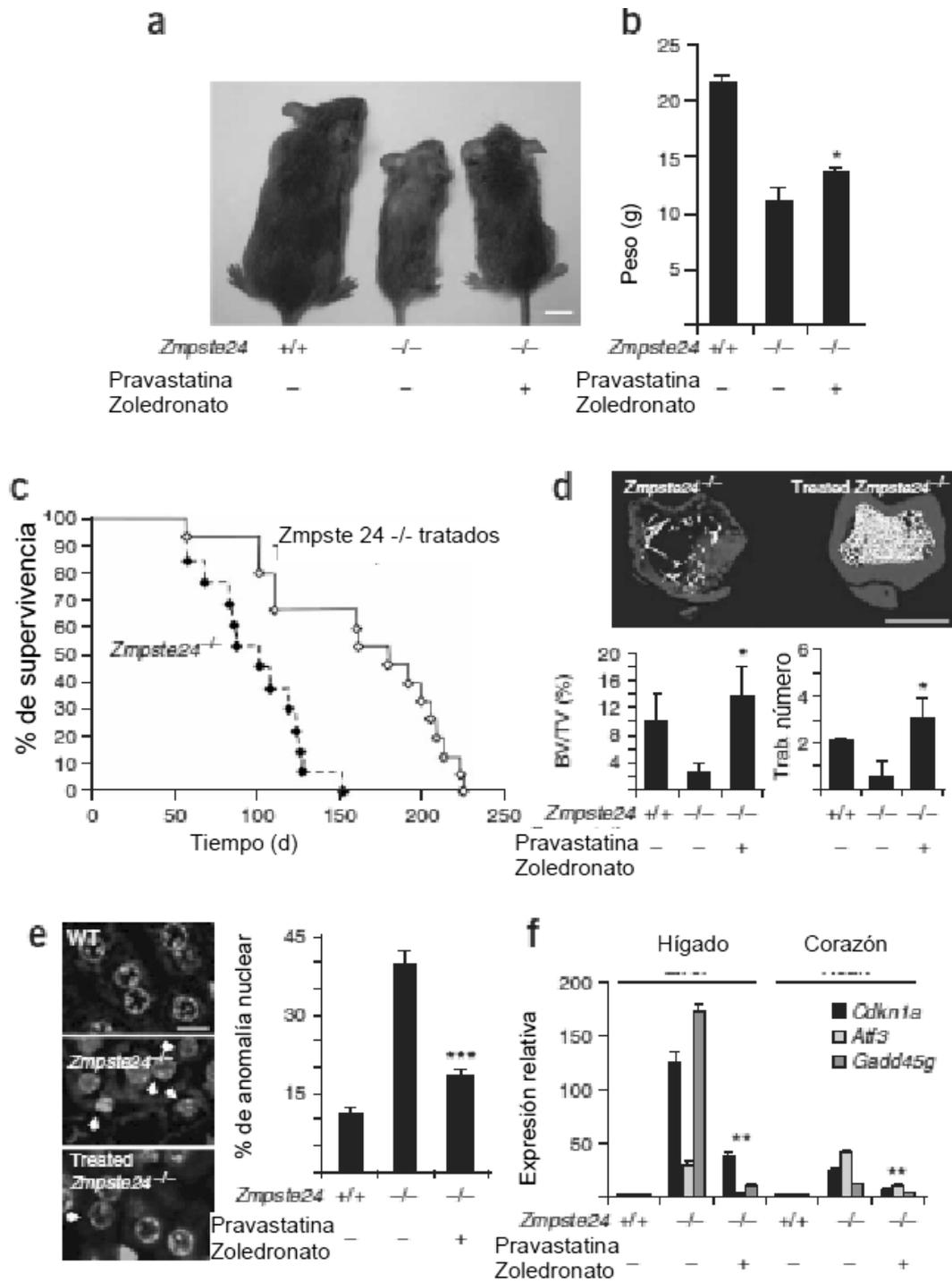
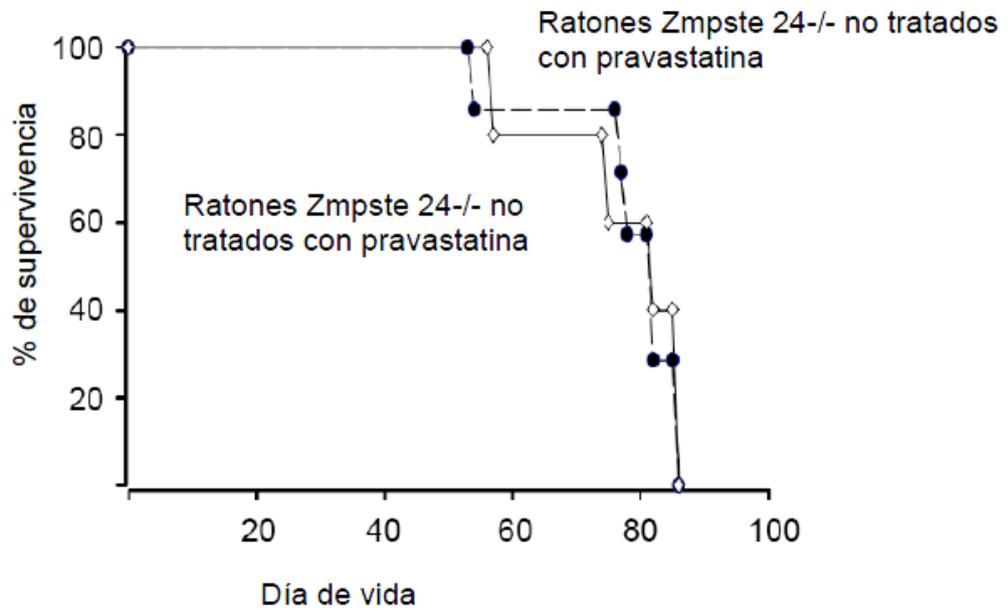


Figura 14

a



b

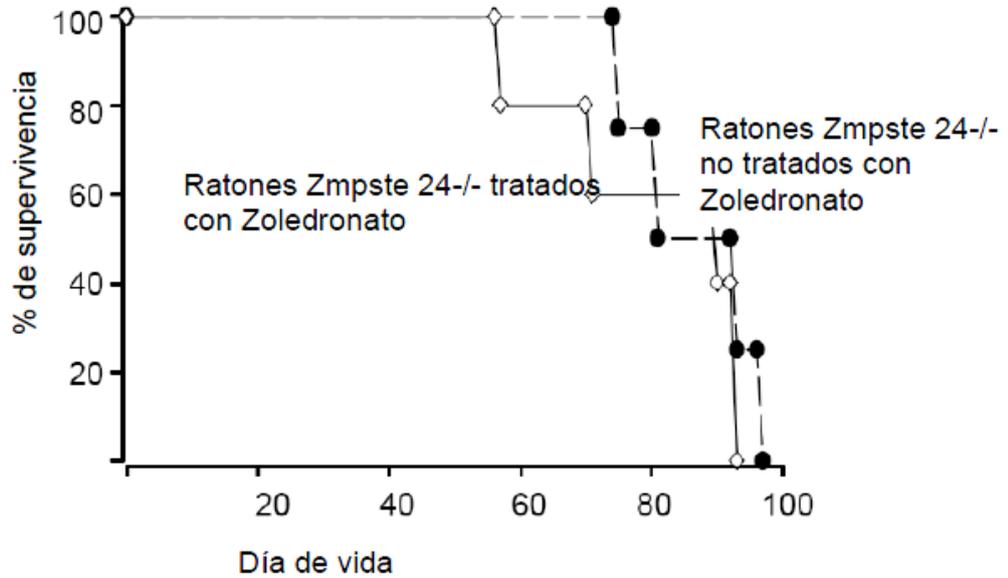


Figura 15

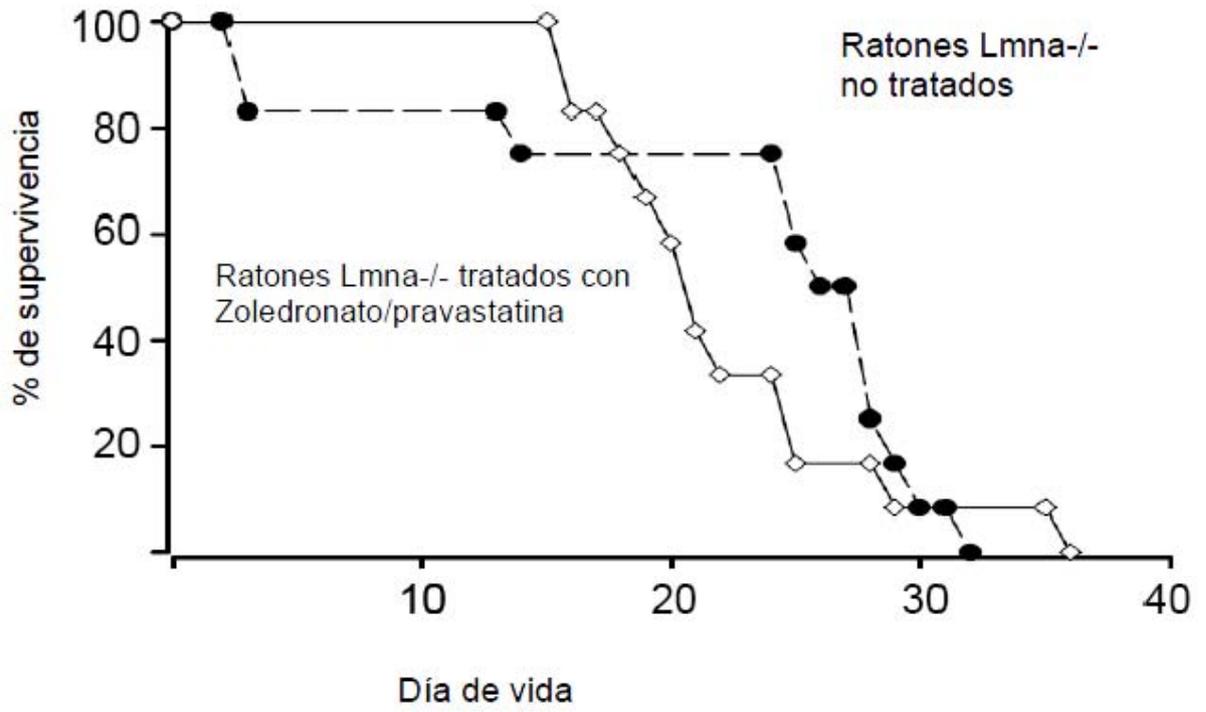


Figura 16