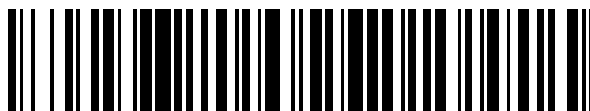


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 169**

51 Int. Cl.:

A61K 31/122 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2011 PCT/IB2011/054691**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012 WO12052956**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2011 E 11785110 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2629765**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar infecciones por poxvirus con una 1,4-naftoquinona como principio activo**

30 Prioridad:
21.10.2010 WO PCT/IB2010/054766

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.01.2017

73 Titular/es:
HÜGIN, AMBROS (100.0%)
Av. Eugène Pittard 3
1206 Geneva, CH

72 Inventor/es:
HÜGIN, AMBROS

74 Agente/Representante:
ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 596 169 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).

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR INFECCIONES POR POXVIRUS CON UNA 1, 4-NAFTOQUINONA COMO PRINCIPIO ACTIVO

DESCRIPCIÓN

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para tratar a un sujeto que tiene lesiones inducidas por virus de la piel y/o membranas mucosas con compuestos farmacéuticos que contienen naftoquinona.

10 Antecedentes de la invención

Las infecciones por virus humanos de familias de virus tales como *Poxviridae*, *Papillomaviridae* y *Herpesviridae* pueden provocar lesiones de la piel y/o membranas mucosas.

15 Los poxvirus son miembros de la familia *Poxviridae*. El poxvirus virus del molusco contagioso (VMC) es un miembro de la subfamilia *Chordopoxvirinae*, que también incluye el virus vaccinia. Se sabe que VMC infecta sólo a seres humanos. Aunque no existe un modelo de infección *in vitro*, los modelos *in vivo* usan ratones inmunodeficientes trasplantados con piel humana y son de uso limitado para estudiar la infección por VMC.

20 El molusco contagioso (MC) es una infección benigna de la piel y las membranas mucosas provocada por VMC. La mayoría de las personas con MC tienen múltiples lesiones, que se inician como pequeñas pápulas que entonces se agrandan hasta alrededor de 2-6 mm, pero raramente superan 1 cm de diámetro. La mayoría de las lesiones se solucionan sin formación de cicatrices, pero pueden provocar molestias y/o picor. VMC es común en todo el mundo y es responsable de aproximadamente el 1% de los trastornos cutáneos en los EE.UU., y esta tasa de infección puede
25 aumentar hasta el 2-8% en niños. Además, cuando se ubica alrededor del ojo, puede provocar una queratoconjuntivitis tóxica.

Hay cuatro tipos estrechamente relacionados de VMC, denominados VMC-1, VMC-2, VMC-3 y VMC-4. (Nakamura *et al.*, 1995). VMC-1 es lo más común en niños, mientras que VMC-2 es observado más a menudo en adultos y está asociado con transmisión sexual. Hay también una mayor incidencia de infección por VMC en pacientes inmunocomprometidos, tal como en el caso de SIDA y pacientes que se someten a quimioterapia.

Las lesiones por VMC individuales pueden desaparecer por sí mismas y generalmente duran desde 6-8 semanas hasta 2-3 meses. Sin embargo, a menudo se produce autoinoculación al rascarse, y la enfermedad puede propagarse extendiendo la duración de la infección hasta desde 8 meses hasta 18 meses (Tyring, 2003).

El uso de menadiona en un método para inhibir la replicación de un virus de ARN, concretamente VHC, se conoce a partir del documento US 2009/123447. VHC, en contraposición a VMC, es un virus de ARN monocatenario que provoca una infección sistémica con manifestaciones extrahepáticas, y requiere una terapia sistémica.

40 Ninguna opción de tratamiento individual ha mostrado convincentemente ser eficaz hasta la fecha (van der Wouden *et al.*, 2009). Debe indicarse también que algunas opciones de tratamiento que pueden provocar la rotura de la piel en o cerca de las lesiones también pueden propagar la infección adicionalmente. No obstante, debe buscarse un tratamiento por los siguientes motivos: i) motivos médicos: hemorragia, infecciones secundarias, picor y molestias, posible formación de cicatrices, queratoconjuntivitis crónica o por ii) motivos sociales: cosméticos, vergüenza, miedo a la transmisión a otras personas y exclusión social. Los médicos recomiendan tratar las lesiones en la zona genital para impedir que se propaguen (Tyring 2003).

Los tratamientos actuales de MC incluyen opciones tanto quirúrgicas como médicas tal como sigue: Las opciones quirúrgicas incluyen criocirugía, evisceración, legrado, tratamiento con cintas adhesivas y láser de colorante pulsado. Las opciones médicas incluyen: Podofilina y podofilox, cantaridina, disolución de yodo y emplasto de ácido salicílico, tretinoína, cimetidina, hidróxido de potasio, imiquimod, cidofovir, adapaleno, ácido tricloroacético, una combinación de ácido salicílico y ácido láctico, interferón alfa intralesional, inyecciones tópicas de antígeno estreptocócico y OK-432.

55 La familia *Papillomaviridae* contiene el miembro virus del papiloma humano (VPH). Como todos los virus del papiloma, los HPV establecen infecciones productivas sólo en queratinocitos de la piel o membranas mucosas. Aunque la mayoría de los casi 200 tipos conocidos de VPH no provocan síntomas en la mayoría de las personas, algunos tipos pueden provocar verrugas, mientras que otros, en una minoría de casos, pueden conducir a cánceres.
60 Las verrugas son infecciosas y pueden autoinocularse y propagarse a otros individuos por contacto directo.

En casos muy raros, VPH puede provocar epidermodisplasia verruciforme en individuos inmunocomprometidos. Actualmente no hay ningún tratamiento específico para la infección por VPH.

65 Hay diversas terapias para el tratamiento de verrugas, pero ninguna se considera verdaderamente eficaz ya que normalmente no pueden curar totalmente las lesiones y no previenen la reaparición. Puede encontrarse una

discusión de las terapias actualmente aceptadas en Gibbs (Gibbs *et al.* 2002; Gibbs *et al.* 2006). Recientemente, se ha sometido a prueba imiquimod en verrugas con algún efecto terapéutico limitado (Baker *et al.* 2011).

Genital HPV Infection - CDC Fact Sheet". Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 10 de abril de 2008. <http://www.cdc.gov/std/VPH/STDFact-VPH.htm>. Recuperado el 13 de noviembre de 2009 (verificado el 17 de octubre de 2011).

Mayo Clinic.com, Common warts, <http://www.mayoclinic.com/print/commonwarts/DS00370/DSECCIÓN=all&METHOD=print> (verificado el 17 de octubre de 2011).

HPV Vaccine Information For Young Women". Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 26 de junio de 2008. <http://www.cdc.gov/std/hpv/STDFact-HPV-vaccine-young-women.htm>. Recuperado el 13 de noviembre de 2009 (verificado el 17 de octubre de 2011).

American Cancer Society. "What Are the Risk Factors for Cervical Cancer?". Archivado a partir del original el 19 de febrero de 2008.

http://web.archive.org/web/20080219151934/http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_2X_What_are_the_risk_factors_for_cervical_cancer_8.a sp. Recuperado el 21 de febrero de 2008 (verificado el 17 de octubre de 2011).

La familia *Herpesviridae* es otra familia de virus bien conocida que provoca lesiones de la piel y/o membranas mucosas. El herpes simple de la familia *Herpesviridae* es una enfermedad viral provocada por el virus del herpes simple tanto de tipo 1 (VHS-1) como de tipo 2 (VHS-2). La infección con el virus del herpes se clasifica en uno de varios trastornos distintos basándose en el sitio de infección. La infección común de la piel o la mucosa puede afectar a la cara y la boca (herpes orofacial), los genitales (herpes genital) o las manos (panadizo herpético). Se producen trastornos más graves cuando el virus infecta y daña el ojo (queratitis por herpes), o invade el sistema nervioso central, dañando el cerebro (encefalitis por herpes). El herpes oral, cuyos síntomas visibles se denominan coloquialmente calentura o herpes labial, infecta la cara y la boca. El herpes oral es la forma más común de infección. El herpes genital, conocido simplemente como herpes, es la segunda forma más común de herpes.

El herpes simple se transmite lo más fácilmente por contacto directo con una lesión o el fluido corporal de un individuo infectado. También puede producirse transmisión a través del contacto piel a piel durante periodos de diseminación asintomática.

Muchas infecciones virales cutáneas están provocadas por el virus del herpes simple y, hasta la fecha, no se han desarrollado curas o tratamientos adecuados para las infecciones virales, especialmente infecciones de la piel debidas a herpes simple I y II (Wilhelmus 2010). Una vez infectado, el virus permanece en el cuerpo durante toda la vida. Pueden producirse infecciones recurrentes (brotos) de cuando en cuando, especialmente en momentos de alteración inmunitaria tal como VIH e inmunosupresión relacionada con cáncer.

Por el momento no está disponible ningún tratamiento tópico eficaz de las lesiones de la piel y/o las membranas mucosas tras la infección viral a través del virus del molusco contagioso, virus del papiloma humano o virus del herpes simple.

Por tanto, sigue habiendo necesidades médicas no satisfechas significativas para el tratamiento tópico eficaz de la piel y/o membranas mucosas tras estas infecciones virales.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona para tratar a un sujeto que tiene una lesión inducida por virus de la piel y/o membrana mucosa provocada por el virus del molusco contagioso, en la que dicho compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona se selecciona del grupo que comprende

i) menadiona o una sal de la misma, seleccionada del grupo que comprende bisulfito de menadiona, bisulfito de menadiona dimetilpirimidol, bisulfito de menadiona sódica, bisulfito de menadiona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de menadiona, fosfato de menadiona sódica, bisulfito de menadiona piridinol, epóxido de menadiona y bisulfito de menadiona sódica trihidratada,

ii) naftoquinona o una sal de la misma, seleccionada del grupo que comprende bisulfito de naftoquinona, bisulfito de naftoquinona dimetilpirimidol, bisulfito de naftoquinona sódica, bisulfito de naftoquinona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de naftoquinona, fosfato de naftoquinona sódica, bisulfito de naftoquinona piridinol, epóxido de naftoquinona y bisulfito de naftoquinona sódica trihidratada,

iii) lawsona o una sal de la misma seleccionada del grupo que comprende bisulfito de lawsona, bisulfito de lawsona

dimetilpirimidol, bisulfito de lawsona sódica, bisulfito de lawsona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de lawsona, fosfato de lawsona sódica, bisulfito de lawsona piridinol, epóxido de lawsona y bisulfito de lawsona sódica trihidratada

5 iv) juglona o una sal de la misma seleccionada del grupo que comprende bisulfito de juglona, bisulfito de juglona dimetilpirimidol, bisulfito de juglona sódica, bisulfito de juglona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de juglona, fosfato de juglona sódica, bisulfito de juglona piridinol, epóxido de juglona y bisulfito de juglona sódica trihidratada

10 v) plumbagina o una sal de la misma seleccionada del grupo que comprende bisulfito de plumbagina, bisulfito de plumbagina dimetilpirimidol, bisulfito de plumbagina sódica, bisulfito de plumbagina nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de plumbagina, fosfato de plumbagina sódica, bisulfito de plumbagina piridinol, epóxido de plumbagina y bisulfito de plumbagina sódica trihidratada.

15 Además se da a conocer una composición farmacéutica que se administra antes y/o de manera simultánea y/o tras someterse a un segundo tratamiento químico o mecánico.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 muestra el efecto inhibitor de menadiona y bisulfito de menadiona sobre la replicación de virus vaccinia. Los valores indican el promedio de 2 muestras.

25 La figura 2 muestra el efecto inhibitor de diversos compuestos de la familia de naftoquinona y otros agentes seleccionados sobre virus vaccinia. Abreviaturas usadas: K1: vitamina K1, K2: vitamina K2, M: menadiona, MBS: bisulfito de menadiona, BP: peróxido de benzoilo, CHP: hidroperóxido de cumeno, HP: peróxido de hidrógeno, t-BHP: hidroperóxido de terc-butilo, DEM: maleato de dimetilo, DNCB: dinitroclorobenceno, DNFB: dinitrofluorobenceno, MSA: ácido mercaptosuccínico, D: dicumarol y HQ: hidroquinona.

30 La figura 3 representa la prueba de diversos agentes (BP: peróxido de bencilo), a las concentraciones indicadas por triplicado de células HaCaT en placas de 96 pocillos.

Las figuras 4 A, B y C muestran el efecto inhibitor de diversas concentraciones de menadiona sobre la replicación de virus vaccinia en células HeLa (figura 4A) y HaCaT (figura 4B). Efecto inhibitor de diversas concentraciones de dicumarol sobre la replicación de virus vaccinia en HeLa (figura 4C).

35 La figura 5 muestra el efecto viricida directo de diversos compuestos de la familia de Naftoquinona y otros diversos agentes sobre virus vaccinia (exposición de 24 h): peróxido de benzoilo, dicumarol, dinitroclorobenceno, dinitrofluorobenceno, vitamina K1, vitamina K2, menadiona (M es menadiona nueva, M* es menadiona mantenida a TA durante 2 meses), bisulfito de menadiona y control.

40 Descripción detallada de la invención

45 En la presente invención, se ha encontrado inesperadamente por primera vez que una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona, una sal del mismo, o un metabolito activo de dicho compuesto puede bloquear el crecimiento de poxvirus cuando se aplica a lesiones inducidas por virus.

Los compuestos de la familia de 1,4-naftoquinona se seleccionan del grupo que comprende menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona), naftoquinona (4a,8a-dihidronaftaleno-1,4-diona), lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), juglona (5-hidroxi-1,4-naftalenodiona) y plumbagina (5-hidroxi-2-metil-naftoquinona), o una sal de las mismas.

50 Un "metabolito activo", tal como se usa en el presente documento, es un producto producido a través de metabolismo en el cuerpo de un compuesto especificado, o sal del mismo, y que presenta la misma actividad biológica que el compuesto especificado.

55 Pueden identificarse metabolitos activos del compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona de la invención usando técnicas de rutina conocidas en la técnica y determinarse sus actividades usando pruebas. Tales metabolitos pueden resultar por ejemplo de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática, y similares, del compuesto de la invención administrado. Por consiguiente, la invención incluye metabolitos activos de un compuesto de la invención, incluyendo compuestos producidos mediante un procedimiento que comprende poner en contacto un compuesto de esta invención con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo. Tal metabolito también puede producirse *in vitro* mediante oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación o escisión enzimática del compuesto correspondiente, seleccionándose estos compuestos del grupo que comprende menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona), naftoquinona (4a,8a-dihidronaftaleno-1,4-diona), lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), juglona (5-hidroxi-1,4-naftalenodiona) y plumbagina (5-hidroxi-2-metil-naftoquinona), o una sal de las mismas.

A lo largo de toda la memoria, el término menadiona se aplica a y engloba también sus sales. El término sales de menadiona incluye todas las formas de este compuesto, incluyendo pero sin limitarse a bisulfito de menadiona, bisulfito de menadiona dimetilpirimidol, bisulfito de menadiona sódica y bisulfito de menadiona sódica trihidratada.

5 A lo largo de toda la memoria, el término naftoquinona se aplica a y engloba también sus sales. El término sales de naftoquinona incluye todas las formas de este compuesto, incluyendo pero sin limitarse a bisulfito de naftoquinona, bisulfito de naftoquinona dimetilpirimidol, bisulfito de naftoquinona sódica, bisulfito de naftoquinona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de naftoquinona, fosfato de naftoquinona sódica, bisulfito de naftoquinona piridinol, epóxido de naftoquinona y bisulfito de naftoquinona sódica trihidratada.

10 A lo largo de toda la memoria, el término lawsona se aplica a y engloba también sus sales. El término sales de lawsona incluye todas las formas de este compuesto, incluyendo pero sin limitarse a bisulfito de lawsona, bisulfito de lawsona dimetilpirimidol, bisulfito de lawsona sódica, bisulfito de lawsona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de lawsona, fosfato de lawsona sódica, bisulfito de lawsona piridinol, epóxido de lawsona y bisulfito de lawsona sódica trihidratada.

15 A lo largo de toda la memoria, el término juglona se aplica a y engloba también sales. El término sales de juglona incluye todas las formas de este compuesto, incluyendo pero sin limitarse a bisulfito de juglona, bisulfito de juglona dimetilpirimidol, bisulfito de juglona sódica, bisulfito de juglona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de juglona, fosfato de juglona sódica, bisulfito de juglona piridinol, epóxido de juglona y bisulfito de juglona sódica trihidratada.

20 A lo largo de toda la memoria, el término plumbagina se aplica a y engloba también sus sales. El término plumbagina sales incluye todas las formas de este compuesto, incluyendo pero sin limitarse a bisulfito de plumbagina, bisulfito de plumbagina dimetilpirimidol, bisulfito de plumbagina sódica, bisulfito de plumbagina nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de plumbagina, fosfato de plumbagina sódica, bisulfito de plumbagina piridinol, epóxido de plumbagina y bisulfito de plumbagina sódica trihidratada.

25 Por ejemplo, se ha encontrado por primera vez que la menadiona o una sal de la misma puede bloquear el crecimiento de poxvirus cuando se aplica a lesiones inducidas por virus.

30 La técnica anterior enseña diversos papeles primarios y secundarios de la menadiona como agente quimioterápico experimental, y además enseña su uso como micronutriente barato para ganado en muchos países. También se añaden formas de menadiona a algunos alimentos para mascotas como fuente de vitamina K. Se ha empleado menadiona para la prevención y el tratamiento de erupción cutánea, secundaria a terapia anti-EGFR, tal como enseñan los documentos WO2006113479 y WO2009114745.

35 El uso de compuestos de la familia de 1,4-naftoquinona y en particular menadiona como tratamiento para VMC nunca se había sugerido ni puesto en práctica hasta la fecha.

40 Tal como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" indica una cantidad de un compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona suficiente para reducir y eliminar finalmente las lesiones inducidas por virus, y es menor que la cantidad que puede provocar efectos secundarios graves a través de toxicidad, por ejemplo. La cantidad terapéuticamente eficaz es la requerida para proporcionar una razón de beneficio con respecto a riesgo dentro del alcance de juicio sensato de algún experto en la técnica.

45 Tal como se usa en el presente documento, la frase "sujeto que tiene una lesión inducida por virus de la piel y/o membranas mucosas" indica un paciente que tiene lesiones inducidas por VMC o lesiones inducidas por VPH o lesiones inducidas por VHS de la piel y/o mucosa. En particular, las lesiones de la piel inducidas por VMC tienen el carácter de pápulas con forma de cúpula que muestran una umbilicación central, tienen 2-6 mm de diámetro y raramente superan 1 cm de diámetro. Pueden estar presentes en grupos, o estar ampliamente diseminadas. Las lesiones pueden ubicarse en cualquier lugar del cuerpo, con una predilección por la cara, el tronco y las extremidades en niños, y por la ingle y los genitales en adultos. Preferentemente, el sujeto es animal. Lo más preferentemente, el sujeto es un ser humano.

50 Tal como se usa en el presente documento, la frase "portador farmacéuticamente aceptable" indica cualquier clase de compuesto o formulación no activo (por ejemplo cremas, loción o aceites), que facilitan el procesamiento del principio activo (en este caso compuestos de la familia de 1,4-naftoquinona tales como pero sin limitarse a menadiona) para dar formulaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Para aplicaciones tópicas pueden usarse penetrantes adecuados en la formulación. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

55 En realizaciones que implican el tratamiento de MC, no se pone ninguna limitación a las variantes genéticas de VMC asociadas con las lesiones. VMC, un miembro de la familia de poxvirus, es uno de los virus más grandes, sólo ligeramente más pequeño que las bacterias más pequeñas. Tiene un genoma de ADN complejo que se replica en el citoplasma de células infectadas. No puede hacerse crecer en cultivo tisular o en huevos, y por este motivo, se empleó virus vaccinia como modelo de virus comparable en los estudios *in vitro* actuales. VMC se ha hecho crecer en prepucio humano injertado sobre ratones atímicos pero no en otros animales de laboratorio. Los seres humanos

son huéspedes para diversos tipos de poxvirus: *Orthopoxvirus*; que se asemeja a la viruela y vaccinia, y que son ovoides, *Parapoxvirus*; que son virus de nódulos Orf y Mikers, que son de forma cilíndrica, y un virus no clasificado, con características que son intermedias entre los dos anteriores. Estos tienen una estructura intermedia. Incluyen VMC y tanapox. En 1996, se determinó la estructura primaria y capacidad codificante de VMC Senkevich *et al.*, (1996), e incluye una región codificante para una proteína, que puede afectar al estado oxidativo de la célula infectada (Shisler, 1998). El análisis del genoma de VMC ha revelado que codifica para aproximadamente 182 proteínas, muchas de las cuales tienen homólogos directos en ortopoxvirus. El análisis de endonucleasas de restricción de los genomas por Nakamura *et al.* ha identificado 4 tipos (Nakamura *et al.*, 1995). VMC 1 y VMC 11 tienen genomas de 185 kilobases y 195 kilobases respectivamente. VMC 111 y IV son muy raros. No se conoce la relación entre el tipo de virus y la morfología de las lesiones o la distribución anatómica.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” se emplea en el presente documento en referencia a compuestos, materiales, composiciones en formas farmacéuticas que están dentro del alcance del juicio médico sensato, y adecuados para su uso en contacto con la piel humana, sin provocar excesiva irritación, toxicidad, respuesta alérgica u otro problema o complicación, que es acorde con una razón beneficio/riesgo aceptable. Farmacéuticamente aceptable incluye todos los compuestos que son dermatológicamente aceptables, tales como cremas, aceites, lociones, geles y similares que contienen un compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona y/o cualquiera de sus análogos.

Generalmente, el principio activo de compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona, por ejemplo menadiona, o una sal de la misma, se formula con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Algunos ejemplos no limitativos de tales portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares y almidones, gelatina, excipientes tales como manteca de cacao, aceites, glicoles y glicerol.

Generalmente, el compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona (por ejemplo menadiona, o una sal de la misma) en las composiciones descritas en el presente documento puede formularse para aplicaciones tópicas portadores farmacéuticos aceptables bien conocidos en las técnicas cosmética y farmacéutica.

En aspectos preferidos, las formulaciones de la invención que comprende uno o más de los principios activos anteriores, componentes no activos, emulsionantes y aditivos biológicos, deben ser de una forma y consistencia tales que los principios activos del compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona (por ejemplo menadiona, o una sal de la misma) o cualquiera de sus análogos se conservan bien y son estables a lo largo del tiempo, es decir los principios activos permanecen estables desde el punto de vista de la fabricación (o mezclado por el usuario) hasta el momento de uso. En aspectos preferidos adicionales, es deseable que los principios activos del compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona (por ejemplo menadiona, o una sal de la misma) o cualquiera de sus análogos permanezcan sustancialmente dispersados de manera homogénea, o disueltos en la formulación particular usada de manera que es posible administrar o aplicar cantidades constantes de principios activos en función de la cantidad o el volumen de la formulación aplicada.

En una realización de esta invención, el compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona se formula como un formato dermatológicamente aceptable tal como, pero sin limitarse a, pomadas, linimentos, pastas, películas, hidrogeles y otros geles, liposomas, vesículas de transferosomas, cremas, lociones, bálsamos, champús medicados, parches dérmicos, parches transdérmicos, pulverizaciones transdérmicas, inyector de chorro o similares, adecuados para aplicación tópica.

Pueden emplearse diversas cremas cutáneas en esta invención. Una crema es una preparación tópica, usada habitualmente para su aplicación a la piel. Las cremas pueden considerarse productos farmacéuticos ya que incluso las cremas cosméticas se basan en técnicas desarrolladas por la farmacia y se usan ampliamente cremas no medicadas en una variedad de estados de la piel (dermatomas). El uso del concepto de unidad de punta del dedo puede ser útil para orientar cuánta crema tópica se requiere para cubrir diferentes zonas. Las cremas son emulsiones semisólidas, y son mezclas de aceite y agua. Se dividen en dos tipos: cremas de aceite en agua (O/W) que se componen de pequeñas gotitas de aceites dispersadas en una fase acuosa continua, y cremas de agua en aceite (W/O) que se componen de pequeñas gotitas de agua dispersadas en una fase oleosa continua. Las cremas de aceite en agua son más cómodas y cosméticamente aceptables ya que son menos grasientas y se eliminan por lavado más fácilmente usando agua. Las cremas de agua en aceite son más difíciles de manipular pero muchos fármacos, que se incorporan en cremas, son hidrófobos y se liberarán más fácilmente a partir de una crema de agua en aceite que de una crema de aceite en agua. Las cremas de agua en aceite son también más humectantes ya que proporcionan una barrera oleosa que reduce la pérdida de agua del estrato córneo, la capa más externa de la piel.

Las cremas son formas de dosificación semisólidas que contienen una o más sustancias farmacológicas disueltas o dispersadas en una base adecuada. Este término se ha aplicado tradicionalmente a semisólidos que presentan una consistencia relativamente fluida formulados como emulsiones de o bien agua en aceite (por ejemplo, crema fría) o bien aceite en agua (por ejemplo, crema de acetónido de fluocinolona). Sin embargo, más recientemente el término se ha restringido a productos que consisten en emulsiones de aceite en agua o dispersiones microcristalinas acuosas de ácidos grasos de cadena larga o alcoholes que pueden lavarse con agua y son más cosmética y estéticamente aceptables.

En realizaciones de esta invención, se emplean concentraciones generales de entre el 0,01 y el 5% en peso del producto farmacéutico, y son suficientes para el tratamiento de lesiones cutáneas inducidas por virus.

5 En particular, el tratamiento consiste en pintar las lesiones con un bastoncillo de algodón, aplicar una disolución de 50 mM del compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona (tal como menadiona) disuelto en DMSO a la punta de la lesión. Tras 4 semanas, la piel era normal y sin cicatriz o alteración del color.

10 En el caso de tratamientos conjuntos, por ejemplo con dicumarol, se considerarán adecuadas concentraciones del 0,1% al 10% en peso. En el caso de tratamientos conjuntos, por ejemplo con vitamina C, se consideran concentraciones del 0,1 - 5% en peso, preferiblemente en concentraciones de desde el 0,5 - 3% en peso, lo más preferiblemente desde el 1 hasta el 2%.

15 La presente invención también contempla llevar a cabo el método de administración de un compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona de la invención (tal como menadiona) con una segunda terapia dirigida a tratar la lesión inducida por virus. En algunos aspectos de la invención, la segunda terapia puede administrarse al mismo tiempo que el tratamiento con compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona (tal como menadiona); en otros aspectos puede administrarse antes o después del tratamiento con compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona (tal como menadiona).

20 En aún otro aspecto de esta invención, el segundo tratamiento puede ser de origen mecánico, tal como legrado, excisión, cirugía, crioterapia, tratamiento con laser, tratamiento con cintas adhesivas, etc. En otros aspectos, el segundo tratamiento puede ser de naturaleza mecánica, tal como ácido tricloroacético, ácido salicílico.

25 En una realización adicional de esta invención, puede emplearse ventajosamente en esta invención una combinación de compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona de la invención (tal como menadiona), dicumarol y vitamina C. Los compuestos adicionales que pueden emplearse ventajosamente en esta invención incluyen, pero no se limitan a compuestos que pueden interferir directa o indirectamente con mecanismos de protección celular contra el estrés oxidativo. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a agentes tales como maleato de dimetilo, forona y butioninasulfoxamina en concentraciones del 0,1 - 5% en peso, preferiblemente en concentraciones de desde el 0,5 - 3% en peso, lo más preferiblemente desde el 1 hasta el 2%.

Ejemplos

Ejemplo 1 Datos clínicos

35 *Tratamiento de un paciente:*

40 Una paciente femenina de 11 años de edad, tratada previamente para la infección por molusco contagioso con legrado, tuvo dos reapariciones de molusco contagioso. En cada caso, se trataron varias lesiones tempranas, que estaban en la región del codo o la región de la mandíbula inferior respectivamente, de una a dos veces al día durante 5 días consecutivos. El tratamiento consistió en pintar las lesiones con un bastoncillo de algodón, aplicar una disolución de menadiona 50 mM disuelta en DMSO a la punta de la lesión. Tras 4 semanas, la piel era normal y sin cicatriz o alteración del color. Las concentraciones de menadiona, sus análogos y compuestos adicionales usados en esta invención se indican a continuación:

45 En realizaciones de esta invención, se emplean en general concentraciones de entre el 0,01 y el 5% en peso del producto farmacéutico, y son suficientes para el tratamiento de lesiones cutáneas inducidas por virus. En el caso de tratamientos conjuntos, por ejemplo con dicumarol, se considerarán adecuadas concentraciones del 0,1% al 10% en peso. En el caso de tratamientos conjuntos, por ejemplo con vitamina C, en concentraciones del 0,1 - 5 % en peso. 50 En una realización adicional de esta invención, puede emplearse ventajosamente en esta invención una combinación de menadiona, dicumarol y vitamina C. Los compuestos adicionales que pueden emplearse ventajosamente en esta invención incluyen, pero no se limitan a compuestos que pueden interferir directa o indirectamente con mecanismos de protección celular contra estrés oxidativo. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a agentes tales como maleato de dimetilo, forona y butioninasulfoxamina en concentraciones del 0,1 - 5% en peso.

Modelo in vitro

Protocolos experimentales

60 Puesto que no se ha mostrado que VMC se replique en cultivo celular, se ha usado el virus vaccinia relacionado como modelo *in vitro*.

65 Los experimentos sometieron a prueba el efecto de diversos compuestos sobre la infectividad de virus vaccinia.

Los compuestos o bien se preincubaron con virus antes de la infección de monocapas de células, o bien se

añadieron a monocapas infectadas tal como se describe a continuación. La formación de placas de virus fue la lectura para estos experimentos.

5 La preparación de la cepa de virus vaccinia WR, y la descripción de un ensayo de placas para cuantificar virus se describen en Earl *et al.*, 2007.

Se midió la toxicidad de compuestos de prueba sobre monocapas de células no infectadas usando el colorante de tetrazolio convencional MTT.

10 Ejemplo 2

Protocolo experimental

15 Efecto inhibitor de menadiona y bisulfito de menadiona sobre la replicación de virus vaccinia. Se infectaron monocapas de células Ha-Cat y Hela en una placa de 96 pocillos con 1000 UFP (unidades formadoras de placas) de virus vaccinia WR.

Tras 1 h, se añadió menadiona o bisulfito de menadiona a las concentraciones indicadas.

20 Tras 1 día, se sometieron las placas a 3 ciclos de congelación descongelación, se recogió el sobrenadante y se procesó para la titulación de virus vaccinia.

Los valores indican el promedio de 2 muestras.

25 *Resultados*

Figura 1. Cuando se someten a prueba en 2 líneas celulares de queratinocitos humanos establecidos, menadiona y bisulfito de menadiona redujeron la progenie del virus de una manera dependiente de la dosis en ambas líneas celulares. A una concentración de 28 $\mu\text{M}/\text{ml}$, los rendimientos de virus vaccinia se redujeron en un factor > 10 , en comparación con los controles.

30 Ejemplo 3

Protocolo experimental

35 Se preincubaron duplicados de 100 μl de virus vaccinia en pocillos de una placa de 96 pocillos con 100 μl de 1 mM (la concentración de incubación final es 500 mM) de compuestos seleccionados.

40 Tras una incubación de 4 h en dichos agentes, se diluyó virus vaccinia 1000 veces y se añadió a cultivos en monocapa de BS-C-1 en placas de 24 pocillos para cuantificar la formación de placas de virus como medida de las partículas de virus infecciosas restantes.

45 Compuestos usados: K1: vitamina K1, K2: vitamina K2, M: menadiona, MBS: bisulfito de menadiona, BP: peróxido de benzoilo, CHP: hidroperóxido de cumeno, HP: peróxido de hidrógeno, t-BHP: hidroperóxido de terc-butilo, DEM: maleato de dimetilo, DNCB: dinitroclorobenceno, DNFB: dinitrofluorobenceno, MSA: ácido mercaptosuccínico, D: dicumarol, HQ: hidroquinona.

Resultados

50 Figura 2. La preincubación de virus vaccinia con una serie de compuestos tal como se indica redujo de manera variable la infectividad del virus, cuando se cuantifica en monocapas infectadas posteriormente de la línea celular indicadora BS-C-1.

55 Ejemplo 4

Protocolo experimental

60 Prueba de diversos agentes (BP: peróxido de benzoilo), la figura 3 representa, a las concentraciones indicadas por triplicado de células HaCaT en placas de 96 pocillos (figura 3).

- Toxicidad sobre las células (lado izquierdo del panel): Se expusieron monocapas de células a agentes tal como se indica, y 1 día más tarde, se analizó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT convencional (la DO de control era de entre 1,15 y 1,3).

65 - Inhibición de la replicación de virus vaccinia (lado derecho del panel): Se infectaron monocapas de HaCaT con 1000 UFP de virus vaccinia. Tras 2 h, se añadieron los agentes tal como se indica. Un día más tarde, se sometieron

las placas a 3 ciclos de congelación descongelación y se recogieron los pocillos individualmente. Entonces se tituló el virus según procedimientos de titulación de virus convencionales.

Resultados

5
10
Figura 3. Esta figura representa el efecto dependiente de la dosis de los compuestos indicados, usados a concentraciones específicas sobre dos parámetros relevantes: i) inhibición del virus (panel izquierdo) y ii) toxicidad celular (panel derecho). Mientras que la hidroquinona a las concentraciones mostradas no tuvo efecto sobre la toxicidad celular o la replicación del virus, BP, dicumarol y bisulfito de menadiona muestran toxicidad celular e inhibición de la replicación del virus dependiente de la dosis.

Ejemplo 5

Protocolo experimental

15
20
Se sembraron 2×10^4 células Hela o 1×10^4 HaCaT en placas de 96 pocillos y se incubaron las placas durante 2 días. Para estudios de toxicidad, se incubaron las células en presencia de agente a la concentración indicada. Tras 1 día, se realizó un ensayo de MTT convencional y se midió la densidad óptica. Para estudios de infección de virus, se infectaron monocapas de células por triplicado con 1000 UFP de virus vaccinia en presencia de agente a las concentraciones indicadas, y se añadieron 2 h después de añadirse el virus a las células. Se recogieron pocillos individuales tras 1 día. Se cuantificó el virus en un ensayo de placas convencional en células BS-C-1.

Resultados

25
30
Figuras 4 A, B y C. En este caso, se somete a prueba menadiona en 2 líneas celulares de queratinocitos humanos a diversas concentraciones para determinar i) la inhibición la replicación de virus vaccinia (panel izquierdo) y ii) la toxicidad celular (panel derecho). De manera similar, se somete a prueba dicumarol en células Hela. Se manifiesta un efecto dependiente de la dosis en ambos sistemas de prueba. Un efecto deseable sería i) una fuerte inhibición de la replicación del virus y ii) un efecto limitado sobre la viabilidad celular. De hecho, en los tres entornos y a una concentración de $25 \mu\text{M}$, los compuestos de prueba muestran una fuerte inhibición de la replicación del virus ($> 20x$), y sólo un efecto limitado sobre la viabilidad celular ($< 30\%$).

Ejemplo 6

Protocolo experimental

Efecto viricida directo de diversos agentes sobre virus vaccinia (exposición de 24 h)

40
Se incubaron muestras por triplicado de virus vaccinia en una placa de 96 pocillos con agentes a una concentración final de $50 \mu\text{M}$ durante 24 h a 37°C . Tras la incubación, se diluyó el virus 1000 veces y se cuantificó en un ensayo de placas de BS-C-1 de 24 pocillos convencional.

45
Los diversos agentes usados fueron los siguientes: BP: peróxido de benzoílo, D: dicumarol, DNCB: dinitroclorobenceno, DNFB: dinitrofluorobenceno, K1: vitamina K1, K2: vitamina K2, menadiona (M es menadiona nueva, M* es menadiona mantenida a TA durante 2 meses), MBS: bisulfito de menadiona y control.

Resultados

50
Figura 5. En este caso, se cuantifica el efecto viricida directo de agentes seleccionados a una concentración de 50 mM sobre virus vaccinia en un ensayo de infectividad. Aunque la mayoría de los compuestos sometidos a prueba tienen efectos marginales sobre la infectividad del virus, el peróxido de bencilo redujo la infectividad hasta casi la mitad (reducción del 43%), y MBS inactivó el 95% del virus infeccioso.

Bibliografía

55
60
Baker DA, Ferris DG, Martens, MG, Fife KH, Tying SK, Edwards L, Nelson A, Ault K, Trofatter KF, Liu T, Levy S, Wu J. 2011. Imiquimod 3.75% cream applied daily to treat anogenital warts: combined results from women in two randomized, placebo-controlled studies. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011:806105. Publicación electrónica del 24 de agosto de 2011.

Earl PL, Cooper N, Wyatt LS, Carroll MW. 2001. Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks. *Curr protoc Mol Biol*. Unidad 16.16 capítulo 16: unidad 16.

65
Gibbs S, Harvey I, Sterling J, Stark R. 2002. Local treatments for cutaneous warts: systematic review. *BJM* 325: 461-468.

- Gibbs S, Harvey I. 2006. Topical treatments for cutaneous warts. *Cochrane Database Syst Rev* 19 de julio; (3): CDC001781.
- 5 Nakamura J, Muraki Y, Yamada M, Hatano Y, Nii S. 1995. Analysis of molluscum contagiosum virus genomes isolated in Japan. *J Med Virol.* 46: 339-348.
- Senkevich TG, Bugert JJ, Sisler JR, Koonin EV, Darai G, Moss B. 1996. Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: prediction of specific host response-evasion genes. *Science* 273: 813-816.
- 10 Shisler JL, Senkevich TG, Berry MJ, Moss B. 1998. Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus. *Science* 279: 102-105.
- Tyring SK. 2003. Molluscum contagiosum: the importance of early diagnosis and treatment. *Am J Obstet Gynecol.* 189 (3 Suppl): S12-16.
- 15 van der Wouden JC, van der Sande R, van Suijlekom-Smit LW, Berger M, Butler CC, Koning S. 2009. Interventions for cutaneous molluscum contagiosum. *Cochrane Database Syst Rev* 7 de octubre: (4): CD004767.
- 20 Wilhelmus KR. 2010. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus in epithelial keratitis. *Cochrane Database Syst Rev* 8 de diciembre: (12): CD002898.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona para su uso en el tratamiento de una lesión inducida por virus de la piel y/o membrana mucosa provocada por virus del molusco contagioso en un sujeto, en la que dicho compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona se selecciona del grupo que comprende
- 5
- i) menadiona o una sal seleccionada del grupo que comprende bisulfito de menadiona, bisulfito de menadiona dimetilpirimidol, bisulfito de menadiona sódica, bisulfito de menadiona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de menadiona, fosfato de menadiona sódica, bisulfito de menadiona piridinol, epóxido de menadiona y bisulfito de menadiona sódica trihidratada,
- 10
- ii) naftoquinona o una sal seleccionada del grupo que comprende bisulfito de naftoquinona, bisulfito de naftoquinona dimetilpirimidol, bisulfito de naftoquinona sódica, bisulfito de naftoquinona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de naftoquinona, fosfato de naftoquinona sódica, bisulfito de naftoquinona piridinol, epóxido de naftoquinona y bisulfito de naftoquinona sódica trihidratada,
- 15
- iii) lawsona o una sal seleccionada del grupo que comprende bisulfito de lawsona, bisulfito de lawsona dimetilpirimidol, bisulfito de lawsona sódica, bisulfito de lawsona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de lawsona, fosfato de lawsona sódica, bisulfito de lawsona piridinol, epóxido de lawsona y bisulfito de lawsona sódica trihidratada
- 20
- iv) juglona o una sal seleccionada del grupo que comprende bisulfito de juglona, bisulfito de juglona dimetilpirimidol, bisulfito de juglona sódica, bisulfito de juglona nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de juglona, fosfato de juglona sódica, bisulfito de juglona piridinol, epóxido de juglona y bisulfito de juglona sódica trihidratada
- 25
- v) plumbagina o una sal seleccionada del grupo que comprende bisulfito de plumbagina, bisulfito de plumbagina dimetilpirimidol, bisulfito de plumbagina sódica, bisulfito de plumbagina nicotinamida, sal de tetrasodio de difosfato de plumbagina, fosfato de plumbagina sódica, bisulfito de plumbagina piridinol, epóxido de plumbagina y bisulfito de plumbagina sódica trihidratada.
- 30
2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho compuesto de la familia de 1,4-naftoquinona, o dicha sal se administra por vía tópica.
- 35
3. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el sujeto es un ser humano.
4. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica está en el formato de pomadas, linimentos, pastas, películas, hidrogeles, liposomas, vesículas de transferosomas, cremas, lociones, bálsamos, champús medicados, parches dérmicos, parches transdérmicos, pulverizaciones transdérmicas, inyector de chorro o similares, adecuados para aplicación tópica.
- 40
5. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, que comprende al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable adicional seleccionado del grupo que comprende dicumarol, maleato de dimetilo, forona, butioninasulfoxamina o vitamina C.
- 45
6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica se administra antes y/o de manera simultánea y/o tras someterse a un segundo tratamiento químico o mecánico.
- 50
7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que el segundo tratamiento mecánico se selecciona del grupo de legrado, evisceración, excisión, crioterapia, tratamiento con láser o tratamiento con cintas adhesivas.
- 55
8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que el segundo tratamiento químico se selecciona del grupo de ácido tricloroacético o ácido salicílico.

Figura 1A

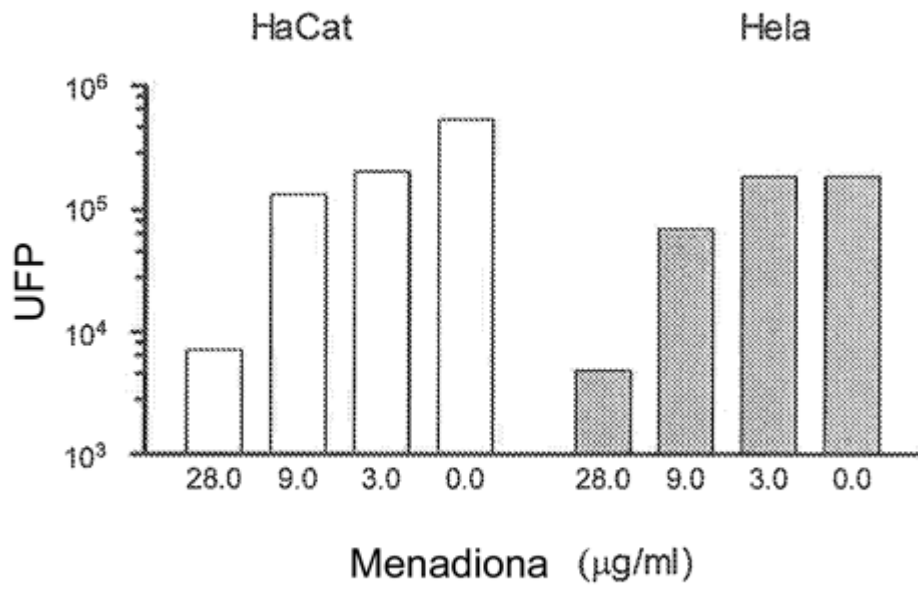


Figura 1B

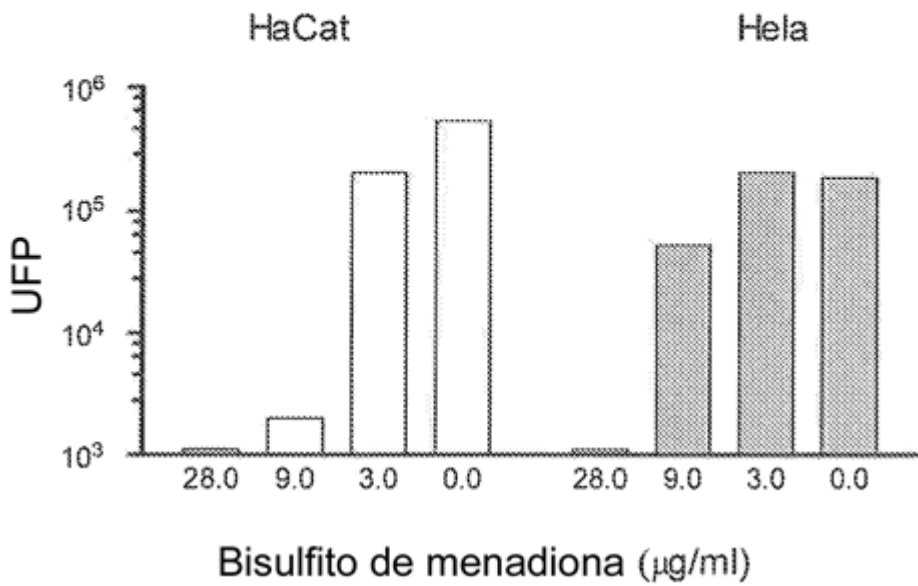


Figura 2

Exposición de virus vaccinia de 4 h a diversos agentes

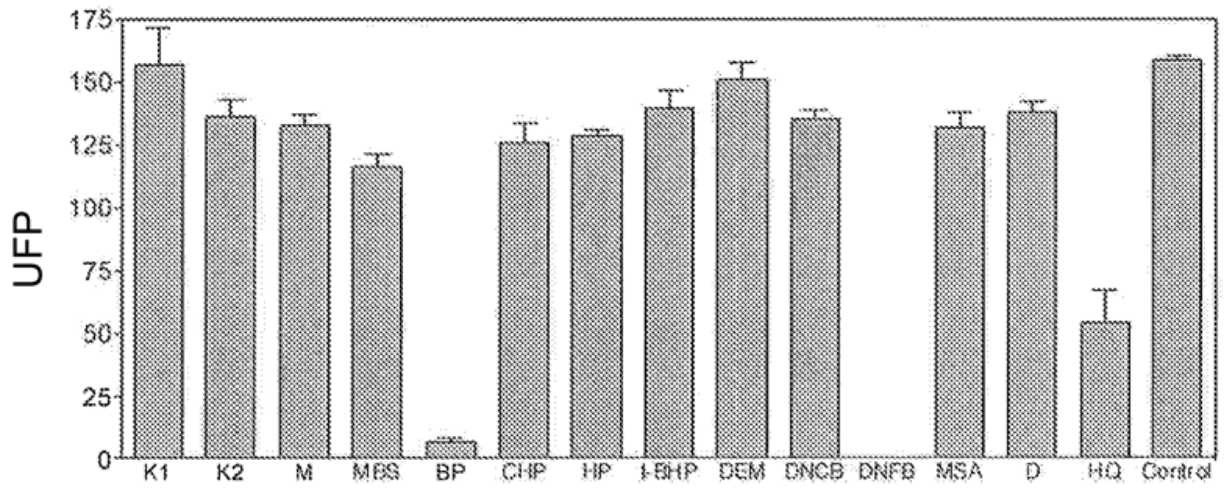


Figura 3

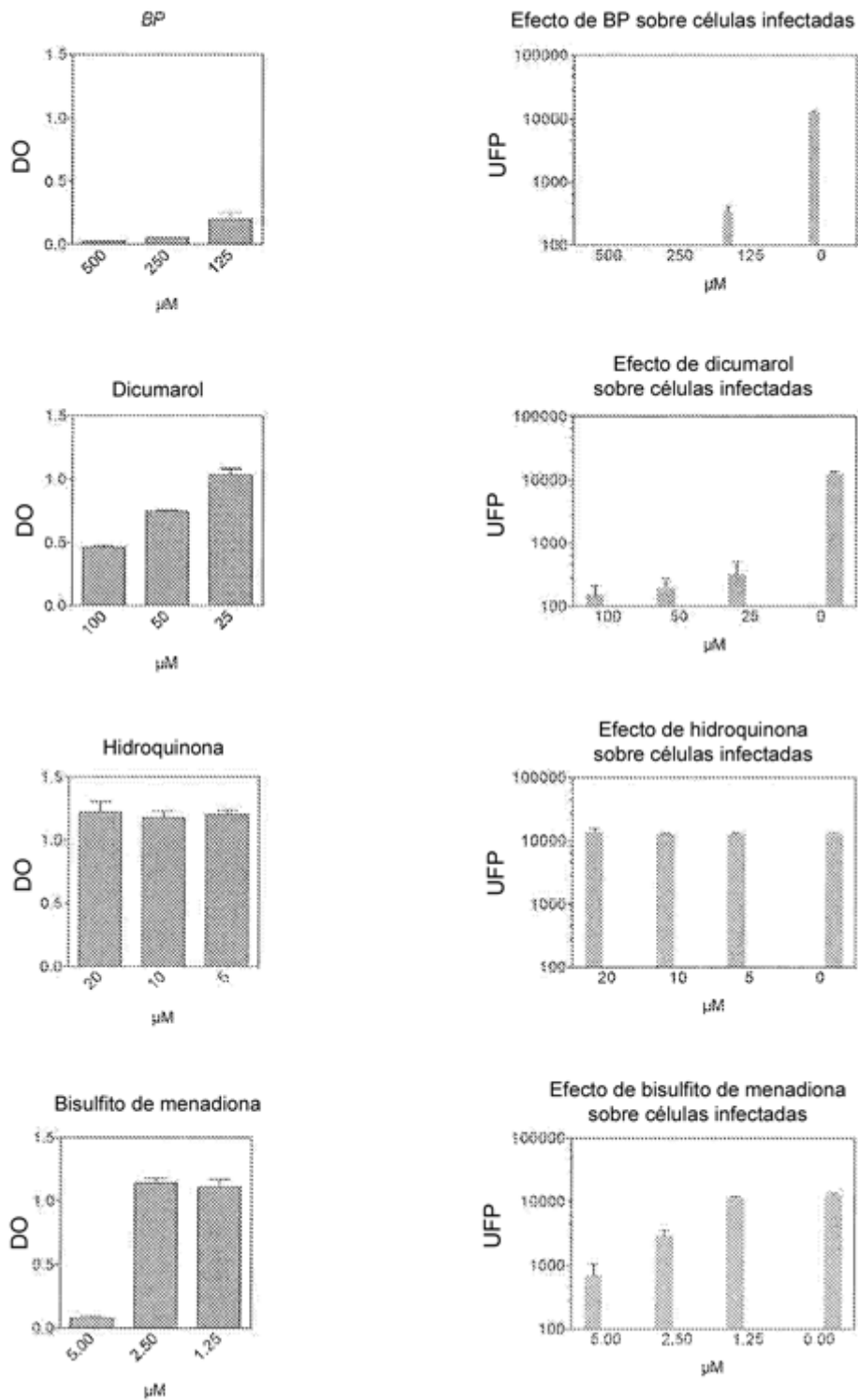
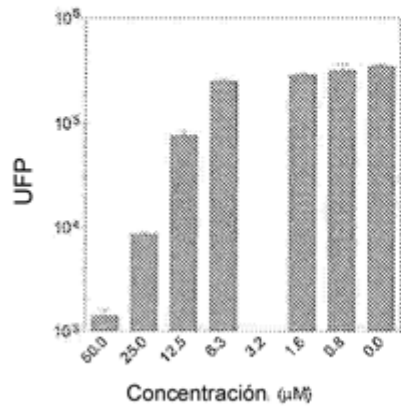


Figura 4A

Efecto de menadiona sobre células Hela

La menadiona inhibe la replicación de virus vaccinia en Hela



Toxicidad de menadiona en Hela

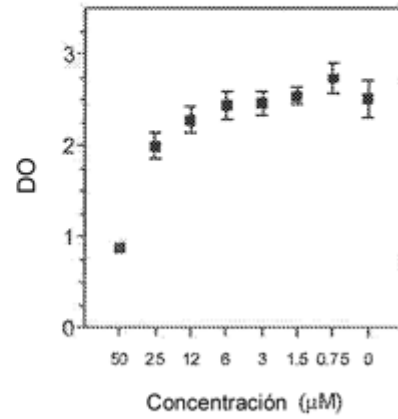
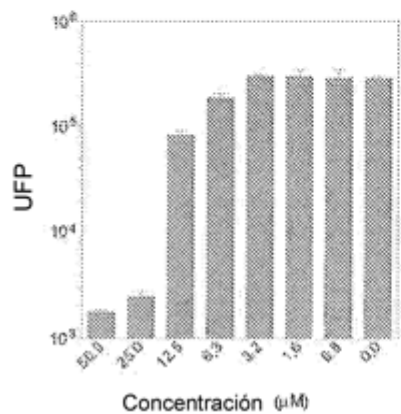


Figura 4B

Efecto de menadiona sobre células HaCaT

La menadiona inhibe la replicación de virus vaccinia en HaCaT



Toxicidad de menadiona en HaCaT

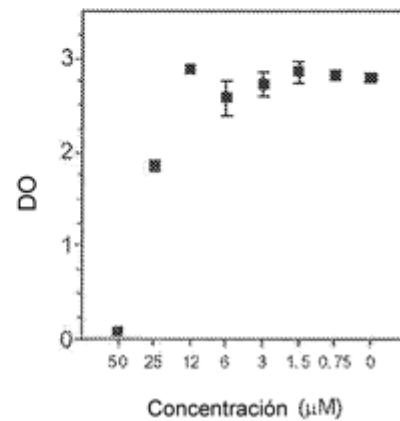
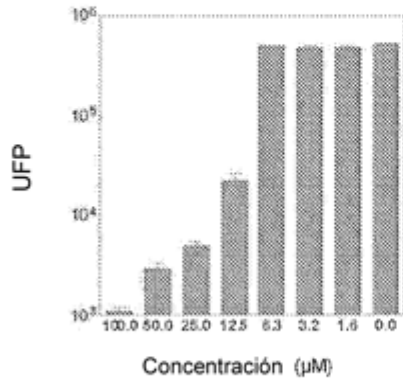


Figura 4C

Efecto de dicumarol sobre células Hela

El dicumarol inhibe la replicación de virus vaccina en Hela



Toxicidad de dicumarol en Hela

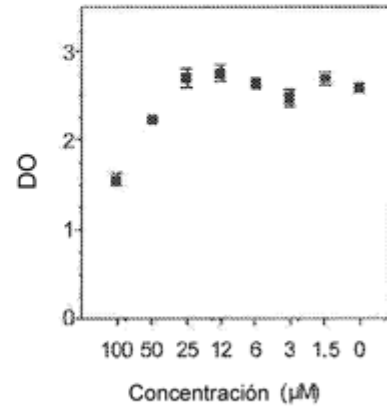
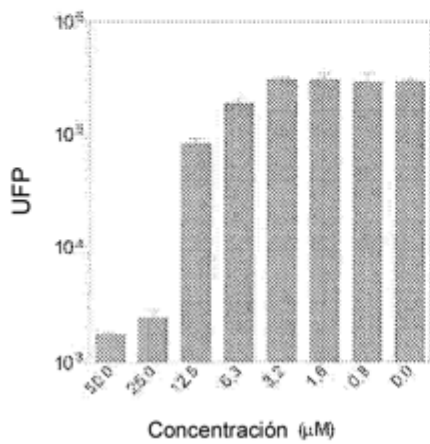


Figura 5

Efecto de menadiona sobre células HaCaT

La menadiona inhibe la replicación de virus vaccinia en HaCaT



Toxicidad de menadiona en HaCaT

